

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Protilátky v terapii klíšťové encefalitidy

Bakalářská práce

Lenka Nedvědová

Vedoucí práce: RNDr. Martin Palus, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Václav Hönig, Ph.D.

České Budějovice 2020

Nedvědová L., 2020: Protilátky v terapii klíšťové encefalitidy. [Antibodies in therapy of tick-borne encephalitis. Bc. Thesis, in Czech.] – 52p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Tick-borne encephalitis (TBE) is a serious life threatening disease caused by tick-borne encephalitis virus (TBEV). The therapy is based on administration of non-specific treatment with anti-inflammatory drugs or IVIg (including non-specific antibodies). Application of non-specific antibodies may present a certain level of risk – mainly of developing antibody dependent enhancement. We have developed and characterized monoclonal antibodies targeting non-structural protein 1 (NS1) of TBEV in order to assess its potential in TBE treatment and diagnostics.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 8.12.2020

.....

Lenka Nedvědová

Poděkování

Ráda bych vyjádřila díky svému školiteli RNDr. Martinu Palusovi, Ph.D., který se stal mým mentorem, za jeho bezmeznou trpělivost a příležitost věnovat se studiu této problematiky, dále Mgr. Václavu Hönigovi, Ph.D., za jeho obětavost a ochotu vždy pomáhat. Rovněž chci poděkovat i celému kolektivu laboratoře Doc. RNDr. Daniela Růžka, Ph.D. který byl vždy velmi přátelský a vstřícný, díky nim jsem si osvojila laboratorní techniky, kterých jsem využívala během práce v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji mé rodině, blízkým přátelům a mému příteli za podporu a důvěru, kterou ve mě vkládali.

Obsah

1.	Virus klíšťové encefalítidy	9
1.1	Úvod.....	9
1.2	Struktura viru	10
1.2.1	Strukturní proteiny.....	10
1.2.2	Nestrukturní proteiny.....	10
2	Klinický obraz	13
2.1	První fáze onemocnění.....	13
2.2	Druhá fáze onemocnění	13
3	Diagnostické metody	14
3.1	Sérologická diagnostika	14
3.1.1	Stanovení hladin protilátek.....	14
3.2	Molekulárně-biologická diagnostika	15
3.2.1	RT-PCR	15
4	Imunoterapie	16
4.1	Polyklonální protilátky	17
4.1.1	Terapeutické využití	17
4.1.2	Imunoglobulinová léčba klíšťové encefalítidy	18
4.2	Monoklonální protilátky	19
4.2.1	Terapeutické využití	20
4.2.2	Hybridomová technologie	20
4.2.3	Imortalizované B lymfocyty.....	22
4.2.4	Technologie fágového displeje.....	22
4.2.5	Plazmidová transfekce	24
4.3	Rizika imunoterapie	25
5	Materiál a metody	27
5.1	Buněčné linie	27
5.2	Virus.....	28
5.3	Monoklonální protilátky	29
5.4	Chemikálie	29
5.5	Nepřímá imunofluorescence	30
5.5.1	Imunofluorescenční barvení	30
6	Výsledky.....	32
7	Diskuze	42
8	Závěr.....	45

9	Seznam použité literatury	46
---	---------------------------------	----

Seznam zkratek

Ab	z angl. „antibody“ (protilátka)
CNS	centrální nervová soustava
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EEG	elektroencefalogram
Ig	imunoglobulin, imunoglobuliny
IVIg	intravenózní imunoglobuliny
KE	klišťová encefalitida
mAb	monoklonální protilátky z angl. „monoclonal antibodies“
MOI	multiplicita infekce z angl. „multiplicity of infection“
MRI	magnetická rezonance
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok z angl. „phosphate buffere saline“
PCR	polymerázová řetězová reakce a angl. „polymerase chain reaction“
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SCIg	subkutánní imunoglobuliny z angl. „subcutaneous immunoglobulin “
VKE	virus klišťové encefalitidy
ELISA	z angl. „Enzyme-Linked immunoSorbent Assay“

Cizí pojmy

Abortivní formy	neúplně rozvinutá forma onemocnění
Alimentární cesta	orální cesta (skrz dutinu ústní)
Analgetické	léky tlumící bolest
Antiflogistické	léky protizánětlivé
Antigen	látka vyvolávající imunitní odpověď
Antikoagulační	protisrážlivý
Febrilní	horečnatý
Frontookcipitální	oblast čelní a týlní kosti
Hemoragie	krvácení
Inokulace	naočkování
Intratekální	uvnitř mozkových plen
Myalgie	svalová bolest
Okcipitální	týlní (kost tvořící zadní část lebky a část spodiny lebeční)
Prognóza	předpověď (pravděpodobný průběh onemocnění)
Progrese	rozvoj
Somnolence	ospalost
Stupor	ztuhlost, strnulost
Subkutánní	podkožní
Thymus	brzlík

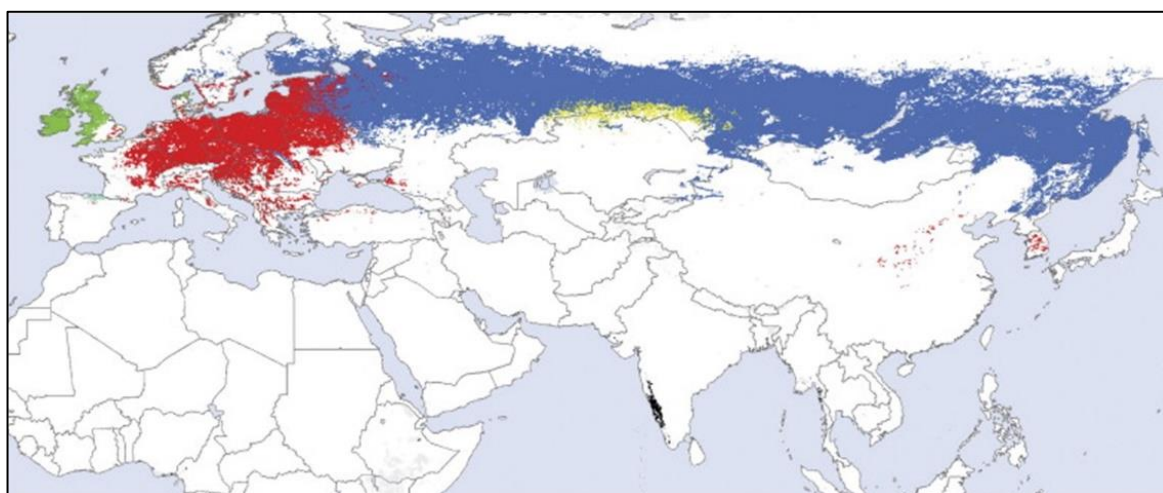
Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši týkající se problematiky léčby klíčové encefalitidy s důrazem na protilátkovou terapii (virus neutralizační protilátky, protilátkami zesílená infekce, anti-NS1 protilátky)
2. Seznámit se s přípravou monoklonálních protilátek
3. Otestovat různé klony anti-NS1 protilátek v metodě nepřímé imunofluorescence, nebo western blottingu pro vybrané flaviviry

1. Virus klíšťové encefalidity

1.1 Úvod

Klíšťová encefalida je závažné virové onemocnění postihující nervovou soustavu. Onemocnění je rozšířeno napříč zeměmi západní Evropy, východní Evropy až po Japonsko. V závislosti na změně klimatických podmínek dochází k signifikantní expanzi do zemí, které do nedávna byly považovány za země nákazy prosté (viz Obr.1) (Holding *et* Dowall, 2020).



Obr. 1: Výskyt VKE napříč Euroasijským kontinentem. Evropský subtyp KE je znázorněn červeně, ten se ve východní Evropě překrývá se subtypem Dálnovýchodním (modrá barva). Na Britských ostrovech a Irsku je zdokumentován výskyt viru vrtivka (zelená barva), který je příbuzný VKE. Taktéž virus Omské horečky (žlutá barva) patří k příbuzným výše zmíněných virů (převzato a upraveno z Randolph *et* Rogers, 2006).

Původcem onemocnění KE je arbovirus řadící se do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*. Viry rodu *Flavivirus* lze rozlišit dle jejich přenašečů na viry, které jsou přenášeny bodavým hmyzem, jedná se např. o virus žluté zimnice, virus dengue, virus horečky západního Nilu a virus japonské encefalidity. Dále pak na flaviviry, které jsou přenášeny prostřednictvím klíšťat. Těmito viry jsou virus Langat, virus vrtivky, či právě virus klíšťové encefalidity (VKE).

Společným rysem infekcí VKE jsou zdroje a zároveň rezervoáry viru, kterými bývají obvykle zvířata. Předními rezervoáry jsou volně žijící malá zvířata – hlodavci, lišky, ptáci, dále mezi domácími zvířaty jsou to psi a menšinové zastoupení tvoří hospodářská zvířata (kozy, ovce, skot) (Růžek *et al.*, 2015). Člověk je v tomto ohledu často posledním a tzv. slepým článkem procesu šíření nákazy. Pro člověka představuje největší riziko nákazy infikované klíště. Velmi ojedinělým případem přenosu viru je alimentární cesta následkem konzumace tepelně neopracovaného mléka od infikovaných zvířat (kozy, krávy) (Göpfertová *et al.*, 2006).

1.2 Struktura viru

Flaviviry jsou malé viry obalené lipidovým pouzdrem. Genomové vlákno RNA kóduje kromě 3 strukturních proteinů také několik nestrukturních proteinů (NS). Strukturní proteiny, které se podílí na samotné stavbě částice, rozlišujeme na obalový glykoprotein (E), kapsidový protein (C) a membránový protein (M), vznikající štěpením z prekurzorového proteinu prM. Proteiny, které zastávají odlišné enzymatické funkce během virové infekce, jsou nestrukturní proteiny. Genom VKE jich kóduje celkem sedm a jsou označovány jako NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Lindenbach *et Rice*, 2003, Zhang, 2003, Mandl *et al.*, 1997).

1.2.1 Strukturní proteiny

Strukturní proteiny jsou nezbytné pro utváření virové částice. Obalový glykoprotein E je největší komponentou. Představuje hlavní antigenní determinantu a cíl pro neutralizační protilátky (Rey *et al.*, 1995, Růžek *et al.*, 2015). Membránový protein M tvoří rozhraní mezi proteinem C a E. Posiluje interakci E proteinu a pravděpodobně mu i zabraňuje ve změně konformace dříve, než se virus setká s prostředím endozomu (Füzik *et al.*, 2018). Komplex kapsidového proteinu C a virová mRNA utváří nukleokapsidu. Interakce proteinu C s mRNA se jeví jako rozhodující pro produkci životaschopných virových částic (Sotcheff, Routh, 2020, Jones *et al.*, 2003).

1.2.2 Nestrukturní proteiny

Během translace virové RNA dochází k syntéze sedmi nestrukturních proteinů. Z této skupiny proteinů je následující část zaměřena především na NS1 protein, který je předmětem experimentální práce a ke kterému se upírá pozornost, jakožto k nástroji využitelnému pro diagnostické či terapeutické účely.

1.2.2.1 Protein NS1

1.2.2.1.1 Struktura

NS1 se vyskytuje v několika různých oligomerních formách. Dimerní forma se objevuje v membránách infikovaných buněk či jejich cytoplazmě. Nicméně extracelulární formy NS1 mohou být i mnohem větší (např. hexamerní forma) (Crooks *et al.*, 1994, Winkler *et al.*, 1988). Ukazuje se, že konformace proteinu se může lišit mezi jednotlivými flaviviry. Určité odlišnosti jsou patrné například mezi virem horečky západního Nilu a horečkou Dengue (Crooks *et al.*, 1994, Winkler *et al.*, 1988, Akey *et al.*, 2014). Primární struktura proteinu je vysoce konzervovaná. Studie prozatím byly schopny odhalit značně odlišné chemicko-fyzikální vlastnosti intracelulárního a extracelulárního proteinu NS1 (Crooks *et al.*, 1994).

1.2.2.1.2 Funkce

Předpokládá se, že intracelulární NS1 je nezbytným kofaktorem pro virovou replikaci a morfogenezi virionu. Indukuje obrannou imunitní odpověď organismu, do které jsou zapojené humorální a buněčně spřažené mechanismy imunitního systému. Protilátky proti proteinu NS1 mohou vyvolat protektivní odpověď v organismu (Akey *et al.*, 2014, Schlesinger *et al.*, 1990). Zároveň ovlivňuje tento protein aktivaci klíčových buněčných komponent uplatňujících se při udržení vaskulární homeostáze – makrofágy a destičky skrze přímou interakci s TLR4 (toll-like receptor 4). Aktivace makrofágů a mononukleárních buněk vede k sekreci prozánětlivých cytokinů, aktivace destiček způsobí zvýšení jejich agregace, adheze k endoteliálním buňkám a fagocytózy ze strany makrofágů. Výsledkem této aktivity je přímé ovlivnění složení plazmy vedoucí k trombocytopenii, popřípadě hemoragii (Cervantes-Salazar *et al.*, 2015).

1.2.2.1.3 Přítomnost v tělních tekutinách/orgánech

NS1 je spojován převážně s intracelulárními membránami. Rovněž lze jednotlivé frakce NS1 nalézt spřažené s lipidovými rafty na plazmatické membráně či v cytoplazmě. Sekretovanou formu NS1 (sNS1), lze prokázat v krevním séru (Akey *et al.*, 2014, Alcalá *et al.*, 2016). NS1 lze dobře detekovat v séru či plazmě již 9.-12. den po projevu klinických příznaků. Sekretovaná NS1 indukuje produkci velkého množství specifických protilátek (Liu *et al.*, 2016, Salat *et al.*, 2020).

1.2.2.2 Proteiny NS2 (NS2A, NS2B)

NS2A je malý, hydrofobní protein vznikající následkem štěpení polyproteinového vlákna neznámou hostitelskou proteázou. Patří mezi nejméně prozkoumané nestrukturní proteiny. Prozatím se mu přisuzuje několik funkcí, např. antagonismus imunitní odpovědi hostitele (interferonová odpověď), součást syntézy virové RNA a dále např. úloha během samotného formování virionu (Xie *et al.*, 2013). Funkce NS2B úzce souvisí s nestrukturním proteinem NS3. Kooperace těchto nestrukturních proteinů ovlivňuje proteázovou aktivitu viru. Rovněž bylo pozorováno, že NS2B je vyžadován pro štěpení NS4/NS5 *in vitro* (Falgout *et al.*, 1991).

1.2.2.3 Protein NS3

Zástupce nestrukturních proteinů, který má různorodou enzymatickou aktivitu a interaguje s dalšími nestrukturními proteiny. Slouží jako proteáza a helikáza. V kooperaci s NS5 proteinem zajišťuje veškeré enzymatické děje kolem replikace flavivirové RNA. Řada studií taktéž poukazuje, že funkce NS3 proteinu sahá i mimo replikační komplex (Dios-Toro *et al.*, 2020).

1.2.2.4 Proteiny NS4 (NS4A, NS4B)

Skupina NS4 proteinů patří mezi ty, u kterých rovněž není detailně popsána jejich funkce. Odhaduje se, že oba proteiny, NS4A i NS4B, ovlivňují replikační komplex (Yang *et al.*, 2020).

1.2.2.5 Protein NS5

Protein NS5 je největším a nejvíce konzervovaným ze všech nestrukturních virových proteinů. Vykonává tři zásadní úlohy během životního cyklu viru: replikaci genomu viru (RNA-dependentní RNA polymeráza a methyltransferáza), supresi interferonu a zdá se, že by mohl hrát určitou roli i v procesu modulace aktivity buněčného spliceosomu (Best, 2017).

2 Klinický obraz

Průběh onemocnění KE je ovlivňován několika faktory. Znatelné rozdíly jsou pozorovány u jednotlivých subtypů virů KE. Není však zcela jasné, zda se nejedná pouze o odlišné vlastnosti na úrovni jednotlivých kmenů. Klíčová encefalitida postihuje všechny věkové kategorie, mnohem častěji se projevuje u dospělých a starších věkových skupin. Kromě subtypů může být průběh KE ovlivňován i infekční dávkou viru, která proniká do organismu, dále pak věkem, pohlavím, aktuálním zdravotním stavem či genotypem hostitele (Růžek *et al.*, 2015).

