

*На правах рукописи*

СОРОКИН

Евгений Валентинович

ЭПИТОПНОЕ КАРТИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ  
ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА В  
ЯМАГАТСКОЙ И ВИКТОРИАНСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННЫХ  
ЛИНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ  
АНТИТЕЛ.

03.02.02 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России

Научный руководитель доктор медицинских наук, профессор,  
заведующая лабораторией ФГБУ «НИИ  
гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава  
России  
**Соминина Анна Адольфовна**

Официальные оппоненты

Ведущая организация

Защита состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ  
гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России  
по адресу: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17, тел.  
(812) 499-15-04, e-mail: [sovet@influenza.spb.ru](mailto:sovet@influenza.spb.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа  
им. А.А. Смородинцева» Минздрава России и на сайте  
<http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан: « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 001.043.01  
кандидат биологических наук

Амосова И.В.

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Вирусы гриппа вызывают ежегодные эпидемии глобального масштаба. Они служат причиной роста смертности во всем мире и представляют собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Установлено, что ущерб, наносимый гриппом, превосходит все другие потери, связанные с массовыми эпидемиями и войнами. Это связано с тем, что грипп остается неконтролируемой вирусной инфекцией, от которой особенно страдают слаборазвитые страны, где в период эпидемий смертность может увеличиваться до 2,5% от числа заболевших. В 2019 г. Всемирная Организация Здравоохранения выпустила руководящий документ «Global Influenza Strategy 2019-2030», в котором сформулирована глобальная стратегия в области борьбы с гриппом на ближайшее десятилетие. Указывается, что ежегодно в мире регистрируется до 1 миллиарда случаев гриппа, в числе которых 3-5 млн тяжелых случаев в 290000 - 650000 случаев завершающиеся смертельными исходами. Кроме того, сезонные эпидемии гриппа наносят большой социально-экономический ущерб. При этом, значительный вклад в эпидемический процесс вносят вирусы гриппа В, вызывая примерно одну треть от общего числа заболеваний гриппом [Yang J.R. et al., 2012], особенно среди детей, где они служат причиной тяжелых форм респираторных инфекций [Garg S. et al., 2013]. Известно также, что частота осложнений и летальных исходов при гриппе, как правило, выше у детей младшего возраста и пожилых людей [Matias G. et al., 2014].

**Степень разработанности темы исследования.** Несмотря на значимость вирусов гриппа В многие аспекты их структурной организации и, особенно, эволюции остаются недостаточно изученными [Koutsakos M. et al., 2016]. Современные вирусы гриппа В подразделяются на две филогенетически и антигенно отличные линии, представленные референс-штаммами В/Yamagata/16/88 (Ямагатская линия) и В/Victoria/2/87 (Викторианская линия). Их дивергенция началась еще в 1970-е годы [Kanegae Y. et al., 1990]. Обе линии имели сложную эволюционную историю до момента их расхождения, социркулируя по всему миру, по меньшей мере, с 2002 года [Lo Y-C. et al., 2013].

Существующие представления об изменчивости вирусов гриппа В показывают, что скорость их эволюции является более медленной, чем у вирусов гриппа А [Bedford T. et al., 2015]. Однако эволюционная динамика вирусов гриппа В на общегеномном уровне в глобальном масштабе еще мало исследована [Dudas G. et al., 2015; Bedford T. et al., 2015]

Предполагается, что вирусы Викторианской линии подвергаются более быстрому антигенному дрейфу [Vijaykrishna D. et al., 2015] и

дольше сохраняются в локальных географических зонах до их более широкого распространения [Bedford T. et al., 2015].

В связи с вышеизложенным исследование антигенной структуры гемагглютинина вирусов гриппа В и рецептор-связывающих свойств возбудителя является актуальной научно-исследовательской задачей и имеет не только теоретическую значимость, но важно и с практической точки зрения. Широкие возможности для решения этих задач предоставляет использование вируснейтрализующих моноклональных антител, направленных к отдельным антигенным сайтам в составе молекулы гемагглютинина, а также применение методологии получения и анализа эскейп-мутантов вирусов гриппа, используемых в современной вирусологии для изучения путей возникновения антигенных вариантов вируса.

**Целью исследования** являлось эпитопное картирование молекулы гемагглютинина вирусов гриппа типа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий с использованием разработанных нами новых моноклональных антител.

#### **Задачи исследования**

- Получить и охарактеризовать панели моноклональных антител к гемагглютинину вирусов гриппа В Викторианской и Ямагатской эволюционных линий.
- Получить эскейп-мутанты (ЭМ) вирусов гриппа типа В обеих эволюционных линий, резистентные к вируснейтрализующему действию моноклональных антител.
- На основании результатов секвенирования эскейп мутантов определить иммунодоминантные антигенные детерминанты в составе большой субъединицы гемагглютинина (HA1), ответственные за индукцию синтеза вируснейтрализующих антител.
- Провести эпитопное картирование гемагглютинина вирусов гриппа В обеих эволюционных линий с построением трехмерных моделей гемагглютинина.
- Выявить в структуре HA1 вирусов гриппа В позиции, существенно важные для реализации рецепторных функций вируса.

**Научная новизна работы.** Впервые в России разработаны панели вируснейтрализующих моноклональных антител, направленных к антигенным детерминантам в составе гемагглютинина вирусов гриппа типа В Викторианской и Ямагатской эволюционных линий.

Впервые получены моноклональные антитела к вирусам гриппа В Викторианской линии, позволяющие четко дифференцировать изоляты, выделенные в различных системах культивирования (куриные эмбрионы и культура клеток MDCK).

В большой субъединице гемагглютинаина (HA1) вирусов гриппа В обеих линий впервые выявлен ряд новых детерминант, ответственных за выработку вируснейтрализующих антител и антигенные свойства вируса.

Экспериментально подтверждена роль определенных аминокислотных остатков в составе HA1 в реализации рецептор-связывающих свойств вирусов гриппа В.

В целом работа расширяет представления о структуре иммунодоминантных сайтов в составе молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской линий.

**Практическая значимость работы.** Работа имеет преимущественно теоретический характер. Тем не менее, анализ полученных в лабораторных условиях эскейп-мутантов позволяет оценивать антигенную изменчивость гемагглютинаина вируса гриппа В на эпитоном уровне, что может быть полезно при отборе эталонных штаммов для включения их в состав современных диагностикумов и вакцин. Так, полученные МКА оказались полезными для более тонкого антигенного анализа циркулирующих вирусов гриппа в сравнении с поликлональными сыворотками, а некоторые из них – перспективными иммунореагентами для конструирования высокочувствительных и специфичных диагностических тест-систем.

В Коллекцию вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России депонировано 34 эскейп-мутанта вирусов гриппа В, которые могут быть использованы при изучении эволюции и биологических свойств данного возбудителя. Тринадцать эскейп-мутантов вируса гриппа В депонированы в Государственной коллекции вирусов (штаммам присвоены ГКВ №№2886, 2907-2918). Ряд полученных нами моноклональных антител представлен в «European Virus Archive».

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Созданная панель вируснейтрализующих МКА обеспечила возможность получения серии эскейп-мутантов и проведения антигенного анализа современных вирусов гриппа типа В Викторианской и Ямагатской эволюционных линий.
2. Антигенное картирование гемагглютинаина эскейп-мутантов вирусов гриппа В, относящихся к Ямагатской и Викторианской эволюционным линиям, позволило выявить ранее не идентифицированные иммунодоминантные эпитопы в составе молекулы гемагглютинаина.
3. Установлено, что эпитопы, ответственные за связь с вируснейтрализующими антителами, могут находиться в двух разных антигенных сайтах гемагглютинаина вирусов гриппа В
4. Документировано, что антигенная изменчивость современных вирусов гриппа В Викторианской линии может осуществляться за счет инсерций аминокислотных остатков в составе гемагглютинаина.