Inkubační doba (od infekce k prvním projevům nemoci) se pohybuje v rozmezí 4–28 dní, průměrně však trvá 8 dní. Dlouhou inkubační dobu u některých pacientů lze vysvětlit nezpozorováním prvotních příznaků během první fáze nemoci (nespecifický charakter příznaků), nebo opominutím příznaků při sdělování anamnézy svému ošetřujícímu lékaři. V takovýchto případech je pacient nejčastěji léčen až v počátku druhé fáze onemocnění, během hospitalizace (Růžek *et al.*, 2015, Gírl *et al.*, 2020).

2.1 První fáze onemocnění

Po uplynutí inkubační doby dochází k projevům první fáze onemocnění, tzv. fáze viremické. Tato fáze trvá přibližně 2–8 dní a vyznačuje se nespecifickými příznaky, které jsou obdobné chřipkovému onemocnění (mírně zvýšená teplota, bolesti hlavy a svalů, návaly nevolnosti, celková únava). Po přibližně týdenním období, kdy příznaky odezní, se může dostavit druhá fáze (přibližně jedna třetina pacientů) (Göpfertová *et al.*, 2006).

2.2 Druhá fáze onemocnění

Druhá fáze onemocnění je doprovázena zvyšující se teplotou těla, která může dosahovat až 40 °C. Celkové příznaky mohou být nevýrazné, dominující je však postižení CNS. Virus prostupuje přes hematoencefalickou bariéru a napadá centra nervové soustavy. Klinické příznaky se během této fáze onemocnění odvíjejí od lokalizace viru v CNS. Virus zasahuje různé oblasti mozku, především oblast leptomening a šedé hmoty, se závažnými příznaky je spojeno postižení center prodloužené míchy, mozkového kmene, bazálních ganglií, mozečku, krční míchy a míšních kořenů. Časté je postižení více nervových struktur současně (Růžek *et al.*, 2015).

3 Diagnostické metody

Základem stanovení přesné diagnózy jsou laboratorní vyšetření, jelikož anamnéza a klinické příznaky nejsou u tohoto onemocnění dostatečně specifické pro jednoznačné stanovení KE. Z hlediska anamnestických dat mohou ke včasné diagnostice přispět informace, zda pacient pobýval v endemických oblastech s výskytem KE, nebo nález přísátého klíštěte v posledních čtyřech týdnech. Tyto údaje jsou však pouze doplňujícími informacemi (Studahl *et al.*, 2013, Růžek *et al.*, 2015).

3.1 Sérologická diagnostika

3.1.1 Stanovení hladin protilátek

V současné době je pro diagnostickou praxi využívána některá z modifikací testu ELISA (z angl. „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“). Standardně jsou testovány protilátky tříd IgM a IgG v krevním séru (GirI *et al.*, 2020). Tyto protilátky jsou obvykle snadno detekovatelné již na počátku druhé fáze onemocnění, kdy dochází k rapidnímu vzrůstu titru protilátek v séru nebo cerebrospinální tekutině. Z pohledu časného zachytu onemocnění lze uplatnit modifikaci ELISA testu zaměřenou na průkaz protilátek proti NS1 proteinu pro identifikaci KE zároveň i v odlišení specifických protilátek, indukovaných přítomností viru v těle pacienta od protilátek, které vznikly následkem vakcinace (Albinsson *et al.*, 2020, GirI *et al.*, 2020). Avšak, přítomnost protilátek proti NS1 proteinu nemusí být pouze u pacientů, kteří prodělali infekci. Protilátky proti nestrukturnímu proteinu si mohou vytvořit i vakcinovaní jedinci. Vakcíny, které jsou schváleny pro vakcinaci na území Evropy, obsahují nejenom virovou částici, ale i nestrukturní protein NS1. Následkem čehož může být podmíněna protilátková odpověď proti tomuto proteinu (Salat *et al.*, 2020).

Laboratorní nález je ověřován opětovným testováním v odstupu minimálně jednoho týdne. Nález se rovněž ověřuje, pokud je hladina protilátek nezvykle nízká. Překážkou ve stanovení KE může být zkřížená reaktivita protilátek (protilátky vzniklé při předešlé infekci jiným flavivirem). Další úskalí představují vakcinovaní pacienti (Albinsson *et al.*, 2020). Rovněž rekonvalescentní pacienti po flavivirové infekci (př. WNV, ZKV) mohou při infekci odlišným flavivirem vykazovat zkříženou reaktivitu protilátek (Puchhammer-Stöckl *et al.*, 1995, Sonnenberg *et al.*, 2004). Pro potvrzení onemocnění lze využívat komerčně dostupných testovacích souprav, které jsou založeny na detekci specifických protilátek proti celému viru KE, a především proti strukturnímu proteinu E.

Nicméně, bylo odhaleno, že riziko zkřížené reaktivity v případě specifických protilátek proti NS1 je výrazně nižší než u komerčně dostupných testů, které se zaměřují na celý virus. Nejpravděpodobnější vysvětlení tohoto zjištění se zakládá na nižší homologii mezi flavivirovými NS1 proteiny v porovnání např. s flavivirovým proteinem E (Holzmann, 2003, Giral *et al.*, 2020).

Nejednoznačné výsledky testů jsou vzrůstajícím problémem především na území evropských zemí, kde lidé častěji vyjíždějí do exotických oblastí, ve kterých se vyskytují další zástupci flavivirů, např. virus dengue, virus žluté zimnice, virus horečky západního Nilu a další (Holzmann, 2003).

Vysoce specifický test, který navíc testuje skutečný stav imunity, je virus neutralizační (případně plak redukční) test. Tento test se provádí s živým virem na tkáňových kulturách. Hodnotí se schopnost séra inaktivovat virus. Nevýhodou tohoto testu je jeho technická náročnost, vysoké požadavky na zabezpečení personálu i prostor, ve kterém se s virem pracuje. Naopak přednost tohoto testu tkví v jeho vysoké specifitě, protože je to jediný test, který není ovlivněn podobností viru klíšťové encefalitidy s některými dalšími flaviviry. Testy jsou prováděny většinou až v druhé fázi onemocnění.

Při stanovování diagnózy se berou v úvahu výsledky všech provedených vyšetření, u nejasné kazuistiky se prvotní výsledky ověřují odběrem dalších vzorků v odstupu 7 – 14 dnů. Proto musí být výrazný nárůst TBEV – specifických protilátek v séru pacienta během dvou týdnů, nebo musí být výsledek potvrzen virus neutralizačním testem, který je vysoce specifický (Holzmann, 2003).

3.2 Molekulárně-biologická diagnostika

3.2.1 RT-PCR

V případě časného podezření na onemocnění KE (během první fáze) je možné z krve izolovat nukleové kyseliny viru a následně je prokázat pomocí reverzně transkriptázové PCR (RT–PCR) (Albinsson *et al.*, 2020). Viremie se vyskytuje pouze několik dnů v první fázi onemocnění. Ve druhé fázi (období neuroinfekce) lze RT–PCR využít pro detekci viru v cerebrospinální tekutině se sníženou citlivostí (Holzmann, 2003, Gritsun *et al.*, 2003).

4 Imunoterapie

Terapie pomocí protilátek se stala nepostradatelnou součástí klinické praxe. Aplikace protilátek má široké využití počínající léčbou zánětlivých stavů, imunodeficitních onemocnění, rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, metabolických poruch až po indikaci imunoglobulinů při transplantacích pro potlačení rizika odmítnutí transplantátu. Cílem terapie založené na využití protilátek je eliminace, neutralizace patogenů nebo přímý účinek namířený vůči původci (Brekke *et al.*, 2003, Maleki *et al.*, 2013).

Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig) jsou glykoproteinové molekuly produkované plazmatickými buňkami odvozenými od B lymfocytů po stimulaci specifickým antigenem. Nacházíme je v krevním séru, tkáňovém moku a dalších orgánech (Shaz, Hillyer *et al.*, 2019).

Skládají se ze dvou strukturních jednotek, tzv. lehkého a těžkého řetězce. Těžký řetězec je složen z variabilní domény a konstantních domén. Lehký řetězec má pouze jednu variabilní a jednu konstantní doménu. Variabilní oblasti protilátek se uplatňují při rozpoznávání patogenu. Protilátky disponují oblastí, která interaguje s antigenem (paratop). Paratopy jsou pro danou protilátku specifické, a proto interagují pouze s antigenem, který tomuto „místu“ odpovídá (Maverakis *et al.*, 2015).

Na základě odlišností v Fc regionu (těžkých řetězců) jsou protilátky členěny do pěti izotypů: IgM, IgG, IgA, IgE a IgD. Z těchto izotypů mají největší potenciál pro imunoterapii protilátky IgG. Imunoglobuliny třídy G tvoří 70-80 % všech protilátek, vynikají svojí dlouhou životností v organismu a jsou schopny prostupovat do extravaskulárního prostoru (Maverakis *et al.*, 2015).

4.1 Polyklonální protilátky

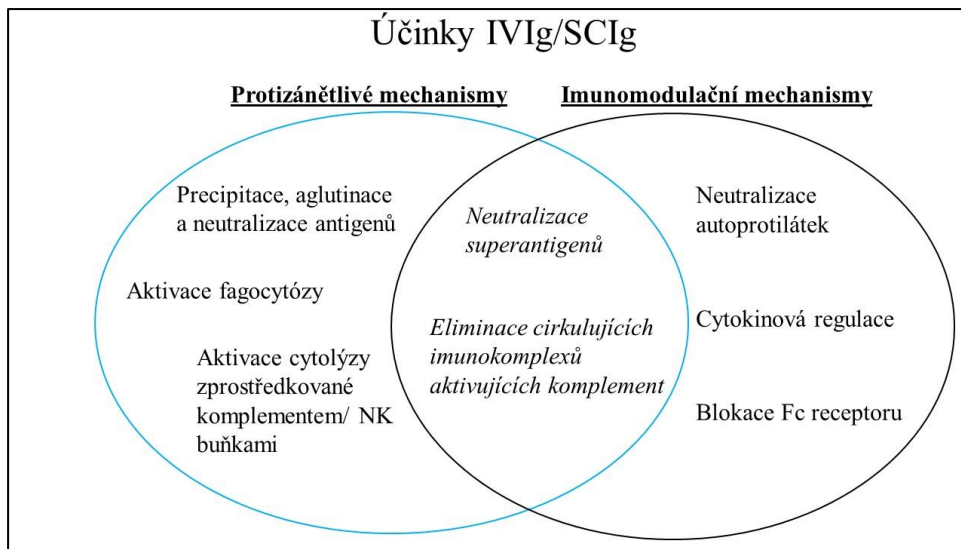
Polyklonální protilátky jsou charakterizovány svojí heterogenitou. Tvoří směs několika imunoglobulinů, které kombinují různou afinitu a specifitu k různým epitopům jednoho antigenu, který indukuje jejich produkci. Nejsou tak populací imunoglobulinů, které by měly identické aminokyselinové sekvence.

4.1.1 Terapeutické využití

Podávání humánních imunoglobulinů (Ig) je léčebným postupem široce používaným pro pacienty trpící primární či sekundární imunodeficiencí, neurologickými poruchami, nemocemi krevního systému, rakovinami nebo autoimunitními onemocněními (Imbach *et al.*, 1981).

Imunoglobulinové preparáty jsou koncentráty sloučených polyspecifických imunoglobulinů získaných od zdravých dárců. Na přítomnost jednotlivých imunoglobulinů má vliv populace dárců a prostředí, ve kterém žijí. V závislosti na těchto faktorech lze předpokládat, že budou obsahovat soubor protilátek různých specifit proti širokému spektru infekčních agens (virových, bakteriálních a dalších), vlastní antigeny a protilátky proti idiotypu (Barahona Afonso *et João*, 2016). Zastoupení jednotlivých tříd přibližně odpovídá lidské plazmě. Převahu mají protilátky IgG, v menším množství jsou přítomny IgA, IgM a stopové prvky (cukry, aminokyseliny), včetně stabilizačních látek (Barahona Afonso *et João*, 2016).

V praxi se setkáváme s preparáty dvojího typu. Lékaři mohou volit mezi aplikací intravenózních imunoglobulinů (IVIg) nebo subkutánních imunoglobulinů (SCIg). Intravenózní aplikace se volí nejčastěji u akutnějších stavů, kdy je nutno dodat vyšší dávky (Stangel *et Pul*, 2006). Dále u starších pacientů či pacientů, kteří si injekční dávku nezvládají podat sami. Subkutánní aplikace má výhodu především v jednoduché aplikaci. (Chérin *et Cabane*, 2010). Přesný mechanismus, kterým IVIg/SCIg účinkují, nebyl doposud popsán, nicméně klinické studie a laboratorní modely ukázaly signifikantní efekt imunoglobulinů během léčby imunitních onemocnění (Obr. 2). Důležité však je, že jeden či více mechanismů účinku, kterými preparáty disponují, se mohou současně uplatňovat v léčbě široké škály onemocnění. Zároveň však neúměrná imunitní odpověď může vyvolat závažné poškození CNS (Stangel *et Pul*, 2006, Chen *et al.*, 2019).



Obr. 2: Stručný přehled účinků, kterými disponují imunoglobulinové preparáty. Rozdělení účinků na mechanismy, které ovlivňují zánětlivé procesy, a mechanismy, jež se uplatňují při formování imunitní odpovědi. Některé z účinků zasahují do obou sfér.

4.1.2 Imunoglobulinová léčba klíšťové encefalitidy

Použití specifických imunoglobulinů přináší nesporná pozitiva i v případě léčby klíšťové encefalitidy. Zároveň zde existují vážné obavy z vedlejších účinků, které se mohou u pacientů projevit. Kromě zmiňovaných účinků mírného rázu (bolesti hlavy, nevolnost) i závažná rizika jako je fenomén známý jako protilátkami zesílená infektivita („antibody dependent enhancement – ADE“) (viz str. 24). K aplikaci Ig preparátů se přistupuje taktéž odlišně v různých regionech výskytu nákazy.

Na území Ruské federace se imunoglobulinové preparáty používají pro pasivní imunizace, postexpoziční profylaxi a z části i přímo terapii KE. V zemích Evropské unie však přetrvávají obavy ze vzniku ADE po podání IVIg, proto se preparáty podávají především pacientům ve velmi závažném stavu nebo těm, u kterých není alternativní možnost léčby. Léčba však nemusí být vždy úspěšná. Dostupná literatura sice dokládá případ pacienta s těžkou formou KE, kterému se po léčbě vysokými dávkami IVIg výrazně zlepšil průběh KE, taktéž ale lze nalézt mnoho případů s výrazně odlišnými výsledky léčby. Odlišnost preparátu IVIg není pouze mezi jednotlivými výrobci, ale objevují se i odlišnosti mezi jednotlivými šaržemi léků stejného výrobce (Růžek, Dobler *et Niller*, 2013, (Elsterova *et al.*, 2017).

Protože jsou preparáty připravovány z plazmy a krve dárců, u kterých mohou být přítomny protilátky proti VKE, mohou se tak tyto specifické protilátky dostávat do výsledného preparátu. Odlišnost v jednotlivých šaržích preparátů IVIg v České republice byla potvrzena analýzou, která odhalila přítomnost vysokých koncentrací protilátek neutralizující virus KE v určitých šaržích, zatímco jiné šarže stejného preparátu tyto protilátky neobsahovaly. V provedených testech na laboratorních zvířatech bylo prokázáno, že na průběh onemocnění má vliv zejména přítomnost specifických protilátek než samotné imunomodulační účinky IVIg (Růžek, Dobler *et Niller*, 2013, Elsterova *et al.*, 2017).

I přesto, že imunoglobulinové preparáty (dnes již čtvrté generace) zaručují vysoké standardy, co se týče kvality a tolerability, mohou se při léčbě objevit vedlejší nežádoucí účinky. Vedlejší účinky jsou poměrně vzácné a nejčastěji mírného rázu, avšak jsou zaznamenány i případy s vážnými vedlejšími účinky po podání preparátů (viz str. 25) (Chérin *et Cabane*, 2010).

4.2 Monoklonální protilátky

Naproti tomu monoklonální protilátky (mAb) jsou identické kopie imunoglobulinové molekuly s identickou primární strukturou, identickou specificitou a efektorovou funkcí. Vznikají jako produkty jednoho klonu plazmatické buňky. Tyto protilátky jsou uplatňovány především v biomedicínském výzkumu k identifikaci, analýze nebo ke kvantifikaci konkrétních antigenů, na které jsou namířeny (viz Obr. 3). Tento typ protilátek může být produkován proti jakémukoliv epitopu na antigenu či imunogenu (Chaigne *et Watier*, 2017).