5. Аминокислотные замены в положениях 202 и 242 гемагглютинина вирусов гриппа В Ямагатской линии, а также 202 и 203 – у вирусов гриппа В Викторианской линии играют важную роль для рецепторной специфичности вирусной частицы.

**Личный вклад автора** состоит в самостоятельном планировании и проведении лабораторных исследований, получении и анализе эскейп-мутантов. Получение и характеристика моноклональных антител проведены совместно с Царевой Т.Р. Секвенирование генов гемагглютинина эскейп-мутантов выполнено сотрудниками лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Все материалы, представленные в диссертационной работе, проанализированы и обобщены лично автором.

**Апробация материалов диссертации.** Материалы диссертации были представлены на конференции “Preparedness to the influenza pandemic – an international outlook” СПб., 2007; Options for the control of influenza VI, Toronto, Canada, 2007; The fifth ESWI Influenza Conference, Riga, Latvia, 2014; 18th Annual Meeting of European Society for Clinical Virology, Edinburgh, UK, 2015; International conference “Trends in Influenza Research”, Saint Petersburg, Russia, 2017.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Получен 1 патент на изобретения РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, главы собственных исследований, обсуждение, выводы и приложения. Список литературы включает 217 цитируемых источников. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста, включает 16 таблиц и 68 рисунков.

## II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Материалы и методы исследования

*Вирусы гриппа* получали из Коллекции вирусов гриппа и ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». Культивирование вирусов гриппа проводили в 10-дневных куриных эмбрионах согласно Методическим рекомендациям НИИ гриппа [Соминина А.А. и др., 2006].

*Очистка и концентрация вирусов.* Вирусы осаждали центрифугированием при 50 000g в течение 2 ч, суспендировали в 10 мМ трис-ЭДТА буфере, pH 7,2 (STE) и производили очистку вируса через градиент 20-60% сахарозы центрифугированием при 100 000g в течение 2,5 ч с последующим осаждением вируса из зоны 36-40% сахарозы на дно при 120 000g в течение 1ч. Осадок ресуспендировали в буфере STE. Полученные концентраты аликвотировали и хранили при -75<sup>0</sup>С.

*Определение концентрации белка.* Для определения концентрации белка использовали набор “BCA™ Protein Assay Kit” («Pierce», США). Реакцию проводили в соответствии с Инструкцией изготовителя. Учет результатов проводили при длине волны 560 нм, используя фотометр Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия). Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой, линейный участок которой соответствовал интервалу концентраций 0,05 - 2 мг/мл по белку

*Реакция гемагглютинации (РГА), реакция торможение гемагглютинации (РТГА)* ставили общепринятым методом в соответствии с Методическими рекомендациями [Соминина А.А. и др., 2006]. За титр антител принимали их наибольшее разведение, полностью подавляющее гемагглютинацию 4 ГАЕ вируса.

*Получение гибридом.* Гибридомы – продуценты МКА к вирусам гриппа В (штаммы В/Флорида/04/06 и В/Массачусетс/2/12 Ямагатской линии, а также В/Шандонг/7/97, В/Малайзия/2506/04 и В/Брисбен/46/15 Викторианской линии) были получены нами по методу [Kohler G., and Milstein C., 1976] в следующей модификации. Мышей линии Balb/c иммунизировали путем внутрибрюшинного введения 70 мкг очищенного вируса. Через несколько недель мыши были бустированы введением 50 мкг очищенного вируса. Через три дня после бустер-иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунных мышей с клетками мышинной миеломы линии X63Ag8.653 в соотношении 10:1 в присутствии 50% раствора полиэтиленгликоля-2000 в среде Игла DMEM («БиоЛот», Россия).

*Получение моноклональных антител.* Мышам линии BALB/c, предварительно праймированным пристаном (0,5 мл/мышь), внутрибрюшинно вводили гибридомы из расчета 3 – 5 млн клеток на мышь. Спустя 2-3 недели асцитную жидкость собирали. Исследования выполняли согласно "Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приказ Минздрава России № 266 от 19.06.2003).

*Первичная характеристика полученных моноклональных антител* проводилась в ИФА. Очищенным вирусным концентратом, разведенным карбонатно-бикарбонатным буфером (КББ) до концентрации 2-4 мкг/мл, сенсibilizировали планшеты в течение 18 часов при 4°C. После отмывания несвязавшегося антигенного материала 0,01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с добавлением 0,05% твина -20 (ФСБ-Т), pH 7,2 в планшеты вносили МКА, разведенные на ФСБ-Т до  $10^{-3}$  -  $10^{-6}$ , и инкубировали их 1 час при 37°C. Связавшиеся с антигеном МКА детектировали с помощью пероксидазного конъюгата антител к IgG мыши (Sigma, США), разведенного в ФСБ-Т, после инкубации в течение 1 часа при 37°C. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина

(ТМБ) и 0,02%  $H_2O_2$  в ацетат-цитратном буфере, pH 5,0. После остановки реакции с помощью 2N  $H_2SO_4$  оптическую плотность измеряли на фотометре Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия) при длине волны 450 нм ( $OD_{450}$ ).

*Оценку вируснейтрализующей активности антител проводили в микрокультуральном ИФА.* Двукратные разведения МКА (50 мкл) соединяли с равными объемами вирусосодержащего материала, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub> вируса. 100 мкл смеси вирус/МКА инкубировали 1 час при 37°C, после чего ее наносили на отмытый 0,01М ФСБ, pH 7,2, монослой культуры клеток MDCK, выращенных в 96-луночных планшетах для культуральных работ (NUNC, Дания). Планшеты выдерживали в  $CO_2$  – инкубаторе до развития ЦПД в контрольных лунках (контроль репродукции 100 ТЦД<sub>50</sub> вируса в отсутствие МКА), после чего монослой фиксировали в течение 10 мин 80% охлажденным ацетоном и проводили ИФА, как выше указано. Нейтрализующим титром АТ считали последнее разведение МКА, при котором регистрировали двукратное снижение  $OP_{450}$  по сравнению с контролем репродукции вируса.

*Получение эскейп – мутантов.* Для получения ЭМ, штаммы вирусов гриппа клонировали в присутствии избытка соответствующих МКА, обладающих выраженной вируснейтрализующей активностью [Kaverin N. et al., 2007]. Смеси вирус-МКА инкубировали в течение часа при 37°C, после чего их вводили в куриные эмбрионы. Через 72 часа аллантоисную жидкость собирали и исследовали в РГА. Далее эскейп-мутанты клонировали 3-4 раза методом предельных разведений, после чего исследовали их способность реагировать с гомологичными и гетерологичными МКА. Полученные ЭМ обозначали в соответствии с названием МКА, использованных для их селекции.

*Секвенирование эскейп – мутантов.* Выделение РНК проводили с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). RT-ПЦР для амплификации фрагментов гена геммаглоутина проводилась с использованием набора реагентов AgPath-ID One-step RT-PCR Kit (Ambion, США). Секвенирование проводили методом Сэнгера с использованием коммерчески доступного набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Получение и характеристика моноклональных антител к вирусам гриппа В Ямагатской эволюционной линии

#### 2.2.1. Моноклональные антитела к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 (генетическая линия 2)

В целях эпитопного картирования вирусов гриппа типа В Ямагатской эволюционной линии (ЭЛ) была получена панель из восьми МКА к эталонному вакцинному штамму В/Массачусетс/2/12, обозначенные как



МКА 1G4, 1G9, 2B10, 3B12, 3C2, 4E11, 5B11 и 5F11. Все полученные МКА реагировали до высоких титров в ИФА (до  $10^6$ – $10^7$ ) и РТГА (до  $10^4$ – $10^5$ ) только с вирусами Ямагатской ЭЛ, при полном отсутствии взаимодействия с вирусами гриппа В Викторианской ЭЛ, а также с сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А субтипов А(Н1N1)pdm09, А(Н2N2), А(Н3N2), А(Н5N1), А(Н7N9) и А(Н9N2). При этом, все МКА взаимодействовали как с «ранними» штаммами Ямагатской ЭЛ, начиная с эталонного штамма В/Yamagata/16/88, так и с вирусами гриппа В генетических групп 1 (В/Флорида/04/06) и 3 (штамм В/Пхукет/3073/13). Было установлено, что все МКА проявляли вируснейтрализующую активность в концентрациях от 36 нг/мл до 570 нг/мл. По данным иммуноблоттинга все МКА были специфичны в отношении конформационной структуры гемагглютинина.