Taktéž je lze využívat k detekci, purifikaci a charakterizaci sledované látky v biomedicínském výzkumu. Monoklonálních protilátek je v dnešní době na trhu široká škála a objevují se nové technologie jejich produkce (např. amplifikace B buněk, kultivační metody). Stejně tak jako hybridomová technologie (viz str. 21), i tyto nové metody mají své výhody i nevýhody. Přesto je hybridomová technologie stále nejvyužívanějším způsobem, jak monoklonální protilátky získat (Gura, 2002, Wootla, Denic *et Rodriguez*, 2014).

4.2.1 Terapeutické využití

Léčba monoklonálními protilátkami je formou imunoterapie, která využívá monospecifické vazby monoklonálních Ab na cílové proteiny nebo jiné buněčné struktury, které rozpoznávají jako antigeny. Monoklonální protilátka při reakci s makromolekulou může způsobit neutralizaci jejího biologického účinku, nebo může vést k aktivaci komplementového systému a k likvidaci buňky, k indukci apoptózy nebo ke spuštění dalších kaskád, vedoucích k likvidaci či modifikaci cílové struktury (Chaigne *et* Watier, 2017). Ve srovnání s preparáty IVIg vykazují monoklonální Ab menší riziko pro pacienty z hlediska vedlejších účinků léčby. Proto mají velký terapeutický potenciál právě při léčbě infekčních virových onemocnění, jako je KE, kdy hrozí vznik závažných stavů (viz str. 25). Kromě zacílení léčiva proti původci onemocnění lze používat monoklonální Ab i při modulaci imunitní odpovědi. Skrze ně lze ovlivňovat zánětlivé stavy, které v těle probíhají jako odpověď imunitního systému na přítomný patogen (Brekke *et* Sandlie, 2003, Parren *et* Burton, 2001).

4.2.2 Hybridomová technologie

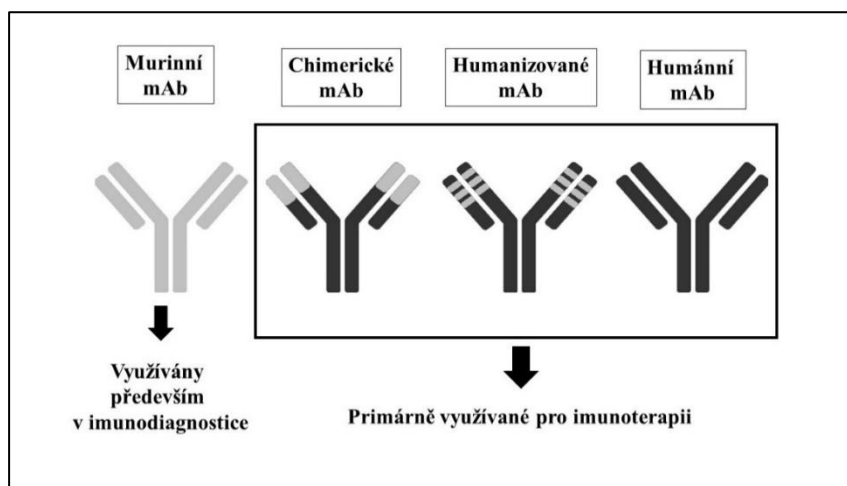
4.2.2.1 Historie

První monoklonální protilátky, které byly připravované z myší, se zpočátku setkaly s neúspěchem. Lidské tělo protilátky považovalo za cizorodé a odmítalo je. Postupem času se však podařilo vytvořit humanizované protilátky. Humanizované protilátky byly vyvinuty záměnou myších hypervariabilních oblastí imunoglobulinu za konstantní oblasti humánní protilátky (Gura, 2002). Přelom nastal v létě roku 1973, kdy George Köhler a César Milstein publikovali metodu k vytvoření velkého množství myších monoklonálních protilátek (mAbs) s předem definovanou specificitou (Köhler, G. *et* Milstein, C. 1975, Leavy, 2016).

4.2.2.2 Hybridomy

Zpočátku byla hybridomová technologie limitována pouze myšími antigeny, ale postupným rozvojem metody začaly přibývat mAb proti antigenům dalších druhů zvířat, např. králičí, kuřecí, kozí, ovčí atd. Nakonec se objevily i humánní monoklonální protilátky. Na úspěšnosti vzniku hybridomu se podílí několik klíčových faktorů. Přítomnost homologního proteinu v imunizovaném zvířeti, shoda partnera pro fúzi, množství proteinu nebo antigenu při imunizaci a další (A. Glukhova *et al.*, 2016).

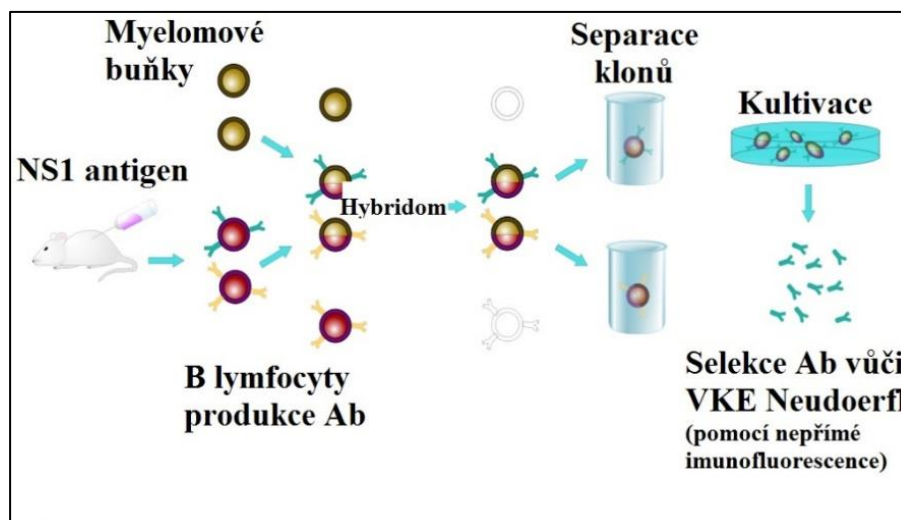
V dnešní době jsou stále preferované humanizované mAb, které díky strukturální podobnosti s humánními protilátkami dokáže lidské tělo úspěšně přijímat. Nejúčinnější mAb jsou pro člověka humánní mAb. Nicméně, využití těchto mAb v léčbě je značně limitováno samotnou technologií přípravy. Nedostupnost kompatibilního partnera k fúzi limituje produkci plně humánních hybridomů a mAb, většina dostupných partnerů k fúzi B buněk tedy pochází z hlodavců (A. Glukhova *et al.*, 2016, Gorny *et al.*, 1993).



Obr. 3: Zjednodušené schéma typů monoklonálních protilátek a jejich využití v oblasti biomedicínského výzkumu a medicíny. Zatímco plně murinní mAb pochází jednodruhu (myš), chimerizované mAb jsou již vyrobeny fúzí variabilní oblasti z jednoho druhu (např. myš) s konstantními oblastmi z jiného druhu (např. člověk). Humanizované protilátky procházejí z nehumánních druhů (např. myš), ale proteinové sekvence těchto Ab byly modifikovány, aby se zvýšila jejich podobnost s plně humánními protilátkami.

4.2.2.3 Princip metody

Prvním krokem jsou optimalizace specifického imunogenního antigenu, který je následně zvířeti opakovaně aplikován v rozmezí několika týdnů (viz Obr. 4). Ze zvířete je po uplynulé době odebráno sérum a zjišťována reaktivita a specifita sérových protilátek vůči imunizačnímu antigenu. Ze zvířat s prokazatelně vysokými titry vazebných protilátek je odebrána slezina, ze které jsou separovány splenocyty. Splenocyty jsou fúzovány s immortalizovanými myelomovými buňkami. Fúzované buňky jsou následně selektovány v HAT mediu (hypoxanthine-aminopterin-thymidine). Myelomové buňky jsou vysoce vnímavé k HAT mediu. Během tohoto kroku přežijí pouze hybridomy, nefúzované B buňky v HAT mediu umírají kvůli jejich krátké životnosti. Hybridomy dále procházejí screeningem, který vyselektuje pouze hybridomy, které produkují požadované protilátky.



Obr. 4: Zjednodušené schéma hybridomové technologie. Vpravení antigenu do myši (zde znázorněn NS1 antigen studovaný v této práci). Dále fúze, ze které vzniká hybridom. Separace a následná selekce hybridomů. Vybrané hybridomy jsou poté kultivovány a z jejich supernatantu odebírány výsledné monoklonální protilátky (převzato a upraveno z Abbas *et al.*, 2015).

4.2.3 Imortalizované B lymfocyty

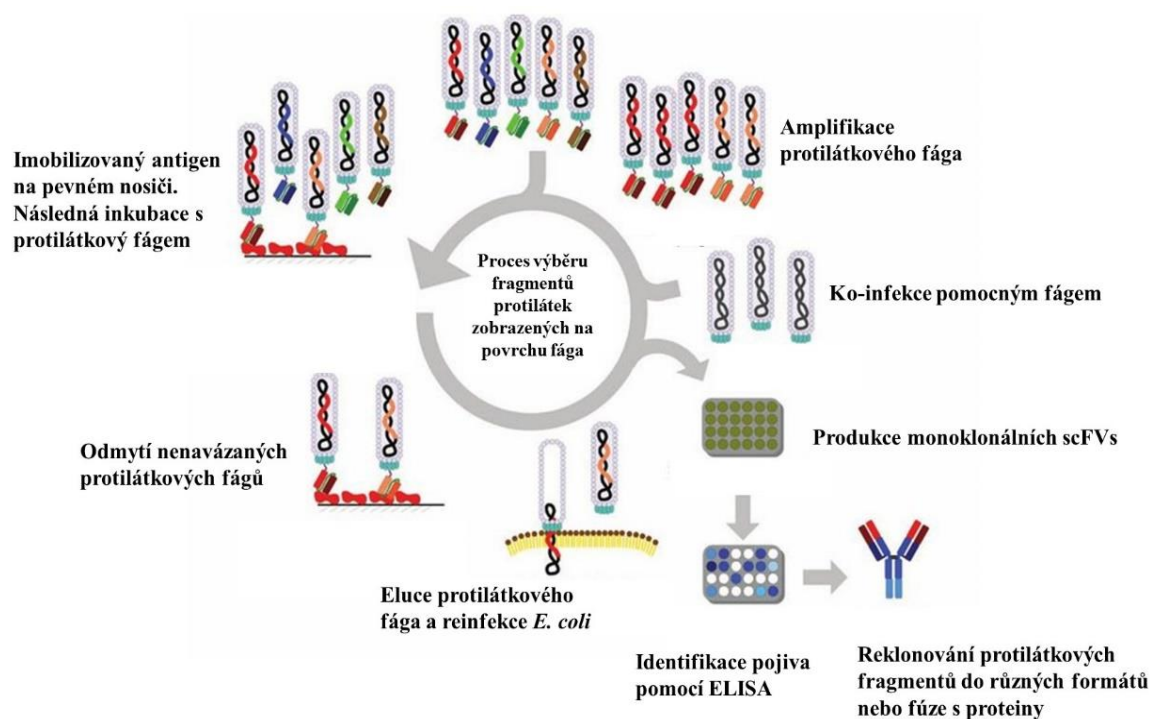
Šíření nových patogenů představuje trvalou hrozbu pro lidské zdraví. V důsledku toho se objevují nové metody, které umožňují produkci vysoce specifických mAb v relativně krátkém čase. Dřívější práce ukázaly, že produkce lidských mAb lze získat skrze imortalizaci B buněk virem Epstein-Barrové (Steinitz *et al.*, 1977). B lymfocyty jsou získány od rekonvalescentního dárce z periferní krve, následně jsou z ní izolovány samotné B lymfocyty.

Tato metoda však má nízkou účinnost. Při modifikaci této metody, která zahrnuje přidání polyklonálního aktivátoru B buněk lze dosáhnout vysoce účinných klonů B lymfocytů produkující neutralizační protilátky. Protože paměťové B lymfocyty mohou v těle přetrvávat i desetiletí, může být rekonvalescent kdykoliv dotazován pro případné dárce, přičemž jediným limitujícím faktorem je celkový počet buněk, které je třeba vyšetřit, aby bylo možné získat dostatek specifit (Traggiai *et al.*, 2004).

4.2.4 Technologie fágového displeje

Vývoj knihoven fágového displeje protilátek představuje alternativní techniku k tradiční hybridomové technologii. Zahrnují izolaci mAb plně odvozených od člověka z velkých repertoárů genů Ig zobrazených na povrchu bakteriofágů (Winter *et al.*, 1991). Fágový displej je všestranná technologie výběru *in vitro*, kterou lze použít k získání vysoce afinitních protilátek specifických pro širokou škálu antigenů (Griffiths *et al.*, 1994).

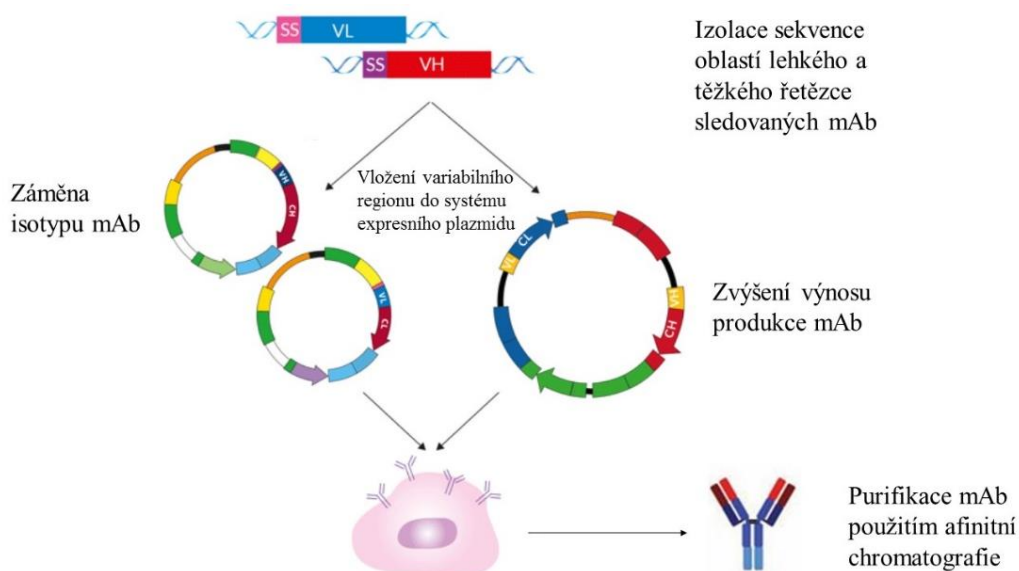
Technologie fágového displeje protilátky je univerzální, reprodukovatelná a funkční technologie, kterou lze použít k izolaci kandidátů protilátek pro četné indikace onemocnění. I když je to nejběžnější a dobře zavedená forma zobrazovacích technologií, úspěch izolace užitečných protilátek je vysoce závislý na kvalitě a povaze cílového antigenu použitého při biopanningu a velikosti a kvalitě knihovny. Biopanning (viz. Obr. 5) je postup výběru vazebných partnerů z knihoven fágového displeje. Afinitně řízeným selekčním postupem jsou specifická pojiva proti vybranému agens obohacována o fágové částice během několika po sobě jdoucích cyklů (Ganten *et* Ruckpaul, 2006). Provedením buněčného biopanningu lze displej protilátkového fága použít k identifikaci nových buněčných biomarkerů, k izolaci protilátek, které mohou rozlišovat mezi různými antigenními epitopy a konformacemi, nebo k identifikaci protilátek proti antigenům, které nejsou k dispozici v čisté formě (Alfaleh *et al.*, 2020).



Obr. 5: Během procesu biopanningu dochází nejprve k izolaci fragmentů protilátky z knihoven protilátkových genů. Během inkubace protilátek s imobilizovaným antigen, který je připevněn na pevném nosiči, dochází k selekci protilátek schopných se navázat na antigen za předem definovaných podmínek (teplota, pH, atd.). Protilátkové fágy se slabými vazbami jsou odmyty během intenzivního promývání. Specificky se vážající protilátkové fágy jsou uvolněny z nosiče (trypsinem nebo změnou pH), reamplifikovány infekcí *E. coli*. Cyklus se několikrát opakuje. Poté jsou rozpustné fragmenty monoklonálních protilátek či protilátkových fágů analyzovány ELISA testem pro identifikaci jednotlivých vazebných míst (převzato a upraveno z Schirrmann *et al.*, 2011).