*2.2.2. Моноклональные антитела к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 (генетическая линия 1).*

Четыре МКА (8НЗ, 8Н11, 9АЗ и 10F4) были получены к штамму В/Флорида/04/06. Эти МКА реагировали до  $10^6$  в ИФА с вирусами Ямагатской ЭЛ, при полном отсутствии взаимодействия с вирусами гриппа В Викторианской ЭЛ и штаммами ранних (1954-1983гг.) лет выделения, а также сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А. Указанные МКА обладали выраженной антигемагглютинирующей активностью только в отношении вирусов, принадлежащих этой ветви, начиная с эталонного штамма В/Ямагата/16/88. Интересным исключением явились МКА 10F4, которые не взаимодействовали с ранними штаммами Ямагатской линии (1988–1998 гг. выделения), но реагировали в РТГА со штаммами 2004-2012 гг. выделения, антигенно родственными штамму В/Флорида/07/04. Все МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, что обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса В/Флорида/04/06. Согласно данным western-блота все МКА были направлены к молекуле HA1.

**2.2. Антигенное картирование гемагглютинина вирусов гриппа Ямагатской линии с использованием моноклональных антител.**

*2.2.1. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса гриппа В/Массачусетс/2/12*

*Получение ЭМ с использованием МКА 1G4, 2B10, 3C2 и идентификация аминокислотных замен в молекуле HA1.*

В наших исследованиях было обнаружено, что все ЭМ (перечисленные здесь и далее) полностью утрачивали способность реагирования с гомологичными МКА.

Ряд ЭМ, селекционированных с помощью указанных выше МКА, имели идентичные аминокислотные замены (АКЗ). В частности, ЭМ

1G4/1, 1G4/2, 2B10/1, 2B10/2, 3C2/1 и 3C2/2 имели замену глицина на глутаминовую кислоту (G141→E), расположенную в петле–140.

*Идентификация аминокислотных замен в молекуле HA1 у ЭМ 4E11.*

Анализ двух ЭМ 4E11/1 и 4E11/2, показал, что эти варианты имели также единичную аминокислотную замену аспарагина на лизин в положении 202 (202N→K). Этот аминокислотный остаток расположен в спирали 190 и принимает участие в формировании рецептор-связывающего кармана вируса гриппа типа В.

*Аминокислотные замены у ЭМ к МКА 1G9*

Анализ двух ЭМ, полученных с использованием МКА 1G9, показал, что ЭМ 1G9/1 имел две аминокислотные замены – глицина на глутаминовую кислоту (141G→E) в положении 141 (аналогично ЭМ 1G4/1, 1G4/2, 2B10/1, 2B10/2, 3C2/1 и 3C2/2) и замену глицина на аргинин в положении 237 (237G→R). ЭМ 1G9/2 имел единичную замену 237G→R (рис. 1).

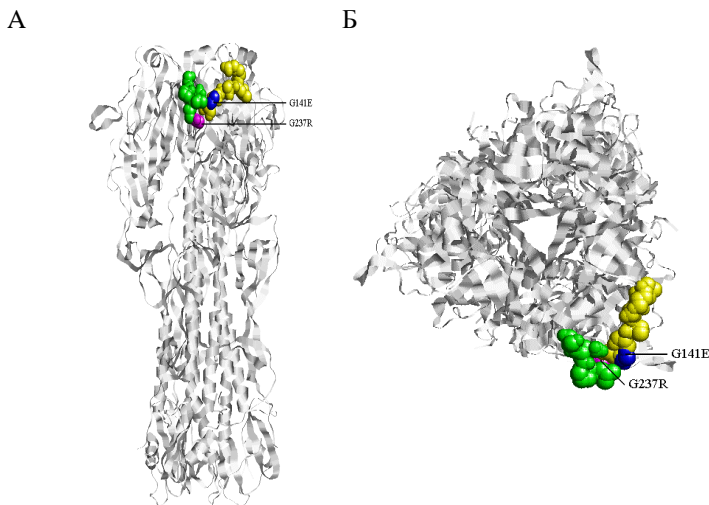


Рисунок 1 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 1G9/1 (141G→E и 237G→R) и ЭМ 1G9/2 (237G→R) вируса гриппа В/Массачусетс/2/12.

Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных эпитопов в молекуле HA1 построена на основе идентификации эпитопов в составе ЭМ и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы HA вируса гриппа В/Яманаши/166/98, PDB code: 4M40 [Ni F. et al., 2013], с использованием программы RasMol, версия 2.7.4.2. Здесь и далее – на рис. 1 – 5: петля–140 обозначена желтым, петля–240 – зеленым, спираль–190 – голубым, А – вид сбоку, Б – вид сверху; HA нумерация В/Массачусетс/2/12.

### Аминокислотные замены у ЭМ к МКА 3В12

Установлено, что ЭМ 3В12/1, полученный с использованием МКА 3В12 имел единичную замену остатка пролина в положении 240 на остаток глутамина (240P→Q), а ЭМ 3В12/2 нес две замены 240P→Q и 202N→K (рис. 2)

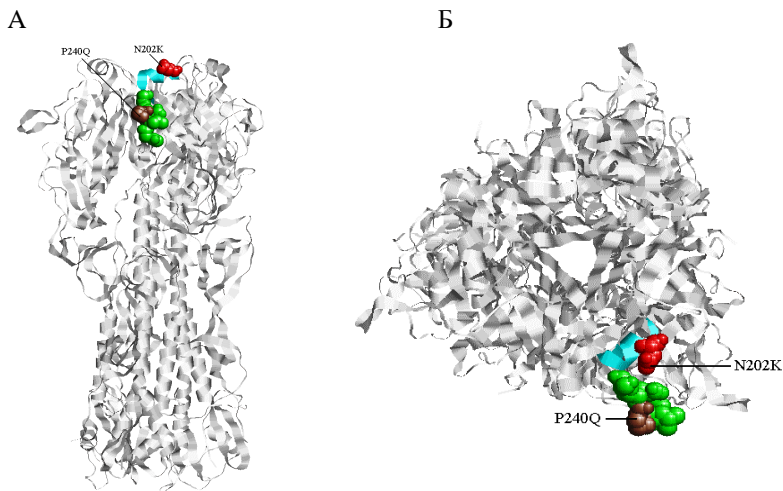


Рисунок 2 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 3В12/1 (240P→Q) и ЭМ 3В12/2 (240P→Q и 202N→K) вируса гриппа В/Массачусетс/2/12

Остаток HA1 240, по-видимому является частью антигенного сайта гемагглютинина вируса гриппа В, который частично перекрываются с сайтом D в H3 HA и сайтом Ca1 в H1 HA. Ранее замены в положении 240Pro→Gln или Thr были обнаружены у ЭМ вирусов гриппа В ранних лет выделения, до расхождения на эволюционные линии [Berton M. et al., 1984, Berton M. and Webster R., 1985], а также замену 240Pro→Ser у В/Виктория подобных штаммов [Nakagawa N. et al., 2001]. Ранее не было обнаружено подобной замены у вирусов гриппа В Ямагатской ветви [Nakagawa N. et al., 2003].

### Аминокислотные замены у ЭМ, полученных с использованием МКА 5В11

В нашем исследовании с использованием МКА 5В11 было получено три ЭМ. ЭМ 5В11/1 и 5В11/3 имели две одинаковые замены положениях 136 (136R→I) и 240P→S, то время как ЭМ 5В11/3 имел аналогичную замену 136R→I и вторую аминокислотную замену 141G→E (рис. 3).