4.2.5 Plazmidová transfekce

Rovněž metoda plazmidové transfekce nabízí možnost produkce vysoce afinitních protilátek. Využívá pro tento účel plazmidy. Ty dokáží replikovat hostitelovu DNA. Plazmidy jsou přítomny v mikroorganismech jako je např. bakterie *E-coli*. Pomocí bioinženýrských metod může být cizí DNA vložena přímo do těchto buněk nebo může být provedena záměna genů přímo ve vláknu plazmidu, které má být exprimováno. Enzymatické procesy během replikace vlákna vedou k tvorbě nového vlákna mRNA, obsahující sledované geny, které byly uměle vloženy. Nejprve je však nutné identifikovat požadované geny (viz Obr. 6). K tomu je zapotřebí nejprve klonování paměťových B lymfocytů. Poté jsou vybrány pouze antigen-specifické klony paměťových buněk. Pro každou z těchto buněk je pomocí reverzní transkripce generována cDNA. Následuje amplifikace cDNA pro lehký a těžký řetězec. Produkty PCR se poté přečistí a sekvenují. Sekvence, které jsou neproduktivní, s předčasnými kodony, nebo u kterých nebylo možné identifikovat odpovídající sekvenci lehkého nebo těžkého řetězce jsou vyloučeny. Dalším krokem je již rekombinace produktů PCR s expresním vektorem. Výsledné plazmidy, které vznikly klonováním, lze využívat pro produkci protilátek. Protilátky jsou v konečné fázi přečišťovány (von Boehmer *et al.*, 2016, Robbiani *et al.*, 2017).



Obr. 6: Schematické znázornění metody plazmidové transfekce. Na schématu je znázorněno již izolovaná sekvence, které je následně vkládána do plazmidu, který tuto informaci nadále exprimuje. Takto lze docílit zvýšení výtěžnosti mAb nebo pozměnit isotyp mAb. Výsledné mAb jsou purifikovány (převzato a upraveno z InvivoGen,2020).

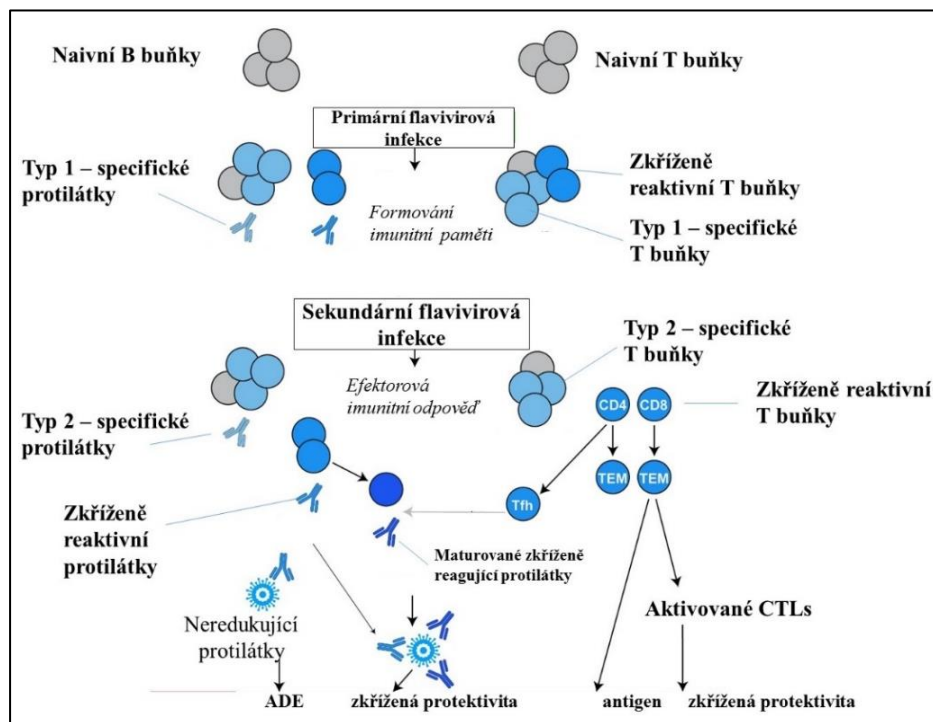
4.3 Rizika imunoterapie

I když terapie pomocí imunoglobulinů vykazuje uspokojivé výsledky u většiny pacientů s KE, objevují se jednotlivé případy, kdy indikace imunoglobulinů naopak zhoršila stav pacienta. Pokud se vedlejší účinky dostaví, jsou většinou mírného rázu (shrnutí na Obr. 7). Taktéž lze tyto příznaky očekávat u pacientů, kteří teprve léčbu zahajují či jsou jim preparáty aplikovány intravenózně ve větších dávkách. Závažnější případy však nastávají, pokud se u pacienta projeví alergická reakce. Ta může přerůst až v anafylaktický šok, který by pro pacienta mohl být fatální.

Typ preparátu	Vedlejší účinky	
	Mírné komplikace	Závažné komplikace
Intravenózní imunoglobuliny	Mírné horečky Gastrointestinální problémy Boleň zad, kloubů, svalů, Boleň hlavy, migrény	Alergické reakce Poškození ledvin Abnormality krevní řady
Subkutánní imunoglobuliny	Lokální boleň v místě vpichu Krvácení Zarudnutí Otoky	Poškození jater Protilátkami zesílená infektivita (ADE)

Obr. 7: Srovnání nežádoucích účinků, které jsou spjaty s aplikací intravenózních a subkutánních imunoglobulinů.

Nejdiskutovanější riziko, které se pojí k aplikaci IVIg preparátů, je fenomén známý jako protilátkami zkřížená reaktivita (ADE) (viz Obr. 8). Takto je označen stav, při kterém protilátky, které vznikly jako odpověď na určitý flavivirus, během primární infekce (vakcinace) při setkání s odlišným flavivirem během sekundární infekce na místo, aby proti virové infekci zakročily, naopak uspíší virovou infekci v těle a průběh nemoci je mnohem závažnější (Rathore *et* St. John, 2020). Protilátky vytvoří během sekundární infekce komplex s virionem, který ale nedokážou dostatečně zneutralizovat. Tvorbou komplexu virus-protilátka dochází k účinnější prezentaci viru buňkám imunitní řady (např. fagocytující buňky). V těchto buňkách následkem neúplné neutralizace viru dochází k jeho pomnožení (Dowd *et* Pierson, 2011, Crowe, Boraschi *et* Rappuoli, 2015).



Obr. 8: Zkřížená imunitní odpověď mezi flaviviry. Infekce či vakcinace proti flaviviru (Typ-1) vede k primární imunitní odpovědi, kdy vznikají specifické protilátky a paměť proti tomuto Typu-1. Infekce příbuzným flavivirem (Typ-2) může nejpravděpodobněji vést k indukci paměti a produkci protilátek. Tato zkřížená odpověď může mít několik vyústění. Jedním z nich je protilátkami zkřížená reaktivita (ADE), kdy sub-neutralizující protilátky způsobí opsonizaci viru (Typ-2), která vede ke zvyšující virové replikaci (převzato a upraveno z Rathore *et St. John*, 2020).

5 Materiál a metody

5.1 Buněčné linie

Pro experimenty byly použity buňky SK-N-SH (ATCC® HTB-11™), buněčná linie derivovaná z lidských neuroblastomových buněk. Tyto buňky byly kultivovány v médiu Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, *Biosera*) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (BOFES, *Biosera*), 1% antibiotik (100µg/ml Streptomycin, 0,25µg/ml Amphotericin B, *Biowest*) a 1% L-glutaminu (GL, *Biosera*) při 37 °C a atmosféře 5 % CO₂. Buněčná kultura byla pasážována při plné konfluenci kultivační lahve pomocí suché trypsinizace (Trypsin EDTA 1X, *Biosera*), objem buněčné suspenze byl rozdělena v poměru 1:3.

Buněčná linie Vero/E6 (ATCC® CRL-1586™). Tato linie byla derivována z epitelálních buněk opičí ledviny. Linie byla kultivována obdobně jako SK-N-SH buňky, v médiu DMEM (*Biosera*) s přidavkem 10% BOFES, 1% antibiotik (100µg/ml Streptomycin, 0,25µg/ml Amphotericin B, *Biowest*) a 1% L-glutaminu (GL, *Biosera*) při 37 °C a atmosféře 5 % CO₂. Pasážování bylo prováděno 2-3krát týdně pomocí suché trypsinizace (Trypsin EDTA 1X, *Biosera*), objem buněčné suspenze byl rozdělen v poměru 1:3 – 1:4 z plně konfluentní kultury.

Savčí buněčná kultura PS (linie odvozená z buněk prasečí ledviny, „porcine pig kidney“), byla kultivována v médiu Leibowitz (L-15, *Biosera*) s přidavkem 3% prekolostrálního telecího séra (*Biosera*), 1% L-glutaminu (GL, *Biosera*) a 1% antibiotik (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, *Biowest*) (Hönig *et al.*, 2019). Při plné konfluenci lahve byla kultura pasážována pomocí suché trypsinizace (Trypsin EDTA, *Biosera*), objem buněčné suspenze byl rozdělen v poměru 1:3 při plné konfluenci kultury.

Pro kultivaci BHK-21 (fibroblasty ledvin křečka zlatého) bylo použito Minimum Essential Medium (MEM, *Biosera*) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra, 1% L-glutaminu a 1% antibiotik (100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, *Biowest*) (Haviernik *et al.*, 2021).

Buněčná linie C6/36 derivovaná z larev komára tygrovaného byla kultivována v médiu Leibowitz (L-15, *Biosera*) s 10% fetálního bovinního séra (BOFES, *Biosera*), 5% tryptofosfátovým bujónem (*Sigma-Aldrich*), 1% L-glutamine (GL, *Biosera*), 1% antibiotik (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, *Biowest*) při 28 °C (Hönig *et al.*, 2019).

5.2 Virus

K infekci lidských neuroblastomových buněk byly zvoleny následující kmeny viru KE. Kmen Hypr (VKE), český prototypový kmen izolovaný v roce 1953 na území České republiky. Zásobní virová suspenze byla udržována při -70°C a pomnožena v mozcích sajících myší. Pro infekci buněk byla použita 8. pasáž viru (Růžek *et al.*, 2008a). Dále byl použit replikačně kompetentní kmen TBEV, který kóduje reportérový gen mCherry. Reportérový gen mCherry je monomerní fluorescenční protein odvozený od *Discosoma sp.* (Shaner *et al.*, 2004). Kmen mCherry-TBEV slouží jako kvantitativní nástroj pro usnadnění identifikace potenciálních antivirových látek a pro měření hladin neutralizujících protilátek specifických pro VKE v humánních a zvířecích sérech (Haviernik *et al.*, 2021). Tento rekombinantní kmen mCherryHypr byl pomnožen na BHK-21 a virová suspenze byla rovněž uchována při -70°C . V experimentu byla použita první pasáž viru.

Kmen Neudoerfl je evropským prototypovým kmenem VKE. V experimentu byla použita 4. mozková pasáž viru. Virus byl taktéž uchováván při teplotě -70°C .

Dále byl pro experiment vybrán virus Langat, kmen TP21. Virus Langat není přímo spojován s nákazou u člověka, nicméně přítomnost specifických protilátek byla prokázána u lidí žijících v místě výskytu viru. Kmen TP21 je přirozeně oslabený a indukuje neutralizující protilátky proti VKE a ochranu proti dalším virům komplexu TBEV u zvířat (Rumyantsev, Murphy *et Pletnev*, 2006). Virus byl pomnožen na Vero/E6 a používána neznámá pasáž viru.

Příbuzným výše zmíněnému viru Langat je virus vrtivky, který je patogenní pro zvířata. Rovněž je blízce příbuzný evropského subtypu KE. Vyskytuje se především mezi hospodářskou a vysokou zvěří (ovce, skot, jeleni) (Jeffries *et al.*, 2014). V experimentu byla použita 2. buněčná pasáž viru (kmen LI/31), která byla pomnožena na buněčné kultuře PS.

Z virů přenášených komáry byl zvolen kmen 2020TM10 viru Usutu. Tento africký flavivirus způsobuje onemocnění zejména ptáků, ale může představovat potenciální riziko i pro člověka (Vazquez *et al.*, 2011). Virus byl namnožen na Vero/E6 buněčné kultuře. Použita byla první pasáž viru.

Virus horečky západního Nilu byl poprvé izolován z pacienta v roce 1937 v oblasti severní Ugandy. Z oblasti prvního výskytu od toho roku došlo k výraznému rozšíření do okolních částí světa, nevyjímaje evropské země (Sejvar, 2003).

Kmen viru Eg101 o neznámé pasáži byl pomnožen na buněčné kultuře Vero/E6, zásobní virová suspenze byla uchovávána při -70 °C. Stejně jako virus horečky západního Nilu byl i virus Zika poprvé objeven na území Ugandy (Dick, 1952). Nejprve byl prokázán v krvi opic a o několik let později i v krvi lidí. Virus Zika kmen Uganda UG/MR766 (neznámá pasáž viru) byl rovněž pomnožen na Vero/E6 buněčné kultuře (Stefanik *et al.*, 2018).

5.3 Monoklonální protilátky

Pomocí hybridomové technologie vznikly hybridomy, z nichž následnou selekcí vůči kmenu KE Neudoerfl byly vybrány tři klony hybridomových buněk schopných produkovat požadované protilátky (5F4/A6, 5F4/C7 a 9B11/F10). Hybridomy byly kultivovány v médiu DMEM s přidávkem 10% fetálního bovinního séra (BOFES, *Biosera*), 1 % antibiotik a antimykotik (100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B, *Biowest*) a 1% L-glutaminu (*Biosera*).

Médium s obsahem protilátek bylo vždy odebíráno během pasáže hybridomů (2-3x týdně). Z kultivační lahve byl odebrán celý objem média. Poté bylo médium stočeno v předem vychlazené centrifuze při 4 °C při 1200 RCF po 10 minut. Supernatant bez zbylých buněčných elementů byl přenesen do nové zkumavky a uchováván při teplotě - 20 °C.

5.4 Chemikálie

16% roztok formaldehydu (*Thermo Fisher Scientific, Inc*)

4% paraformaldehyd – 3 ml 16% roztoku formaldehydu smíchány s 1 ml 1× PBS

10× PBS (*Biosera*)

1× PBS – 50 ml 10× PBS doplněno dH₂O do 500 ml celkového objemu

1× TWEEN 20 (*Sigma-Aldrich*)

Triton™ X-100 (*Sigma-Aldrich*)

5.5 Nepřímá imunofluorescence

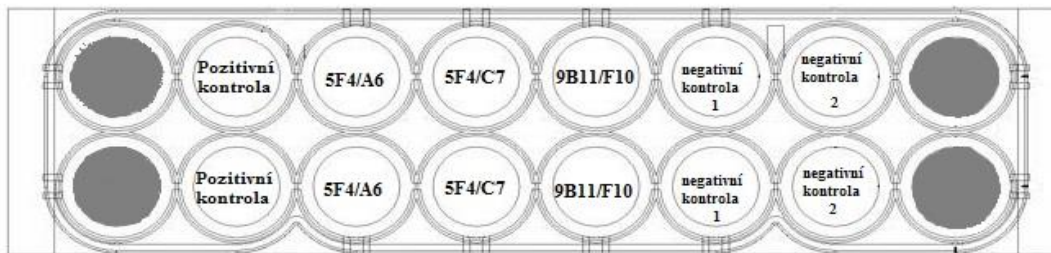
Získané monoklonální protilátky byly otestovány pomocí metody nepřímé imunofluorescence. Nepřímá imunofluorescence je založena na principu značení primární protilátky sekundární protilátkou, která nese fluorescenční sondu. Pro všechny flaviviry bylo dodrženo stejné schéma experimentu (viz Obr. 9).

Buňky SK-N-SH byly nasazeny na mikroskopická sklíčka (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*) s odnímatelnými komůrkami v množství $2 \cdot 10^4$ buněk na jamku, přičemž objem buněčné suspenze činil 150 μ l. Před samotným nasazením buněčné suspenze byly jamky vymyty kultivačním médiem. Inkubace buněk v jamkách trvala 12 hodin. Druhý den po nasazení byly buňky infikovány 0,1 MOI (z angl. „multiplicity of infection“) virem. Virus byl ředěn v médiu v kompletním kultivačním médiu do výsledného objemu 50 μ l/jamka. Buňky byly spolu s virem inkubovány při 37 °C s přidavkem CO₂ po 3 dny.

5.5.1 Imunofluorescenční barvení

Tři dny po infekci bylo přebytečné médium s volným virem odpipetováno a buňky byly fixovány v roztoku 4% paraformaldehydu po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Posléze byly buňky promyty roztokem 1 \times PBS – 0,05 % TWEEN 3 x 5 minut. Po promytí byl přidán 0,3% Triton X–100 (*Sigma-Aldrich*), který posloužil k permeabilizaci buněčných membrán. Triton účinkoval v jamkách 30 minut a poté byly buňky opět třikrát promyty 1 \times PBS – 0,05 % TWEEN . Pro blokaci nespecifických vazebných míst byl použit roztok PBS s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (BOFES, *Biosera*) a 5% kozího séra (*Biowest*). Blokace probíhala 30 minut při laboratorní teplotě, poté byla do jamek přidána primární protilátka.

Jako primární protilátky sloužily vybrané monoklonální protilátky (5F4/A6, 5F4/C6, 9B11/F10) a komerčně dostupná myší monoklonální protilátka namířena proti flavivirové antigenní skupině (MAB10216, *Sigma-Aldrich*). Primární protilátka (50 μ l/jamka) MAB10216 byla ředěna 1:250 v 1 \times PBS s 0,05% TWEEN 20, testovaných monoklonálních protilátek byl použit taktéž objem 50 μ l na jamku v neředěné formě. Buňky byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C.



Obr. 9: Rozložení mikroskopického sklíčka. Protilátky vždy použity v duplikaci (pozitivní kontrola – MAB10216, negativní kontrola 1 – čistá buněčná suspenze, negativní kontrola 2 – buněčná suspenze + sekundární Ab).

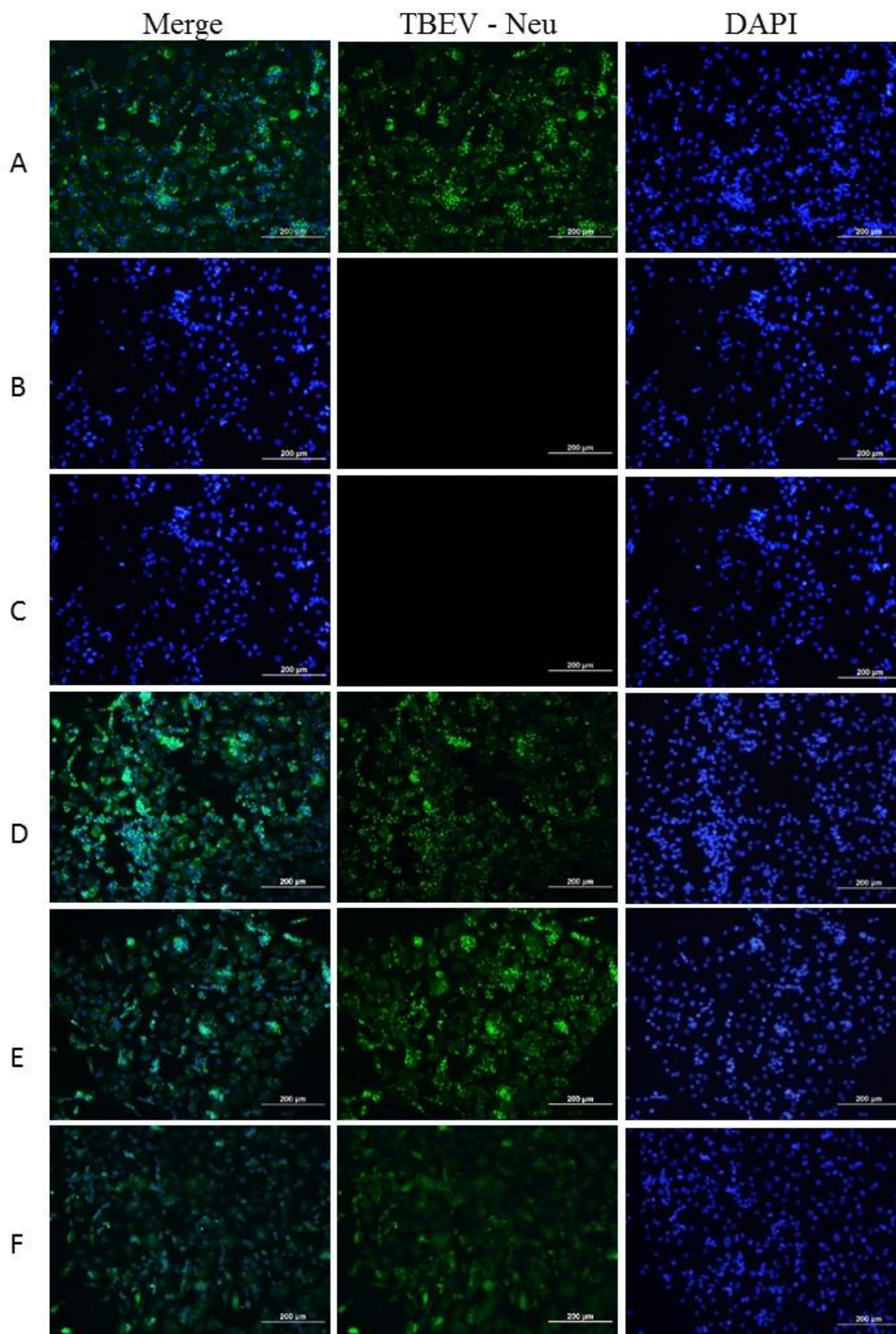
Po 12 hodinách byly buňky třikrát promyty roztokem $1\times$ PBS s 0,05% TWEEN 20 pro odmytí nenavázaných primárních protilátek. Po promytí byla přidána sekundární protilátka. Za sekundární protilátku (2Ab) byla zvolena koží protilátka proti myšímú antigenu značená Alexa fluor 488 (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*), která byla ředěna v $1\times$ PBS s 0,05% TWEEN 20 1:500. Následovala inkubace po dobu 1 hodiny v přítmí při 37°C . Poté byl preparát třikrát promyt v $1\times$ PBS s 0,05% TWEEN 20. Negativní kontrola 2 obsahující buněčnou suspenzi a přidanou sekundární protilátkou sloužila k vyloučení nespecifické vazby protilátky. Pro zakonzervování vzorku bylo použito montovací médium obsahující DAPI fluoroshield (*Sigma-Aldrich*) a hrany sklíčka zakryty lakem na nehty (předcházení vysychání preparátu). Zhotovené preparáty byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60 při stonásobném zvětšení. Pro bližší pozorování změn morfologie kultury byly preparáty zvětšeny 400x (viz Obr. 13).

6 Výsledky

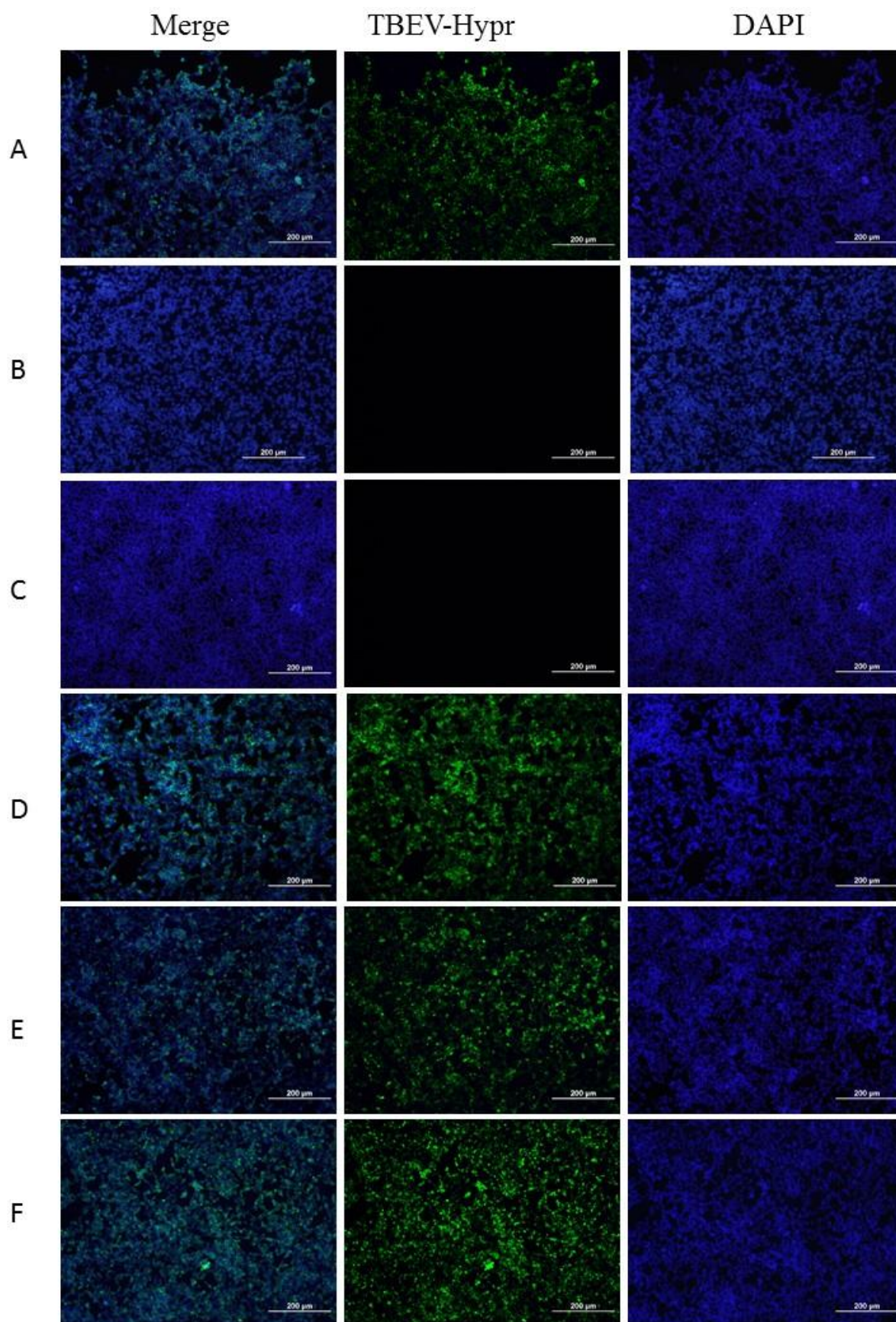
Kultivací hybridomových buněk byly získány monoklonální protilátky. U monoklonálních protilátek byla sledována jejich schopnost rozpoznávat nestrukturní protein NS1 pomocí metody nepřímé imunofluorescence. Případný signál byl porovnán s pozitivní kontrolou, ve které byla použita komerční protilátka MAB10216 vázající se na virový strukturní glykoprotein E a negativní kontrolou tvořenou pouze buněčnou suspenzí bez viru.

Pro viry ze serokomplexu virů přenášených klíšťaty byla potvrzena specifická vazba monoklonální protilátky 5F4/A6 a 5F4/C7. V případě protilátky 9B11/F10 se výsledky lišily. Zatímco u kmenu VKE Neudoerfl signál není jednoznačně prokazatelný (viz Obr. 10), u kmenu Hypr VKE je signál srovnatelný s pozitivní kontrolou (viz Obr. 11). Použití sekundární protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC, Alexa flour 488) ukázala expresi mCherry uvnitř jader u kmenu mCherryHypr-TBEV (viz Obr. 14), rovněž byly pozorovány vazby mAb protilátek na nestrukturní protein NS1.

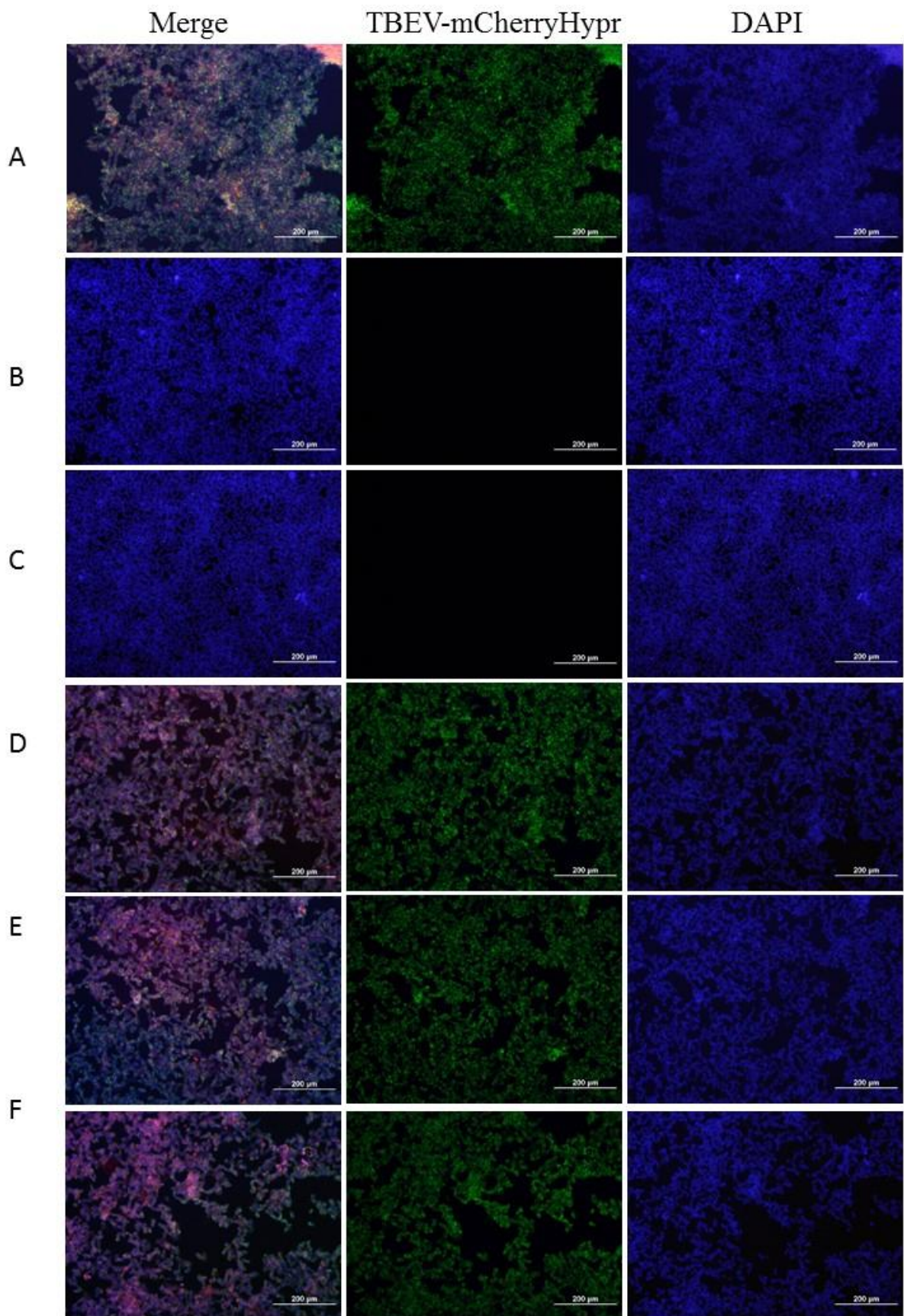
Jednoznačné výsledky byly získány pomocí nepřímé imunofluorescence u flavivirů přenášených bodavým hmyzem (viz Obr. 17 – 19). Ve všech případech monoklonální protilátky nevytvářely vazbu s NS1 proteinem.



Obr. 10: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných VKE kmene Neudoerfl: (A) pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) (B) negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, (C) negativní kontrola buněčné suspenze s přidáním sekundární Ab (D) protilátka 5F4/A6 (E) protilátka 5F4/C7 (F) protilátka 9B11/F10.