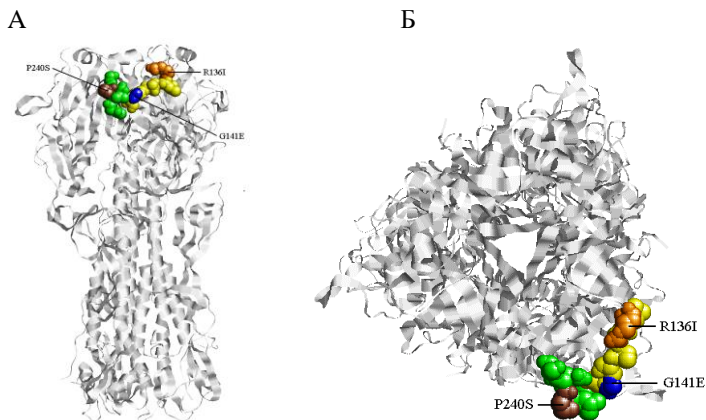


Рисунок 3 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 5B11/1 и 5B11/3 (136R→I и 240P→S) и ЭМ 5B11/2 (136R→I и 141G→E) вируса гриппа В/Массачусетс/2/12

У всех трех мутантов произошла замена в положении 136R→I. Аминокислотный остаток в положении 136 является одним из важнейших в структуре рецептор-связывающего сайта. Показано, что R136 содержится у 98% штаммов Ямагатской линии и только у 1% Викторианских вирусов, у штаммов 1972-1982 г.г. в этом положении, как правило, расположен остаток изолейцина.

*Аминокислотные замены у ЭМ 5F11*

В результате клонирования вируса дикого типа В/Массачусетс/2/12 в присутствии МКА 5F11 был получен только один ЭМ, имеющий две аминокислотные замены в положениях 136R→I и 196D→G (рис. 4)

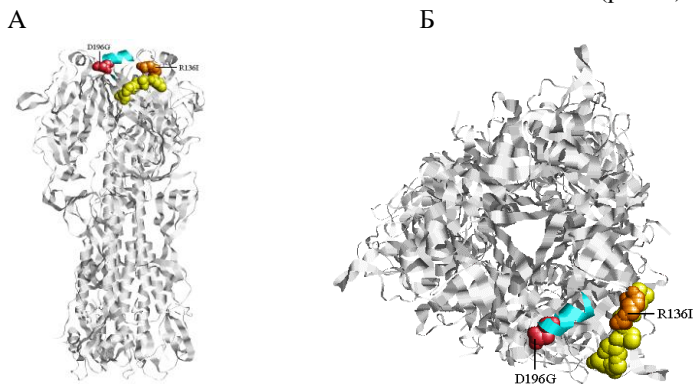


Рисунок 4 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутанта 5F11 (136R→I и 196D→G) вируса гриппа В/Массачусетс/2/12

Как указывалось выше, замена 136R→I расположена в петле-140 и аминокислотные остатки в этом положении являются одними из наиболее значимых в структуре рецептор-связывающего сайта. Остаток в положении 196 входит в состав спирали-190, которая формирует верхнюю кромку рецептор-связывающего кармана гемагглютинаина вируса гриппа В. Кроме того, варибельность аминокислотных остатков в положениях 196-198 определяет наличие/отсутствие потенциального сайта N-гликозилирования по позиции 196.

Т.о., установлено, что все идентифицированные в данном исследовании аминокислотные остатки вовлечены в формирование рецептор-связывающего кармана гемагглютинаина вируса гриппа В. Полученные МКА с идентифицированным сайтом взаимодействия с вирусом могут быть использованы для анализа антигенной варибельности циркулирующих вирусов гриппа В.

### ***2.2.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Флорида/04/06***

В результате анализа HA1 ЭМ вируса гриппа В/Флорида/04/06 в сравнении со штаммом дикого типа были выявлены аминокислотные замены в четырех положениях. Так, ЭМ 8N3 имел замену N202K, входящую в спираль 190 и рецептор-связывающий карман молекулы HA1. ЭМ 10F4 имел одиночную замену в положении 40 (Y→H), которая по современным представлениям не входит ни в один из антигенных сайтов, но часто встречается у полевых изолятов [Лобова Т.Г. и др., 2012]. ЭМ 8N11 и 9A3 имели одиночные аминокислотные замены в положениях 85 (H→Y) и 242 (S→R) соответственно. Аминокислотный остаток в положении 85 является высоко консервативным, но изредка встречается у полевых изолятов разных лет выделения [Stray S. and Pittman L., 2012]. Замена в положении 242 ранее описана не была, и ее обнаружение расширяет представления об антигенно значимых детерминантах в составе гемагглютинаина вируса гриппа В.

Расположение всех аминокислотных остатков, выявленных в HA1 вирусов гриппа В/Массачусетс/2/12 и В/Флорида/04/06 в данном исследовании, представлено на рисунке 5.

### ***2.3. Получение и характеристика моноклональных антител к вирусам гриппа В Викторианской эволюционной линии***

#### ***2.3.1. Разработка и характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 (генетическая линия 1А).***

В целях изучения антигенной изменчивости вирусов гриппа типа В Викторианской эволюционной линии была получена панель из шестнадцати МКА к эталонному вакцинному штамму В/Брисбен/46/15, обозначенных как МКА 6A4, 6A9, 6E11, 7C8, 7D9, 7G9, 7H8, 8A8, 9B5, 9G5, 10B6, 10D3, 10D9, 10F1, 11G2 и 11G10. Данный штамм является

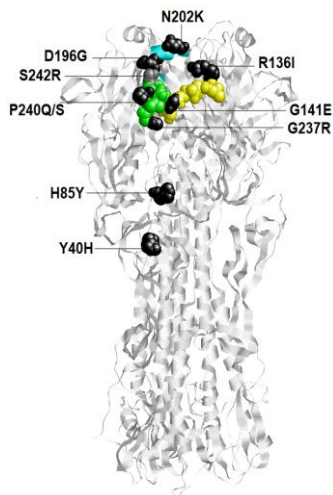


Рисунок 5 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов вирусов гриппа В/Массачусетс/2/12 и В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной линии

В/Брисбен/60/08—подобным вирусом, рекомендованным ВОЗ для включения в состав вакцин в Северном полушарии на сезоны 2016-2017 и 2017-2018гг. [Wkly Epidemiol Rec., 2016, 2017]. Все полученные МКА реагировали до высоких титров в ИФА (до  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ ) с вирусами Викторианской ЭЛ, при полном отсутствии взаимодействия с вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ, а также с сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А. Кроме того, все МКА обладали антиагглютинирующей активностью в отношении вируса В/Брисбен/46/15, но отличались по спектру реагирования с ранними изолятами вируса гриппа В. По интенсивности взаимодействия в РТГА со штаммом – иммуногеном полученные МКА были условно разделены на 2 группы: 1) МКА 6A9, 7C8, 7D9, 7G9, 8A8 и 10F1 с невысокой активностью в РТГА (титры 1/80 – 1/320) и 2) МКА 6A4, 6E11, 7H8, 9B5, 9G5, 10B6, 10D3, 10D9, 11G2 и 11G10 с высокими титрами (1/5120 - 1/163840). Ни одно из МКА не взаимодействовало в РТГА со штаммами 1940-1959 г.г. выделения. Показано, что МКА второй группы (6E11, 9G5, 9B5 и 6A4) реагировали с вирусом В/Россия/69, не взаимодействуя при этом со штаммами более поздних лет выделения – В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83. С другой стороны, МКА 10B6 взаимодействовали с вирусами В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83, а МКА 10D9 со штаммами В/Гонконг/5/72 и В/Сингапур/222/79, но при этом не реагировали с более ранним изолятом

В/Россия/69. Все МКА взаимодействовали в РТГА в эталонном штаммом В/Брисбен/60/08. Однако, по степени реагирования с другими референс-штаммами гриппа В Викторианской ветви, разработанные МКА были гетерогенны. Так, МКА 6А9, 7D9, 8А8, 9G5 и 9В5 были активны только в отношении генетической группы, представленной штаммом В/Брисбен/60/08. МКА 6Е11, 10D3 и 6А4 не взаимодействовали с референс-штаммом В/Гонконг/330/01, при этом они реагировали с вирусами, подобными В/Шандонг/7/97 и В/Малайзия/2506/04. МКА 7С8, 7G9, 10В6 и 10D9 проявляли антигемагглютинирующую активность в отношении всех протестированных в РТГА эталонных вирусов Викторианской ЭЛ. МКА 6Е11 и 6А4 реагировали в РТГА со всеми протестированными штаммами Викторианской ЭЛ, за исключением В/Гонконг/330/01. По-видимому, эти МКА направлены к консервативному эпитопу, который имелся у вирусов гриппа В до их разделения на две независимые филогенетические ветви. Однако, этот эпитоп впоследствии был утрачен у В/Ямагата-подобных штаммов, но сохранился у большинства современных представителей Викторианской линии. С другой стороны, МКА 9G5 и 9В5, также взаимодействующие со штаммом В/Россия/69 как в РТГА, так и в реакции нейтрализации, не реагировали с изолятами Викторианской группы, подобными В/Шандонг/7/97 и В/Малайзия/2506/04, до появления генетической группы, представленной эталоном В/Брисбен/60/08. Вероятнее всего это связано с появлением реверсивной аминокислотной замены по отношению к эталонному штамму В/Россия/69. Ранее было показано, что у российских изолятов 2009-2012 г.г. выделения, относящихся к группе В/Брисбен/60/08-подобных штаммов, зафиксировано четыре аминокислотные замены, 3 из которых расположены в антигенных сайтах VE, VA (150-петля), VB2 (160-петля) и аминокислотная замена S172P, которая расположена вне антигенно-значимой области, но сопровождается приобретением пролина - аминокислоты с крупным радикалом, которая не совместима с  $\alpha$ -спиралью молекулы HA, что характерно для эталонного штамма В/Брисбен/60/08.

МКА 7С8, 7G9, 10В6 и 10D9 взаимодействовали в РТГА с исследованными вирусами Викторианской линии (штаммами, подобными В/Шандонг/7/97, В/Гонконг/330/01, В/Малайзия/2506/04 и В/Брисбен/60/08), что позволяет предполагать, что эти МКА направлены к консервативному эпитопу/эпитопам в составе HA1 вирусов гриппа В Викторианской ветви.

Было установлено, что все МКА проявляли вируснейтрализующую активность в отношении вируса В/Брисбен/46/15. При этом нейтрализующая активность различных МКА варьировала в широких пределах (лимит концентрации от 52 нг/мл до 300 мкг/мл). Не было отмечено нейтрализующей активности МКА в отношении штаммов гриппа В Ямагатской ЭЛ – В/Массачусетс/2/12 (генетическая линия 2) и

В/Пхукет/3073/13 (генетическая линия 3). Установлено, что МКА, обладающие антигемагглютинирующей активностью в РТГА в отношении изолятов ранних лет выделения, имели и вируснейтрализующую активность. Так, МКА 6А4, 6Е11, 9В5 и 9Г5 были активны в реакции нейтрализации к вирусу В/Россия/69, но не к штаммам более поздних лет выделения – В/Гонконг/5/72 и В/Сингапур/222/79. С другой стороны, МКА 10В6 и 10Д9 ингибировали только вирусы В/Гонконг/5/72 и В/Сингапур/222/79, что согласуется с данными РТГА и позволяет говорить о наличии общих (консервативных) эпитопов у ряда штаммов ранних лет выделения и современных изолятов вирусов Викторианской ЭЛ.

Проведение иммуноблоттинга после электрофореза в нередуцирующих условиях показало, что полученные МКА взаимодействовали с двумя олигомерными (2хНА и 3хНА) формами НА и с неразделенным на субъединицы НА0. В восстановленных условиях МКА 6А9, 7С8, 7Д9, 7Г9, 8А8 и 10F1 взаимодействовали с тяжелой субъединицей НА1 и неразделенным НА0. МКА 6А4, 6Е11, 7Н8, 9В5, 9Г5, 10В6, 10Д3, 10Д9, 11Г2 и 11Г10 проявляли крайне слабую активность в редуцирующих условиях электрофореза. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что МКА 6А9, 7С8, 7Д9, 7Г9, 8А8 и 10F1 к вирусу В/Брисбен/46/15 специфичны как в отношении конформационной структуры гемагглютинина, так и в отношении первичной последовательности гемагглютинина вируса гриппа. С другой стороны МКА 6А4, 6Е11, 7Н8, 9В5, 9Г5, 10В6, 10Д3, 10Д9, 11Г2 и 11Г10 распознают преимущественно конформационную структуру молекулы гемагглютинина.

*2.3.2 Разработка и изучение свойств моноклональных антител к вирусам гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04.*

Дополнительно нами была разработана панель из двух МКА к вирусу В/Шандонг/07/97 (5В7 и В/4Н1) и трех МКА к штамму В/Малайзия/2506/04 (9С1, 9F1 и 11F8). Все полученные МКА, как и ранее полученные, реагировали до высоких титров в ИФА ( $10^{-6}$ ) с вирусами Викторианской ЭЛ, но не взаимодействия с вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ, штаммами ранних (1954-1983гг.) лет выделения, с сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А. Все МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, что обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса.

Определение направленности полученных МКА было проведено с использованием western-блота. После электрофореза вируса в нередуцирующих условиях все МКА взаимодействовали с двумя олигомерными формами НА1 и с НА0. В восстановленных условиях МКА 5В7 и 11F8 взаимодействовали с НА1 и с неразделенным НА0. МКА В/4Н1, 9С1 и 9F1 практически не определялись в данных условиях. Таким образом установлено, что все МКА направлены к молекуле НА, при этом, МКА 5В7 и 11F8 специфичны как в отношении конформационной структуры



гемагглютинина, так и в отношении первичной последовательности гемагглютинина вируса гриппа, тогда как МКА В/4Н1, 9С1 и 9F1 специфичны преимущественно в отношении конформационной структуры гемагглютинина

## **2.4. Антигенное картирование гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской линии с использованием моноклональных антител.**

### **2.4.1. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса гриппа В/Брисбен/46/15**

В результате секвенирования молекулы НА эскейп-мутантов вируса гриппа В/Брисбен/46/15 в сравнении со штаммом дикого типа были выявлены аминокислотные замены в двенадцати положениях и у двух из них – вставки в положениях 168 и 169. Установлено, что большинство замен были расположены в областях, формирующих рецептор-связывающий сайт (РСС) вируса гриппа В, а именно в петле–140, петле–240 и спирали–190. Были идентифицированы АК замены в петле–160, а также в петле–120 и прилегающих областях. Кроме того, у двух ЭМ 6А4 и ЕМ 9G5/1 были обнаружены вставки (инсерции) в положениях 168 и 169 (петля–160).

*Характеристика ЭМ к вируснейтрализующим МКА 7С8 и 7D9.* В проведенных исследованиях было обнаружено, что ряд ЭМ, отобранных с использованием разных МКА, имели идентичные аминокислотные замены.

В частности, ЭМ 7D9/1, 7D9/2 и 7С8/2 имели замену лизина на глутаминовую кислоту в положении 75 (K75→E), в то время как ЭМ 7С8/1 имел замену G74→E. Аминокислотный остаток в положении 75 расположен в области, прилегающей к петле–120, и вовлечен в антигенный сайт ВЕ. АКЗ в положении 74, вероятно, входит в эту же антигенную область, но ранее не была идентифицирована. В 2017 году выявлен ряд штаммов (В/Гонконг/245/17 и др.) с заменой K75→E.