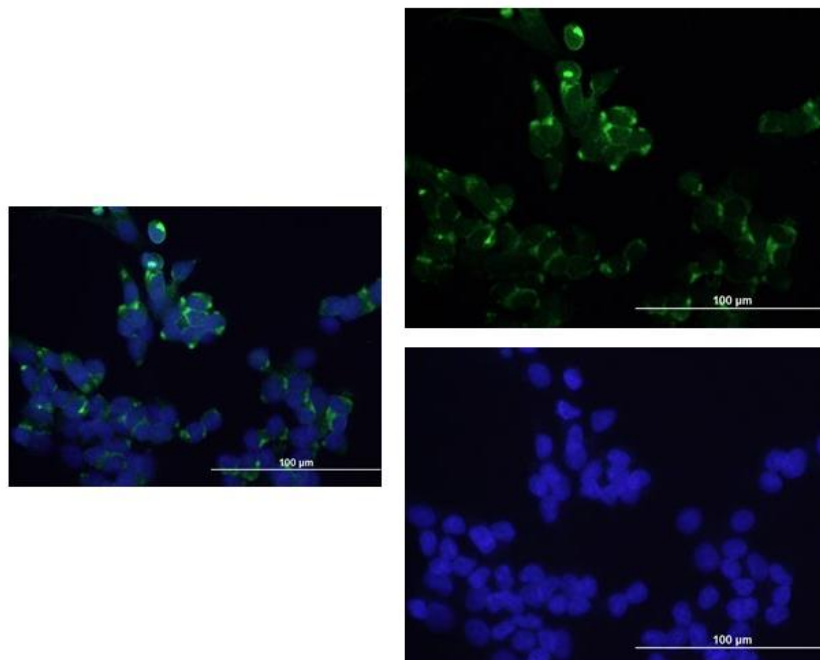


Obr. 11.: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných VKE kmene Hypr: (A) pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) (B) negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, (C) negativní kontrola buněčné suspenze s přidanou sekundární Ab (D) protilátka 5F4/A6 (E) protilátka 5F4/C7 (F) protilátka 9B11/F10.

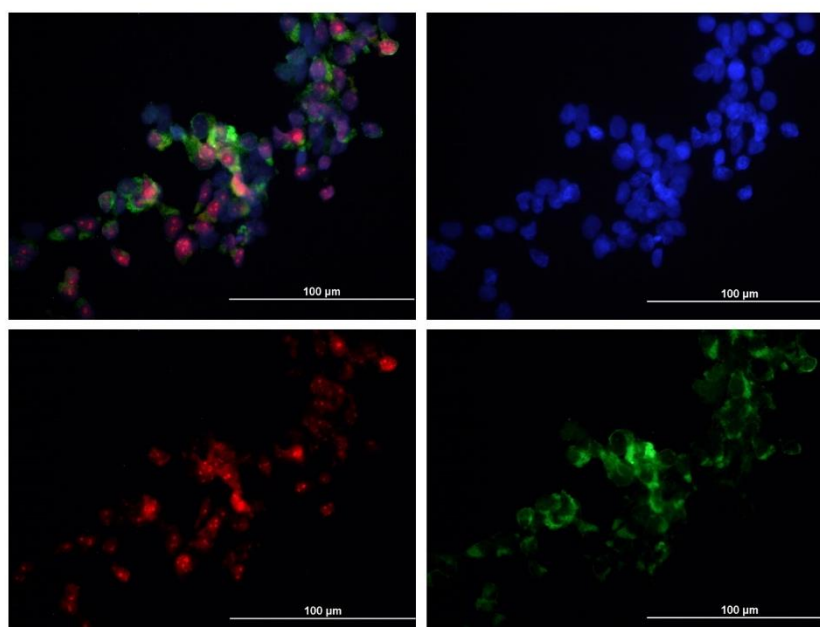


Obr. 12.: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných VKE kmene mCherryHypr: (A) pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) (B) negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, (C) negativní kontrola buněčné suspenze s přidanou sekundární Ab (D) protilátka 5F4/A6 (E) protilátka 5F4/C7 (F) protilátka 9B11/F10, mCherry protein (červená barva) lze vidět ve složených fotkách.

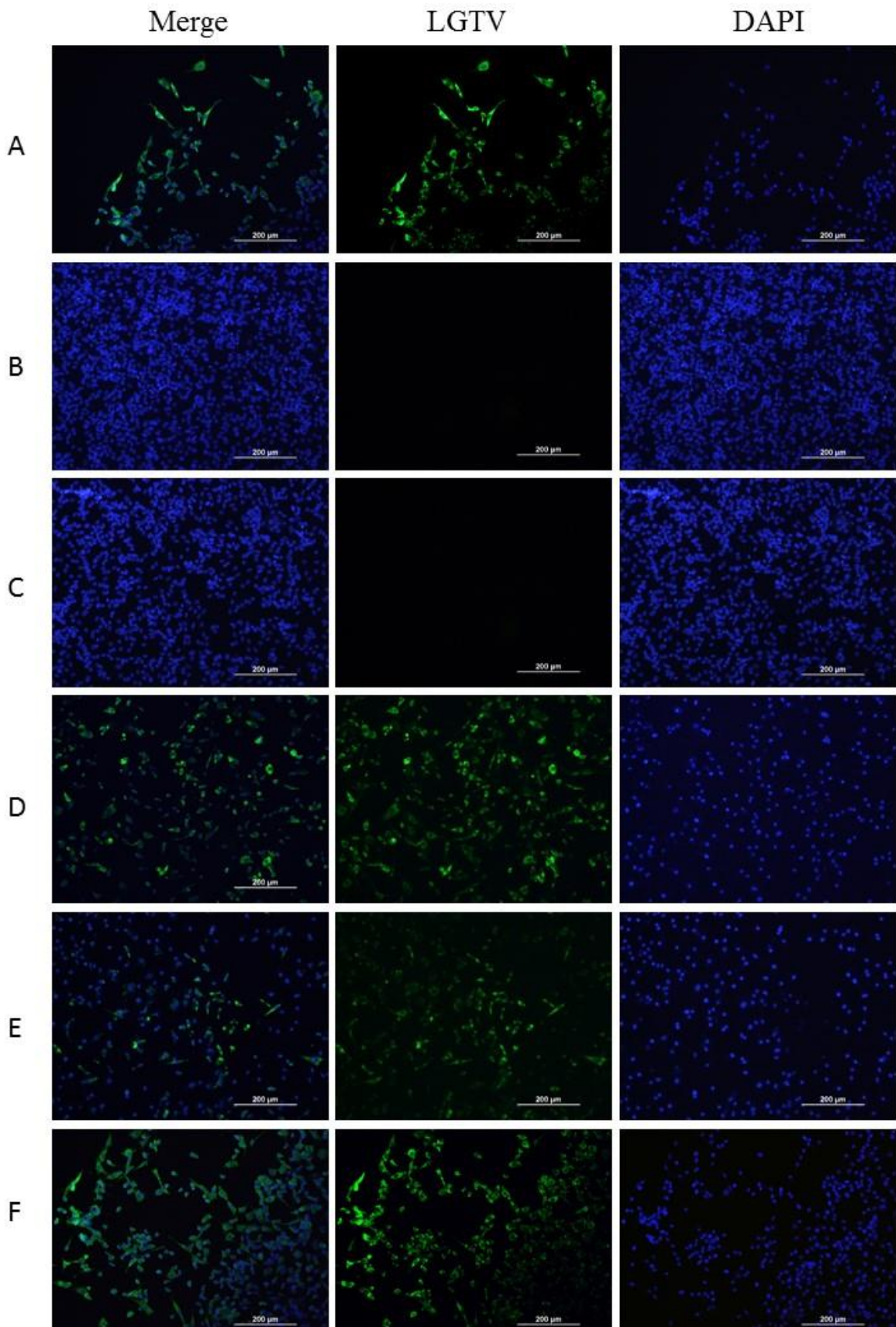
V experimentech s kmenem Hypr byla kromě silného signálu pozorována i morfologická změna buněčné kultury. V našem případě byla u SK-N-SH buněk pozorována výrazná redukce neuritů (viz Obr. 11). Na obrázku č. 13 jsou rovněž patrna místa distribuce proteinu NS1.



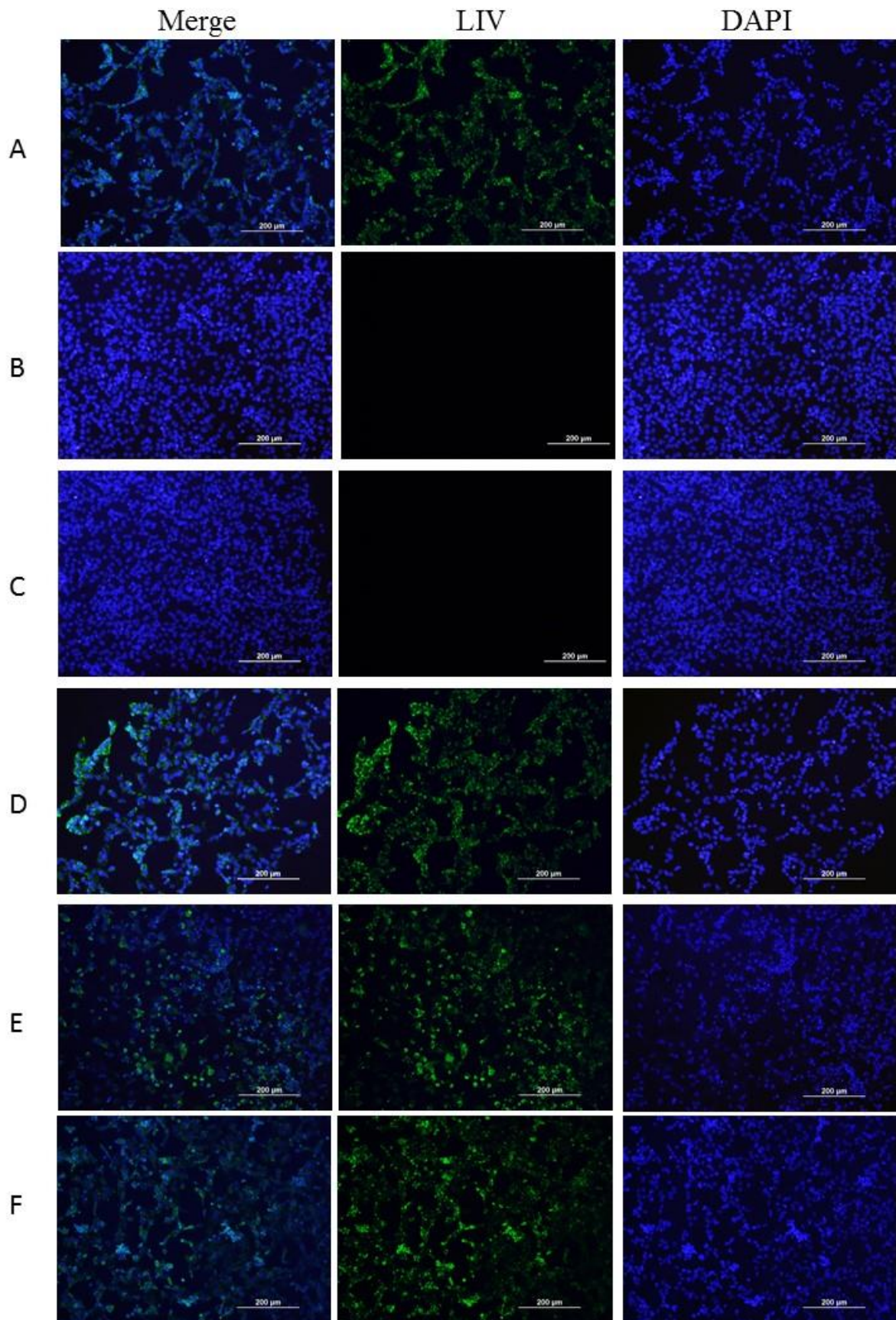
Obr. 13: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných VKE kmene Hypr při zvětšení 400x. Patrné jsou morfologické změny buněk SK-N-SH.



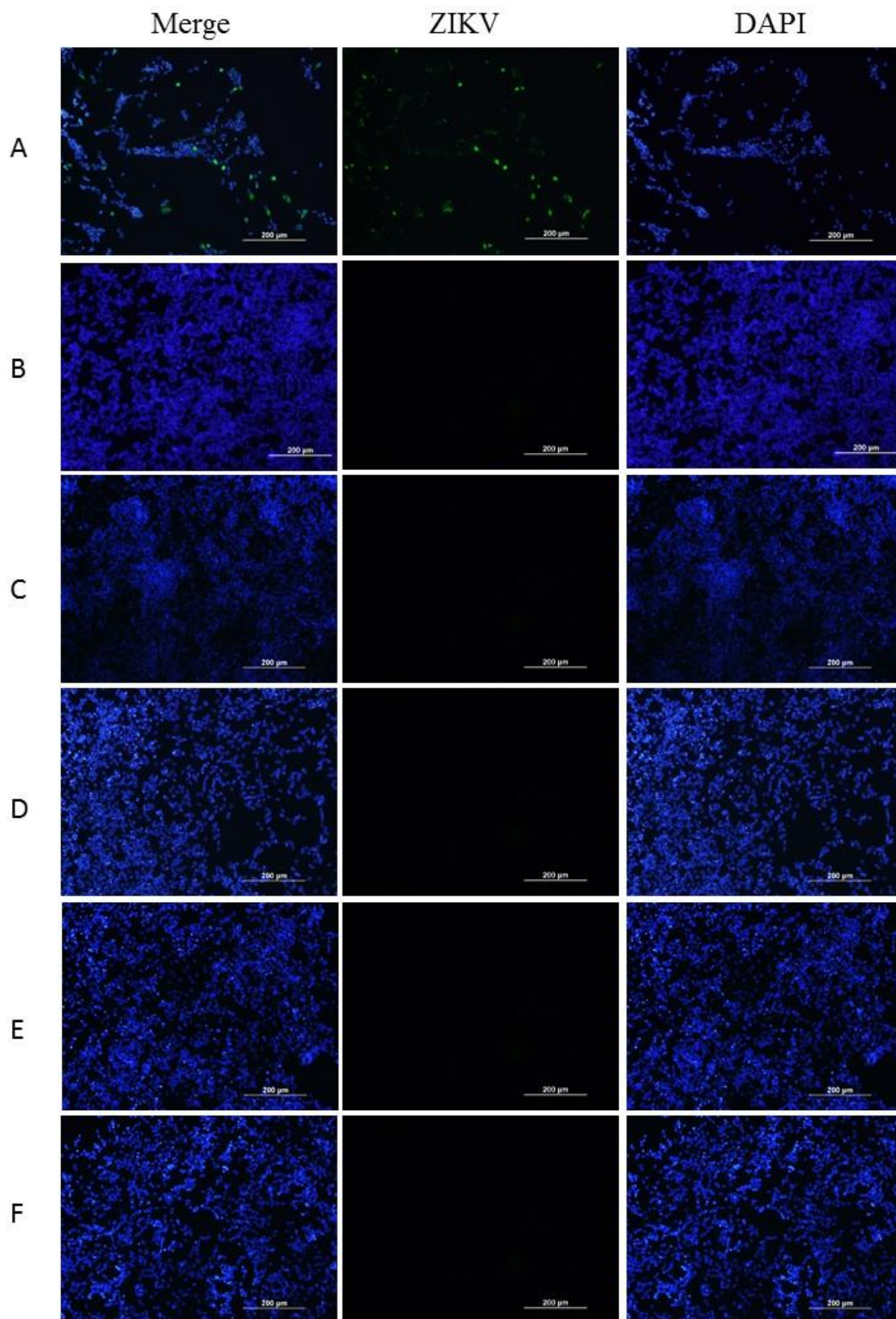
Obr. 14: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných VKE kmene mCherryHypr při zvětšení 400x. Rovněž lze na snímku pozorovat reportérový gen mCherry (červená barva). Taktéž lze pozorovat protilátky (anti-NS1) (zelená barva).



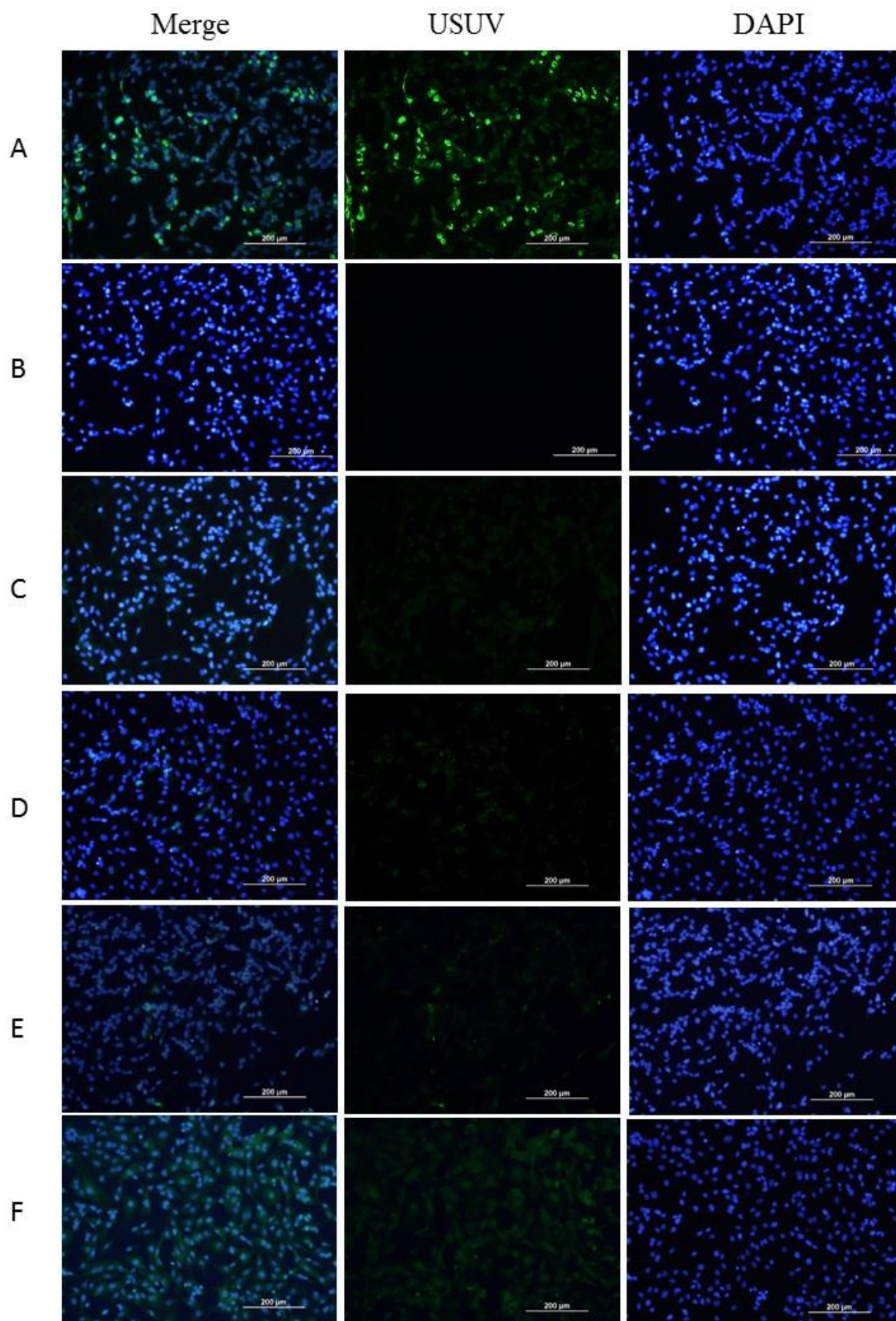
Obr. 15: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných virem Langat (LGTV): (A) pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) (B) negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, (C) negativní kontrola buněčné suspenze s přidanou sekundární Ab (D) protilátka 5F4/A6 (E) protilátka 5F4/C7 (F) protilátka 9B11/F10.



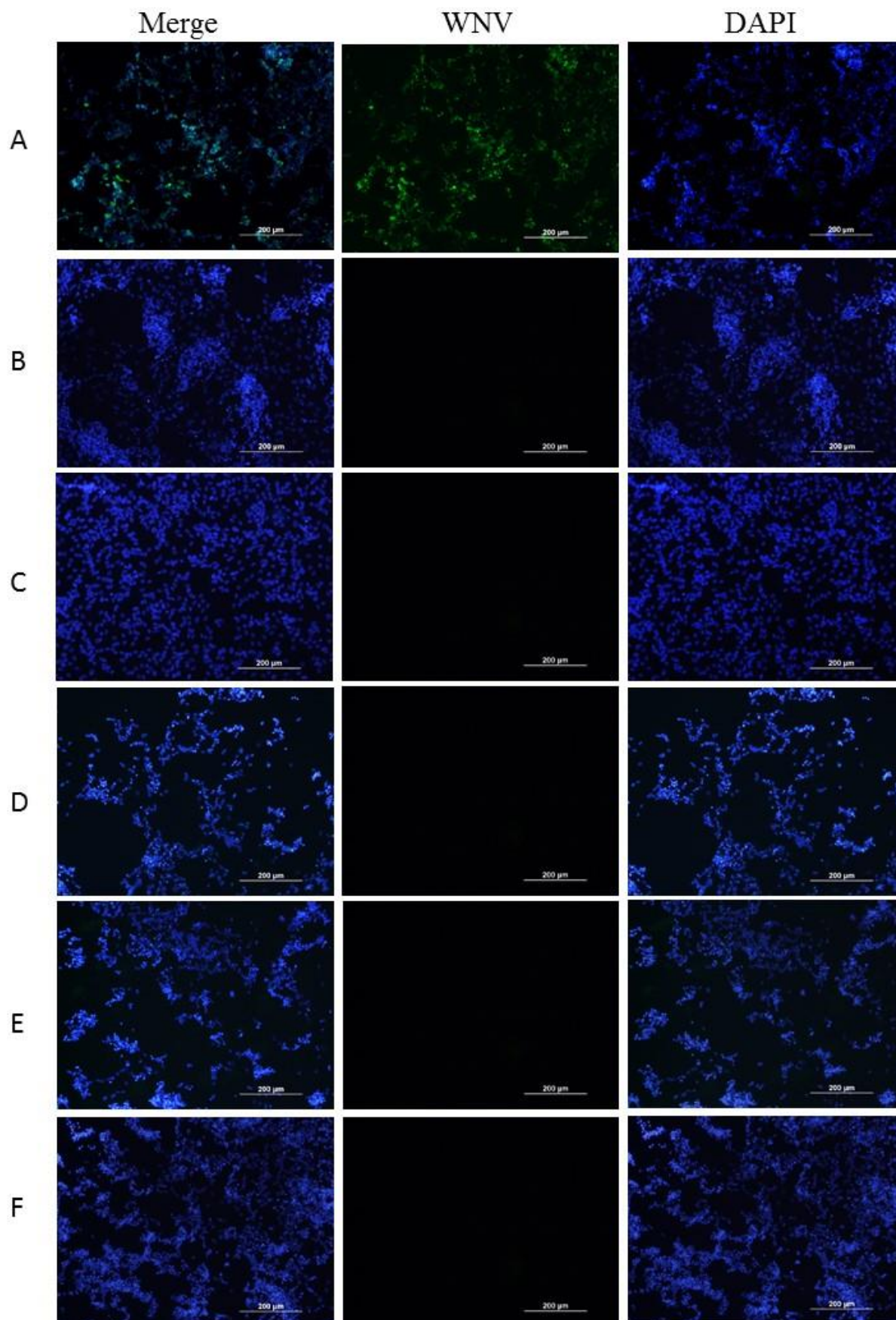
Obr. 16: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných virem vrtivky (LIV): (A) pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) (B) negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, (C) negativní kontrola buněčné suspenze s přidáním sekundární Ab (D) protilátka 5F4/A6 (E) protilátka 5F4/C7 (F) protilátka 9B11/F10.



Obr. 17: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných virem Zika: **(A)** pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) **(B)** negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, **(C)** negativní kontrola buněčné suspenze s přidáním sekundární Ab **(D)** protilátka 5F4/A6 **(E)** protilátka 5F4/C7 **(F)** protilátka 9B11/F10.



Obr. 18: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných virem Usutu: (A) pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) (B) negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, (C) negativní kontrola buněčné suspenze s přidáním sekundární Ab (D) protilátka 5F4/A6 (E) protilátka 5F4/C7 (F) protilátka 9B11/F10.



Obr. 19: Imunofluorescenční značení buněk SK-N-SH infikovaných virem WNV: **(A)** pozitivní kontrola obsahuje anti-flavivirovou protilátku MAB10216 (zeleně) **(B)** negativní kontrola tvořená pouze buněčnou suspenzí (modře), ke které bylo přidáno čisté kultivační médium, **(C)** negativní kontrola buněčné suspenze s přidáním sekundární Ab **(D)** protilátka 5F4/A6 **(E)** protilátka 5F4/C7 **(F)** protilátka 9B11/F10.

7 Diskuze

Klíšťová encefalitida je velmi závažné zánětlivé onemocnění virového původu. Původcem tohoto onemocnění je virus klíšťové encefalitidy patřící do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*. Mezi klíšťaty přenášené flaviviry je řazen kromě viru klíšťové encefalitidy, virus Omské horečky, virus Powassan, virus Langat a virus vrtivky. Virus Zika, virus horečky západního Nilu a virus Usutu se řadí mezi viry, jejichž vektorem jsou komáři (Plotkin, Orenstein *et Offit*, 2013). Všechny tyto viry způsobují obdobný průběh nemoci projevující se zánětlivými procesy v CNS. Původce onemocnění lze prokázat pomocí serologických a molekulárně-biologických testů, ale léčba onemocnění už tak jednoznačná není. Pro pacienty se známými mírnějšími formami onemocnění je volena terapie pomocí protizánětlivých léků (např. aspirin, kortikosteroidy) (Růžek *et al.*, 2015). Pacientům s těžkými formami KE, je doporučována imunoterapie, která se především na území Evropské unie zakládá na podávání preparátů obsahujících nespecifické imunoglobuliny (známé jako IVIg) (Lindquist, 2014).

IVIg preparáty nespecificky ovlivňují průběh nemoci. Tyto preparáty obsahují velké množství imunoglobulinů, které jsou získávány od zdravých dárců. Největší podíl zde představují IgG protilátky, poté v menší míře jsou zastoupeny IgA a IgM. Četnost jednotlivých imunoglobulinů se liší dle výrobce. Účinek tohoto preparátu je především imunomodulační (Shaz, Hillyer *et Gil*, 2019). Odlišnou možností terapie představuje podávání specifického imunoglobulinu, čehož využívají lékaři na území Ruské federace. Specifický imunoglobulin je zde získáván od dárců, jejichž séra již obsahují protilátky vůči flavivirům. Tato cesta terapie se jeví jako účinnější, ale pojí se s ní vážná rizika. Vedlejším účinkem preparátů by totiž mohla být i protilátkami zesílená infektivita, která by zapříčinila snadnější průběh onemocnění oproti tomu, aby pacienta chránila (Růžek, Dobler *et Niller*, 2013). Některé šarže IVIg však mohou obsahovat i specifické protilátky. Tyto šarže jsou schopné VKE i neutralizovat a účinkovat tedy stejně jako při cílené terapii specifickými protilátkami, nicméně stejně tak se na podání těchto šarží IVIg vztahují i rizika spojená s podáním specifických protilátek (Elsterova *et al.*, 2017).

Jelikož jsou si flaviviry fylogeneticky i strukturně velmi podobné, jeví se zkřížená reaktivita protilátek jako zvýhodňující faktor pro pacienty. Díky zvířecím modelům je známo, že lze imunizací proti určitému flaviviru docílit tvorby zkříženě reagujících protilátek, které následně daného jedince chrání před letální infekcí. Případy zkřížené

ochrany byly pozorovány u myši imunizovaných virem Usutu a následně infikovaných virem horečky západního Nilu (Blázquez *et al.*, 2015). Rovněž vakcinace vůči viru japonské encefalitidy poskytla ochranu proti viru Dengue skrze produkci zkříženě reagujících virus neutralizačních protilátek (Rathore *et St. John*, 2020).

Odlišné schéma však představuje protilátkami zesílená reaktivita, ke které by mohlo dojít díky preexistujícím protilátkám. Pokud by totiž byly v organismu přítomny protilátky vůči flaviviru, buďto vlivem primární infekce, nebo následkem vakcinace, a následně by došlo k sekundární infekci odlišným flavivirem, napomohly by protilátky sekundární infekci snadněji překovat imunitní odpověď, což by mohlo mít pro pacienta fatální následky (St. John *et Rathore*, 2019). Případy vzniku ADE byly popsány mezi viry Zika a Dengue, které jsou přenášeny komáry (Hosseini, 2020).

Protilátky přítomné v organismu nejsou schopny rozpoznat rozdíly mezi těmito flaviviry. Rozpoznávají glykoprotein E, který tvoří jejich obal a je největším strukturním proteinem. Možným způsobem, jak předejít vzniku ADE, by proto mohlo být zacílení protilátek na nestrukturní protein NS1 (Füzik *et al.*, 2018). Protilátky proti nestrukturnímu proteinu se z principu nemohou podílet na ADE. Již dříve byla prokázána určitá diverzita v NS1 proteinu mezi flaviviry (Hilgenfeld, 2016). Díky tomuto je NS1 protein využíván jako diagnostický marker a rovněž je mu věnována velká pozornost v oblastech vývoje vakcín (Hilgenfeld, 2016). Mohl by však posloužit přímo jako terapeutikum. Monoklonální protilátky, které by byly namířeny vůči specifickému nestrukturnímu proteinu NS1, by zaručovaly předcházení vzniku ADE a rovněž snižovaly vedlejší účinky, jako jsou např. alergické reakce.

I přesto, že je protein NS1 potenciálně užitečným nástrojem i v diagnostice, jeho úloha při virové infekci je popsána pouze okrajově. Z dosavadních studií je známo, že NS1 protein je přítomen v několika oligomerních formách. Jako dimer se objevuje především v endoplasmatickém retikulu, ale tuto formu lze nalézt i v plazmatických membránách infikovaných buněk. Sekretovaná NS1 je ve formě hexameru, ten se ale může rozpadat na trimery či dimery (Gutsche *et al.*, 2011). Vzhledem k blízké příbuznosti mezi flaviviry a několika možným formám NS1, není překvapující, že v případě viru Zika, viru Dengue a viru horečky západního Nilu byla potvrzena shoda u dimerní formy NS1 (přednostně se vyskytující v plazmatické membráně) na více než 50 % shodu aminokyselinové sekvence (Akey *et al.*, 2014).

Nicméně, v našich experimentech, kde byly použity monoklonální protilátky, které byly selektovány vůči kmenu Neudoerfl (virus klíšťové encefalitidy), se ukázalo, že tyto protilátky jsou z testovaných flavivirů schopny vazby pouze na nestrukturní protein NS1 flavivirů přenášených klíšťaty, jež jsou si mezi sebou velmi blízce příbuzné.

Z výsledků je patrné, že mAb byly schopné snadno rozpoznat NS1 přítomný v buněčné membráně u přirozeně oslabeného viru Langat, který je schopen indukovat protilátkovou odpověď. Dále tak dalšího flaviviru divoké zvěře, viru vrtivky. U obou těchto virů byl pozorován silný signál v případě monoklonálních protilátek. Obdobné výsledky byly pozorovány i pro kmeny klíšťové encefalitidy, Neudoerfl a Hypr. Zopakování nepřímé imunofluorescence pro kmen Neudoerfl potvrdilo specifitu vytvořených protilátek, které vůči němu byly selektovány.

Specifita protilátek se prokázala nejenom v případech přirozeně se vyskytujících kmenů VKE, ale byla prokázána i pro kmen VKE Hypr, nesoucí reportérový gen pro mCherry (mCherryHypr). Protože kontrolní protilátka proti flavivirovému glykoproteinu E byla myší stejně jako námi testované protilátky proti NS1 proteinu, byl tento kmen použit k potvrzení lokalizaci anti-NS1 značení v mCherryHypr infikovaných buňkách. Zatímco u kmenu VKE Neudoerfl byl zachycen pouze slabý signál v případě mAb 9B11/F10 (viz Obr. 10), u kmenů VKE Hypr (Obr. 11) a mCherryHypr (Obr. 12) byl signál srovnatelný s pozitivní kontrolou, kterou tvořila anti-flavivirová primární protilátka namířena vůči obalovému glykoproteinu E. Slabý signál 9B11/F10 však mohl být zapříčiněn nízkou koncentrací protilátek v použitém médiu. Koncentrace protilátek nebyla ve vzorcích přesně stanovována. V následných experimentech s viry přenášenými klíšťaty byl signál 9B11/F10 již jednoznačně prokazatelný.