*Характеристика ЭМ к МКА 8А8, 6А9 и 10F1.* Анализ ЭМ 8А8/1, 8А8/2 и 6А9/1, показал, что они приобрели единичную аминокислотную замену треонина на изолейцин в положении 121 (T121→I). Этот аминокислотный остаток расположен петле –120. ЭМ 6А9/2, 6А9/3 и 10F1 имели единичную замену T182→K. Как известно, аминокислотные остатки в положениях 121 и 182 входят в антигенный сайт ВD.

*Характеристика ЭМ к МКА 7G9.* Установлено, что три ЭМ 7G9/1, 7G9/2 и 7G9/3 имели единичную АКЗ H122→N. АК остаток в положении 122 расположен в петле–120 также входит в антигенный сайт ВD. Известно, что петля–120 представляет собой антигенный сайт вирусов гриппа В, включающий в себя аминокислотные остатки в положениях 116-137, а также прилегающие к ней регионы вне петли (АК остатки 48, 56, 75, 177, 179-181)

*Аминокислотные замены в ЭМ к МКА 6E11, 9B5 и 10D3.*

Анализ ЭМ 6E11/1, 6E11/2, 9B5/1, 9B5/, 10D3/1 и 10D3/2, показал, что они имели единичную аминокислотную замену треонина на пролин в положении 168 (петля -160).

ЭМ к МКА 6А4, 9G5 и 7Н8. Установлено, что ЭМ 6А4 и ЭМ 9G5/1 имели вставки N168 и K169 в петле-160, в то же время ЭМ 9G5/2 и ЭМ 7Н8 несли замену G206→R (рис. 6). Петля-160 является единственной областью в гемагглютинине вируса гриппа В, где вставки и делеции неоднократно обнаруживались у вирусов гриппа В Ямагатской ЭЛ, выделенных в разные эпидемические сезоны.

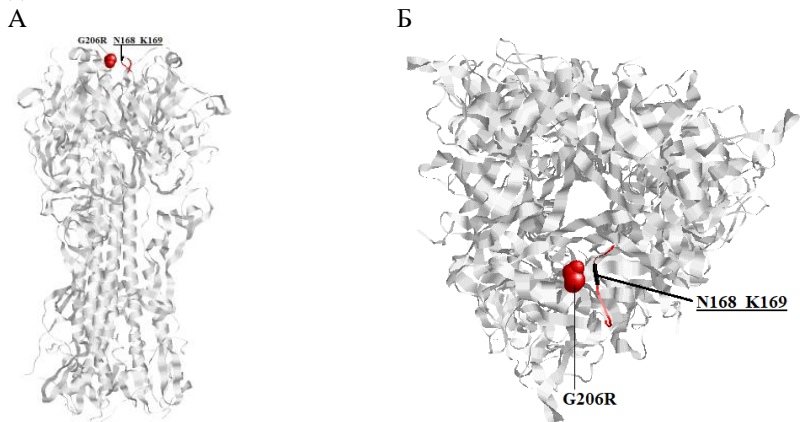


Рисунок 6 – Локализация аминокислотных инсерций и замен в молекуле HA1 ЭМ 6А4 (вставка N168 и K169), ЭМ 9G5/1(вставка N168 и K169), ЭМ 9G5/2 и ЭМ 7Н8 (G206→R) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных эпитопов в молекуле HA1 была построена на основе идентификации эпитопов в составе ЭМ и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы HA вируса гриппа В/Брисбен/60/08, PDB code: 4FQM [Dreyfus C. et al., 2012], с использованием программы RasMol, версия 2.7.4.2. Здесь и далее – на рис. 6, 8 – 10: петля-120 обозначена оранжевым, петля-140 – желтым, петля-160 – красным, петля-240 – зеленым, спираль-190 – голубым, А – вид сбоку, Б – вид сверху; HA нумерация В/Брисбен/46/15.

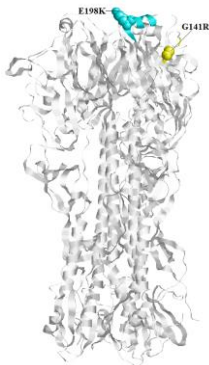
Анализ более 11 тысяч последовательностей гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ, полученных из базы данных GISAID, выявил только один штамм с инсерциями – В/Perth/58/2012. Данный изолят имел две аминокислотные вставки N168 и K169, как и ЭМ 6А4 и ЭМ 9G5/1 (рис. 7)

<u>В/Brisbane/46/15 wt</u>	(151)	KIGTS	G	SCPN	I	T	N	G	N	G	F	F	A	T	M	A	V	P	K	N	D	K	N	K	---	T	A	T	N	P	L	T	I	E	V	P	Y	I	C	T	E	
<u>В/PERTH/58/2012</u>	(151)	KIGTS	G	SCPN	V	T	N	G	N	G	F	F	A	T	M	A	V	P	K	N	D	K	N	K	N	K	T	A	T	N	P	L	T	I	E	V	P	Y	I	C	T	E
<u>ЭМ 9G5/1</u>	(136)	KIGTS	G	SCPN	I	T	N	G	N	G	F	F	A	T	M	A	V	P	K	N	D	K	N	K	N	K	T	A	T	N	P	L	T	I	E	V	P	Y	I	C	T	E
<u>ЭМ 6А4</u>	(127)	KIGTS	G	SCPN	I	T	N	G	N	G	F	F	A	T	M	A	V	P	K	N	D	K	N	K	N	K	T	A	T	N	P	L	T	I	E	V	P	Y	I	C	T	E

Рисунок 7 – Выравнивание аминокислотных последовательностей, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа В/Брисбен/46/15 дикого типа, эскейп-мутантов В/Брисбен/46/15 и вируса В/Perth/58/2012

*ЭМ к МКА 11G2.* Анализ ЭМ 11G2/1 и 11G2/2 показал, что ЭМ 11G2/1 имел аминокислотную замену глицина на аргинин (141G→R) в положении 141, а ЭМ 11G2/2 – глутаминовую кислоту на лизин (E198→K) (рис. 8). Примечательно, что обе аминокислотные замены располагаются в рецептор-связывающем кармане гемагглютинаина, но при этом находятся в двух различных областях: 141G→E в петле-140, тогда как, E198→K - в спирали-190.

А



Б

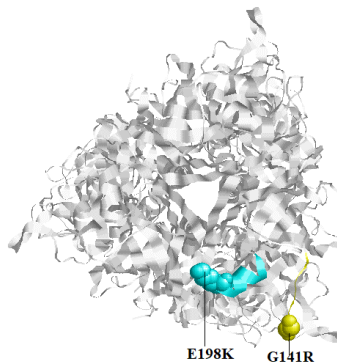


Рисунок 8 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 11G2/1 (141G→R) и 11G2/2 (E198→K) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

*ЭМ к МКА 11G10.* В результате клонирования вируса дикого типа В/Брисбен/46/15 в присутствии МКА 11G10 был получен только один ЭМ, имеющий аминокислотную замену в положении Т199→I. Остаток в положении 199 также входит в состав спирали-190, которая формирует верхнюю кромку рецептор-связывающего кармана гемагглютинаина вируса гриппа В. Интересно, что у ряда современных природных изолятов были выявлены сходные аминокислотные замены, в частности, Т199→N/I.

*Анализ ЭМ 10B6/1 и 10B6/2* показал появление у них единичной АКЗ - Q200→R, входящей в состав спирали-190 гемагглютинаина. Положение 200 в HA консервативно, и глутамин присутствует в ~99.7 % в популяции вирусов гриппа В. Моделирование показало, что длинные боковые цепи Lys200 или Arg200 блокируют левую сторону рецептор-связывающего кармана. Таким образом, эти замены существенно сужают горизонтальные границы рецептор-связывающей области [Carbone V. et al., 2013].

*ЭМ к МКА 10D9.* Обе аминокислотные замены у ЭМ 10D9/1 и 10D9/2 располагаются в рецептор-связывающем кармане гемагглютинаина, но при этом, находятся в двух различных областях: АКЗ G141→R в петле-140, тогда как АКЗ P241→T в петле-240 (рис. 9).

Б

А

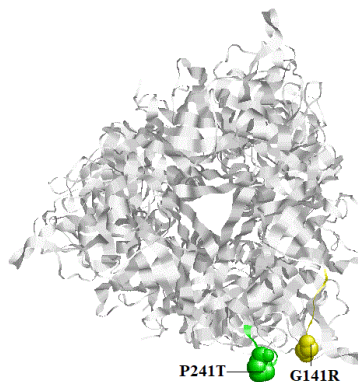


Рисунок 9 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 10D9/1 и 10D9/2 (G141→R и P241→T) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Остаток HA1 241, по-видимому, является частью антигенного сайта гемагглютинина вируса гриппа В.

Таким образом, установлено, что выявленные в данном исследовании аминокислотные остатки расположены в петле–120, петле–140, петле–160, петле–240, спирали–190 и прилегающих к этим регионам областях. Большинство из идентифицированных позиций вовлечены в формирование рецептор-связывающего кармана гемагглютинина вируса гриппа В.

#### ***2.4.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вирусов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04***

В результате проведенных исследований было обнаружено, что ряд ЭМ, отобранных с помощью МКА, полученных к двум разным штаммам вируса гриппа В (В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04), имели идентичные АКЗ, локализованные в сайтах BD и BV1. Так, ЭМ 5B7 вируса гриппа В/Шандонг/07/97 и ЭМ 11F8 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 имели одну и ту же АКЗ (H122N), а ЭМ В/4Н1/4 и В/4Н1/6 вируса гриппа В/Шандонг/07/97, а также ЭМ 9С1 и ЭМ 9F1/2 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 - в положении 203. При этом лизин, присутствующий в данном положении у вирусов дикого типа, у полученных ЭМ В/4Н1/4, В/4Н1/6, 9С1 и 9F1/2 был заменен на разные аминокислотные остатки - К203Т, К203I, К203R и К203N, соответственно. Другой ЭМ - 9F1/1 имел две АКЗ: А202Е и А317V (рис.10).

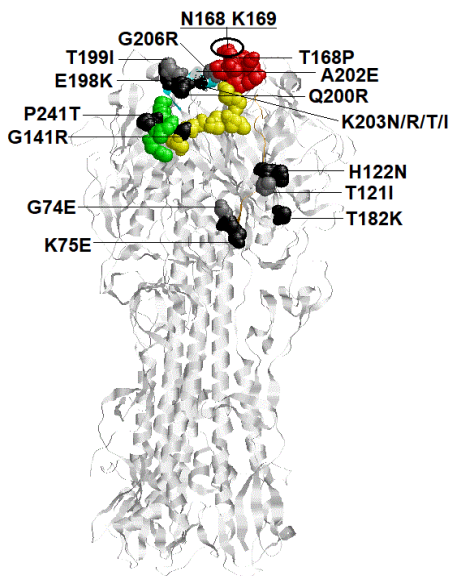


Рисунок 10 – Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов вирусов гриппа В/Брисбен/46/15, В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской эволюционной линии.

Впервые идентифицированный нами эпитоп в положении 317 не был ранее указан ни в одной из известных на данный момент антигенно значимых областей HA1 вируса гриппа В, хотя в ряде работ [Лобова и др., 2012., Lindstrom et al., 1999] показаны АКЗ в положениях 313 и 314 в HA1 природных дрейф-вариантов вируса, которые находятся в непосредственной близости от идентифицированной нами АКЗ (A317V) в составе ЭМ 9F1/1.

Таким образом, выполненные исследования дали возможность четко локализовать иммунодоминантные сайты в составе молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской линии, позволяющие вирусу ускользать от специфического связывания с антителами. При этом весьма важной является замена K203T, обуславливающая резистентность вируса к взаимодействию с разнонаправленными нейтрализующими моноклональными антителами. Можно предположить, что штаммы с такой заменой могут быть в меньшей мере подвержены селективному иммунопрессингу, в связи с чем имеют большие перспективы длительной циркуляции в человеческой популяции, что немаловажно учитывать при отборе штаммов в состав вакцин.

## 2.5. Влияние единичных аминокислотных замен в гемагглютинине вируса гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной линии на рецептор-связывающие свойства.

Известно, что первичным звеном в развитии инфекционного процесса является связывание НА вирусов гриппа В с экспрессированными на поверхности хозяйской клетки углеводными цепями. Для изучения влияния АКЗ в молекуле НА на эффективность рецепторного взаимодействия полученные ЭМ были трижды ретестированы в РГА с эритроцитами различных видов животных – курицы (содержат SA  $\alpha 2,3$  Gal и SA  $\alpha 2,6$  Gal рецепторы), морской свинки (содержат преимущественно SA  $\alpha 2,6$  Gal рецепторы) и лошади, которые содержат только SA  $\alpha 2,3$  Gal рецепторы [Ito T. et al., 1997]. При этом установлено, что вирус дикого типа В/Флорида/04/06 практически не взаимодействовал с эритроцитами лошади, что свидетельствовало о преимущественном связывании этого штамма с SA  $\alpha 2,6$  Gal рецепторами. Аналогичным образом вели себя и его ЭМ - 8Н11 и 10F4. Однако ЭМ 8Н3 с заменой N202K и ЭМ 9А3 с заменой S242R приобрели не свойственную дикому вирусу способность реагировать с SA  $\alpha 2,3$  Gal рецепторами эритроцитов лошади (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние аминокислотных замен в гемагглютинине эскейп – мутантов вируса гриппа В/Флорида/04/06 на рецепторную специфичность.

Вирусы эскейп-мутанты	Титр в РГА с эритроцитами:			Аминокислотные замены
	курицы (SA $\alpha 2,3$ Gal и SA $\alpha 2,6$ Gal рецепторы)	морской свинки (SA $\alpha 2,6$ Gal рецепторы)	лошади (SA $\alpha 2,3$ Gal рецепторы)	
<b>В/Флорида/04/06 (wt)</b>	1/128	1/128	$\leq 1/2$	<b>нет</b>
ЭМ 8Н3	1/128	1/64	<b>1/64</b>	<b>N202K</b>
ЭМ 8Н11	1/128	1/128	$< 1/2$	<b>H85Y</b>
ЭМ 9А3	1/128	1/64	<b>1/8-1/16</b>	<b>S242R</b>
ЭМ 10F4	1/64	1/64	$< 1/2$	<b>Y40H</b>

Ранее было высказано предположение, что четыре аминокислотных остатка (N163, E198, A202 и K203) потенциально могут играть принципиально важную роль в процессе узнавания SA  $\alpha 2,3$  Gal связей [Wang Y.-F. et al., 2012]. Аминокислотный остаток в положении 202 у штамма В/Флорида/04/06 Ямагатской линии соответствует позиции 203 у Викторианских вирусов. Таким образом наши данные по замене

аспарагина на лизин в 202(203) положении подтверждают справедливость данного предположения. При этом данная замена не влияла существенно на связывание с SA  $\alpha$ 2,6 Gal рецепторами. АКЗ S242R (у ЭМ 9A3) расположена в составе петли – 240. Петля – 240 и спираль – 190 локализованы на мембранно-дистальном конце молекулы HA и формируют вершину и левую кромку рецептор-связывающего кармана. Предполагается, что переориентация боковых цепей в петле 240 может сильно изменять и антигенные свойства этого региона [Ni F. et al., 2013]. Между S242 и P240 существует дополнительная водородная связь и, вероятно, замена серина на аргинин в положении 242 изменяет не только антигенные, но и рецепторные свойства вируса. Действительно, ЭМ 9A3 потерял способность взаимодействовать с МКА 8H3, что подтверждает предположение о взаимном влиянии аминокислотных остатков, входящих в петлю – 240 и спираль – 190.