Naopak protilátky nerozpoznávaly NS1 protein viru Zika a dalších flavivirů (Obr. 17-19), jejichž vektory je bodavý hmyz. Tato skutečnost poukazuje na již dříve zmíněné poznatky o diverzitě nestrukturního proteinu NS1 v rámci rodu *Flavivirus*.

Na základě provedených experimentů a literárních zdrojů lze usuzovat, že využívání monoklonálních protilátek nabízí řešení, jak účinně rozlišit jednotlivé flavivirových infekce. Přesto však není stále zcela jasné, které formy NS1 proteinu byly použité protilátky schopny detekovat. Toto by mohlo být předmětem dalšího výzkumu pro objasnění distribuce a lokalizace NS1 proteinu, která nebyla prozatím plně objasněna.

8 Závěr

- ❖ Kultivací hybridomů byla získána média obsahující monoklonální protilátky. Ta byla používána přečištěná v neředěné formě v experimentech nepřímé imunofluorescence.
- ❖ Protilátky prokázaly viditelný účinek vazby na NS1 protein u flavivirů, které jsou přenášeny klíšťaty. Naopak vazba anti-NS1 protilátek nebyla pozorována u flavivirů, jejichž vektorem jsou komáři.

9 Seznam použité literatury

- A. Glukhova, X. et al. (2016)** ‘Updates on the Production of Therapeutic Antibodies Using Human Hybridoma Technique’, *Current Pharmaceutical Design*, 22(7), pp. 870–878. doi: 10.2174/1381612822666151223102845.
- Abbas, A. K. et al. (2015)** *Cellular and molecular immunology*. 8. ed., internat. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders.
- Akey, D. L. et al. (2014)** ‘Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system.’, *Science (New York, N.Y.)*, 343(6173), pp. 881–885. doi: 10.1126/science.1247749.
- Albinsson, B. et al. (2020)** ‘Multi-laboratory evaluation of ReaScan TBE IgM rapid test, 2016 to 2017’, *Eurosurveillance*, 25(12). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.12.1900427.
- Alcalá, A. C. et al. (2016)** ‘The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted efficiently from infected mosquito cells’, *Virology*, 488, p. 278–287. doi: 10.1016/j.virol.2015.11.020.
- Alfaleh, M. A. et al. (2020)** ‘Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside’, *Frontiers in Immunology*, 11, p. 1986. doi: 10.3389/fimmu.2020.01986.
- Barahona Afonso, A. F. et João, C. M. P. (2016)** ‘The Production Processes and Biological Effects of Intravenous Immunoglobulin’, *Biomolecules*, 6(1), p. 15. doi: 10.3390/biom6010015.
- Best, S. M. (2017)** ‘The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling’, *Journal of Virology*, 91(3). doi: 10.1128/JVI.01970-16.
- Blázquez, A.-B. et al. (2015)** ‘Limited susceptibility of mice to Usutu virus (USUV) infection and induction of flavivirus cross-protective immunity’, *Virology*, 482, pp. 67–71. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.020.
- Brekke, O. H. et Sandlie, I. (2003)** ‘Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century’, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(1), pp. 52–62. doi: 10.1038/nrd984.
- Cervantes-Salazar, M. et al. (2015)** ‘Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells’, *Virology*, 484, pp. 113–126. doi: 10.1016/j.virol.2015.05.017.
- Crooks, A. J. et al. (1994)** ‘The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell’, *Journal of General Virology*, Microbiology Society,.

- Crowe, Boraschi et Rappuoli (eds) (2015)** ‘Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns’, in *Antibodies for Infectious Diseases*. American Society of Microbiology, pp. 249–271. doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
- Diosa-Toro, M. et al. (2020)** ‘Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle’, *Virology Journal*, 17(1), p. 60. doi: 10.1186/s12985-020-01329-7.
- Elsterova, J. et al. (2017)** ‘Tick-borne encephalitis virus neutralization by high dose intravenous immunoglobulin’, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(2), pp. 253–258. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.11.007.
- Dowd, K. A. et Pierson, T. C. (2011)** ‘Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: A reductionist view’, *Virology*, 411(2), pp. 306–315. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.020.
- Falgout, B. et al. (1991)** ‘Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins.’, *Journal of Virology*, 65(5), p. 2467.
- Füzik, T. et al. (2018)** ‘Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody’, *Nature Communications*, 9(1), p. 436. doi: 10.1038/s41467-018-02882-0.
- Ganten, D. et Ruckpaul, K. (2006)** *Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine Vol. 2, Vol. 2,*. Berlin: Springer.
- Girl, P. et al. (2020)** ‘Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses’, *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by Y.-W. Tang, 58(4), pp. e01783-19, /jcm/58/4/JCM.01783-19.atom. doi: 10.1128/JCM.01783-19.
- Göpfertová, D. et al. (2006)** *Epidemiologie: (obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí)*. Praha: Karolinum.
- Gorny, M. K. et al. (1993)** ‘Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120.’, *The Journal of Immunology*, 150(2), p. 635.
- Griffiths, A. D. et al. (1994)** ‘Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires.’, *The EMBO journal*, 13(14), pp. 3245–3260.
- Gritsun, T. et al. (2003)** ‘Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis’, *Journal of virology*, 77(1). doi: 10.1128/JVI.77.1.25-36.2003.
- Gura, T. (2002)** ‘Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target’, *Nature*, 417(6889), pp. 584–586. doi: 10.1038/417584a.

- Gutsche, I. et al. (2011)** ‘Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), pp. 8003–8008. doi: 10.1073/pnas.1017338108.
- Haviernik, J. et al. (2021)** ‘Development and characterization of recombinant tick-borne encephalitis virus expressing mCherry reporter protein: A new tool for high-throughput screening of antiviral compounds, and neutralizing antibody assays’, *Antiviral Research*, 185, p. 104968. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104968.
- Hilgenfeld, R. (2016)** ‘Zika virus NS 1, a pathogenicity factor with many faces’, *The EMBO Journal*, 35(24), pp. 2631–2633. doi: 10.15252/embj.201695871.
- Holding, M. et Dowall, D. S. (2020)** ‘Tick-Borne Encephalitis Virus, United Kingdom’, *Emerging infectious diseases*, 26(1). doi: 10.3201/eid2601.191085.
- Holzmann, H. (2003)** ‘Diagnosis of tick-borne encephalitis’, *Vaccine*, 2003(21). doi: 10.1016/s0264-410x(02)00819-8.
- Hönig, V. et al. (2019)** ‘Multiple Lineages of Usutu Virus (Flaviviridae, Flavivirus) in Blackbirds (*Turdus merula*) and Mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech Republic (2016-2019)’, *Microorganisms*, 7(11). doi: 10.3390/microorganisms7110568.
- Hossein, F. (2020)** ‘An overview of the current medical literature on Zika virus’, *Biophysical Reviews*. doi: 10.1007/s12551-020-00748-8.
- Chaigne, B. et Watier, H. (2017)** ‘Theranostic of biopharmaceuticals’, *Pharmacology & Therapeutics*, 175, pp. 67–74. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.035.
- Chen, Y. et al. (2019)** ‘Efficacy and Tolerability of Intravenous Immunoglobulin and Subcutaneous Immunoglobulin in Neurologic Diseases’, *Clinical Therapeutics*, 41(10), pp. 2112–2136. doi: 10.1016/j.clinthera.2019.07.009.
- Chérin, P. et Cabane, J. (2010)** ‘Relevant Criteria for Selecting an Intravenous Immunoglobulin Preparation for Clinical Use’, *BioDrugs*, 24(4), pp. 211–223. doi: 10.2165/11537660-000000000-00000.
- InvivoGen: Reagents and Tools for Cell Biology Research** [online] [cit. 8.12.2020]. Dostupné z: <https://www.invivogen.com/antibody-generation>
- Imbach, P. et al. (1981)** ‘High-dose intravenous gammaglobulin therapy of refractory, in particular idiopathic thrombocytopenia in childhood’, *Helvetica Paediatrica Acta*, 36(1), pp. 81–86.
- Jeffries, C. L. et al. (2014)** ‘Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain’, *Journal of General Virology*, 95(5), pp. 1005–1014. doi: 10.1099/vir.0.062356-0.

- Jones, C. T. et al. (2003)** ‘Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein’, *Journal of Virology*, 77(12), pp. 7143–7149. doi: 10.1128/JVI.77.12.7143-7149.2003.
- Köhler, G. et Milstein, C. (1975)** ‘Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity’, *Nature*, 256(5517), pp. 495–497. doi: 10.1038/256495a0.
- Leavy, O. (2016)** ‘The birth of monoclonal antibodies’, *Nature Immunology*, 17(S1), pp. S13–S13. doi: 10.1038/ni.3608.
- Lindenbach, B. D. et Rice, C. M. (2003)** ‘Molecular biology of flaviviruses’, in *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 23–61. doi: 10.1016/S0065-3527(03)59002-9.
- Lindquist, L. (2014)** ‘Tick-borne encephalitis’, *Handbook of clinical neurology*, 2014(123), pp. 531–559. doi: 10.1016/B978-0-444-53488-0.00025-0.
- Liu, J. et al. (2016)** ‘Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes’, *Nature Microbiology*, 1(9), p. 16087. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.87.
- Maleki, L. A. et al. (2013)** ‘Future prospects of monoclonal antibodies as magic bullets in Immunotherapy’, *Human Antibodies*, 22(1–2), pp. 9–13. doi: 10.3233/HAB-130266.
- Mandl, C. W. et al. (1997)** ‘Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr.’, *Journal of General Virology*, 78(5), pp. 1049–1057. doi: 10.1099/0022-1317-78-5-1049.
- Maverakis, E. et al. (2015)** ‘Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review’, *Journal of Autoimmunity*, 57, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.jaut.2014.12.002.
- Muller, D. A. et Young, P. R. (2013)** ‘The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker’, *Antiviral Research*, 98(2), pp. 192–208. doi: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>.
- Parren, P. W. H. I. et Burton, D. R. (2001)** ‘The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo’, in *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 195–262. doi: 10.1016/S0065-2776(01)77018-6.
- Plotkin, S. A., Orenstein, W. A. et Offit, P. A. (eds) (2013)** *Vaccines*. Sixth edition. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.
- Puchhammer-Stöckl, E. et al. (1995)** ‘Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay’, *Clinical and Diagnostic Virology*, 4(4), pp. 321–326. doi: 10.1016/0928-0197(95)00022-4.

- Randolph, S. E. et Rogers, D. J. (2006)** ‘Tick-borne Disease Systems: Mapping Geographic and Phylogenetic Space’, in *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 263–291. doi: 10.1016/S0065-308X(05)62008-8.
- Rathore, A. P. S. et St. John, A. L. (2020)** ‘Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses’, *Frontiers in Immunology*, 11, p. 334. doi: 10.3389/fimmu.2020.00334.
- Robbiani, D. F. et al. (2017)** ‘Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico’, *Cell*, 169(4), pp. 597-609.e11. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.024.
- Rumyantsev, A. A., Murphy, B. R. et Pletnev, A. G. (2006)** ‘A tick-borne Langkat virus mutant that is temperature sensitive and host range restricted in neuroblastoma cells and lacks neuroinvasiveness for immunodeficient mice’, *Journal of Virology*, 80(3), pp. 1427–1439. doi: 10.1128/JVI.80.3.1427-1439.2006.
- Růžek, D., Dobler, G. et Niller, H. H. (2013)** ‘May early intervention with high dose intravenous immunoglobulin pose a potentially successful treatment for severe cases of tick-borne encephalitis?’, *BMC Infectious Diseases*, 13(1), p. 306. doi: 10.1186/1471-2334-13-306.
- Růžek, D. et al. (2015)** *Klíšťová encefalitida*. Grada.
- Salat, J. et al. (2020)** ‘Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccines Contain Non-Structural Protein 1 Antigen and May Elicit NS1-Specific Antibody Responses in Vaccinated Individuals’, *Vaccines*, 8(1), p. 81. doi: 10.3390/vaccines8010081.
- Sejvar, J. J. (2003)** ‘West Nile Virus: An Historical Overview’, *Ochsner Journal*, 5(3), p. 6.
- Shaner, N. C. et al. (2004)** ‘Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein’, *Nature Biotechnology*, 22(12), pp. 1567–1572. doi: 10.1038/nbt1037.
- Shaz, B., Hillyer, C. D. and Gil, M. R. (eds) (2019)** *Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects*. Third edition. Amsterdam: Elsevier Science.
- Schirrmann, T. et al. (2011)** ‘Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy’, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(1), pp. 412–426. doi: 10.3390/molecules16010412.
- Schlesinger, J. J. et al. (1990)** ‘Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody.’, *The Journal of general virology*, 71 (Pt 3), pp. 593–599. doi: 10.1099/0022-1317-71-3-593.

- Smith, G. W. et Wright, P. J. (1985)** ‘Synthesis of Proteins and Glycoproteins in Dengue Type 2 Virus-infected Vero and *Aedes albopictus* Cells’, *Journal of General Virology*, 66(3), pp. 559–571. doi: 10.1099/0022-1317-66-3-559.
- Sotcheff, S. et Routh, A. (2020)** ‘Understanding Flavivirus Capsid Protein Functions: The Tip of the Iceberg’, *Pathogens*, 9(1), p. 42. doi: 10.3390/pathogens9010042.
- Sonnenberg, K. et al. (2004)** ‘State-of-the-art serological techniques for detection of antibodies against tick-borne encephalitis virus’, *International journal of medical microbiology: IJMM*, 293 Suppl 37, pp. 148–151. doi: 10.1016/s1433-1128(04)80028-7.
- St. John, A. L. and Rathore, A. P. S. (2019) ‘Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections’, *Nature Reviews Immunology*, 19(4), pp. 218–230. doi: 10.1038/s41577-019-0123-x.
- Stangel, M. et Pul, R. (2006)** ‘Basic principles of intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment’, *Journal of Neurology*, 253 Suppl 5, pp. V18-24. doi: 10.1007/s00415-006-5003-1.
- Stefanik, M. et al. (2018)** ‘Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes’, *BMC Neuroscience*, 19(1), p. 5. doi: 10.1186/s12868-018-0407-2.
- Steinitz, M. et al. (1977)** ‘EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody’, *Nature*, 269(5627), pp. 420–422. doi: 10.1038/269420a0.
- Studahl, M. et al. (2013)** ‘Acute Viral Infections of the Central Nervous System in Immunocompetent Adults: Diagnosis and Management’, *Drugs*, 73(2), pp. 131–158. doi: 10.1007/s40265-013-0007-5.
- Traggi, E. et al. (2004)** ‘An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus.’, *Nature medicine*, 10(8), pp. 871–875. doi: 10.1038/nm1080.
- Vazquez, A. et al. (2011)** ‘Usutu virus: potential risk of human disease in Europe’, *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 16(31).
- von Boehmer, L. et al. (2016)** ‘Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells’, *Nature Protocols*, 11(10), pp. 1908–1923. doi: 10.1038/nprot.2016.102.
- Winkler, G. et al. (1988)** ‘Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer’, *Virology*, 162(1), pp. 187–196. doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90408-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90408-4).

Winter, G. and Milstein, C. (1991) ‘Man-made antibodies’, *Nature*, 349(6307), pp. 293–299. doi: 10.1038/349293a0.

Wootla, B., Denic, A. et Rodriguez, M. (2014) ‘Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic’, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1060, pp. 79–110. doi: 10.1007/978-1-62703-586-6_5.

Xie, X. et al. (2013) ‘Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein’, *Journal of Virology*, 87(8), pp. 4609–4622. doi: 10.1128/JVI.02424-12.

Yang, Q. et al. (2020) ‘Tick-borne encephalitis virus NS4A ubiquitination antagonizes type I interferon-stimulated STAT1/2 signalling pathway’, *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), pp. 714–726. doi: 10.1080/22221751.2020.1745094.

Zhang, Y. (2003) ‘Structures of immature flavivirus particles’, *The EMBO Journal*, 22(11), pp. 2604–2613. doi: 10.1093/emboj/cdg270.