Таким образом нами показано, что аминокислотные остатки в положении 202 и 242 HA вируса гриппа ВЯмагатской линии оказывают значимое влияние на рецептор-связывающие свойства вируса. Наличие основных АК (лизина или аргинина) в этих положениях сообщает вирусу способность взаимодействовать с SA  $\alpha$ 2,3- Gal рецепторами.

## **2.6. Влияние аминокислотных замен в гемагглютинине вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии на рецептор-связывающие свойства**

Изучено влияние АКЗ в молекуле HA вируса В/Шандонг/07/97 на рецепторную специфичность вирусов Викторианской линии с использованием той же методологии, что и для вирусов Ямагатской линии. Исходный штамм В/Шандонг/07/97 взаимодействовал с эритроцитами всех трех видов животных, что свидетельствовало о связывании данного вируса с обоими типами рецепторов. Однако, единичные АКЗ в HA у ЭМ В/4H1(4) (K203T) и ЭМ В/4H1(6) (K203I) этого вируса приводили к утрате его способности связываться с SA  $\alpha$ 2,3 Gal рецепторами эритроцитов лошади. Аналогичным образом вел себя и ЭМ 9F1(2) вируса В/Малайзия/2506/04, также имевший замену лизина в положении 203 (K→N), тогда как дикий тип этого вируса взаимодействовал с обоими типами рецепторов. Необходимо отметить, что ЭМ 5B7 и 11F8 вирусов В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 с одинаковой аминокислотной заменой H122N, но не имевшие АКЗ в 203 положении, не отличались от штаммов дикого типа по характеру взаимодействия в РГА со всеми видами эритроцитов (таблица 2).

Таблица 2 - Влияние аминокислотных замен в молекуле гемагглютинина эскейп – мутантов вирусов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 на рецепторную специфичность

Вирусы и эскейп-мутанты	Титр в РГА с эритроцитами:			Аминокислотные замены
	курицы (SA $\alpha 2,3$ Gal и SA $\alpha 2,6$ Gal рецепторы)	морской свинки (SA $\alpha 2,6$ Gal рецепторы)	лошади (SA $\alpha 2,3$ Gal рецепторы)	
<b>В/Шандонг/07/97 (wt)</b>	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>128</b>	-
EM 5B7	1024	512	256	H122N
EM В/4Н1(4)	256	512	<2	<b>K203T</b>
EM В/4Н1(6)	256	256	<2	<b>K203I</b>
<b>В/Малайзия/2506/04 (wt)</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>16</b>	-
EM 9F1(1)	512	256	<2	<b>A202E, A317V</b>
EM 9F1(2)	512	128	<2	<b>K203N</b>
EM 11F8	256	64	16	H122N

Сказанное позволило предположить, что АКЗ в 203 положении играют важную роль в связывании HA с SA  $\alpha 2,3$  Gal рецепторами. Еще один ЭМ 9F1(1), содержащий две АКЗ (A202E и A317V) также утратил способность взаимодействовать с SA  $\alpha 2,3$  Gal рецепторами. Известно, что аминокислотные остатки в положениях 202 и 203 расположены в мембранно-дистальном конце молекулы HA, входят в спираль 190 и включены в состав рецептор-связывающего кармана вируса гриппа В. По-видимому, аланин в положении 202, как и лизин в положении 203, имеет принципиально важное значение для связывания HA с SA  $\alpha 2,3$  Gal рецепторами, что еще раз подтверждает гипотезу [Wang et al., 2012].

#### **Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации.**

Существенный теоретический интерес с точки зрения формирования вероятностных прогностических критериев распространения тех или иных вариантов вируса гриппа В представляет продолжение исследований по эпитопному картированию молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В с отслеживанием появления аналогов полученных ЭМ среди естественно циркулирующих вирусов. На основании полученных результатов планируется также провести более детальное изучение влияния единичных аминокислотных замен в HA1 вирусов на рецептор-



связывающие свойства этого белка, в том числе, с использованием синтетических аналогов рецепторов.

### ВЫВОДЫ

- 1) Получены панели вируснейтрализующих моноклональных антител, направленных к молекуле гемагглютинаина вирусов гриппа В Викторианской и Ямагатской эволюционных линий, обладающих высокой вируснейтрализующей и антигемагглютинирующей активностью.
- 2) С использованием разработанных МКА селекционированы эскейп-мутанты вируса гриппа В обеих эволюционных линий. Определены нуклеотидные и аминокислотные последовательности в молекуле гемагглютинаина полученных ЭМ. Идентифицированы неизвестные ранее иммунодоминантные эпитопы в составе ЭМ.
- 3) Построены трехмерные модели гемагглютинаина вирусов гриппа В обеих эволюционных линий с указанием локализации идентифицированных антигенных детерминант. Установлено, что большинство аминокислотных замен в НА эскейп-мутантов локализовано в антигенных сайтах вирусов гриппа В обеих эволюционных линий и расположено, как правило, в зоне рецептор-связывающего кармана.
- 4) Показана дискретность антигенных сайтов гемагглютинаина, ответственных за связывание с вируснейтрализующими антителами у вирусов гриппа В обеих эволюционных линий
- 5) Впервые у эскейп-мутантов вирусов гриппа В Викторианской линии выявлены инсерции (вставки) в петле-160 в положениях 168 и 169, обусловившие изменение антигенных свойств вируса.
- 6) В составе эскейп-мутантов вирусов гриппа В Ямагатской линии выявлены замены (N202K и S242R), изменяющие рецепторную специфичность вирусов, сообщая им способность взаимодействовать с SA  $\alpha$ 2,3 Gal рецепторами. Напротив, замены A202E и K203T/N в гемагглютинине Викторианских штаммов приводили к утрате взаимодействия с SA  $\alpha$ 2,3 Gal рецепторами.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сорокин Е.В. . Моноклональные антитела к гемагглютинуину вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии / Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Желтухина А.И. // Вопросы вирусологии. 2018. - Т. 63. - № 6. - С. 275-280.

2. Sorokin E. Neutralizing epitopes in receptor binding site of hemagglutinin influenza B viruses Yamagata lineage / Sorokin E., Tsareva T., Komissarov A., Komissarova K., Egorova A., Sominina A. // International

conference “Trends in Influenza Research”, Saint-Petersburg, Russia, September 18-20, 2017, - p. 140-141.

4. Sorokin E.V. Influence of single amino acid substitutions in the hemagglutinin on antigenic and receptor-binding properties of influenza virus B/Florida/04/2006 of Yamagata-like evolutionary lineage / Sorokin E.V., Tsareva T.R., Sominina A.A., Pisareva M.M., Komissarov A.B., Kosheleva A.A. // *Microbiology Independent Research Journal*. - 2016. - № 3. - P. 56-60.

5. Сайтгалина М.А. Характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской эволюционной линии / Сайтгалина М.А., Сорокин Е.В., Царева Т.Р. // В сборнике: Неделя науки СПбПУ материалы научного форума с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций; В.Э. Гасумянц, Д.Д. Каров - ответственные редакторы. - 2015. - С. 405-407.

6. Соминина А.А. Новые моноклональные антитела для диагностики гриппа и других ОРВИ / Соминина А.А., Сорокин Е.В., Царева Т.Р. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. -2015. -Т. 14. -№ 5 (84).- С. 72-76.

7. Sorokin E. Effect of single amino acid substitutions in the hemagglutinin on the receptor-binding properties of influenza B viruses / Sorokin E., Tsareva T., Sominina A., Pisareva M., Komissarov A., Kosheleva A. // *Journal of Clinical Virology*, -2015, -Vol. 70, -Supplement 1, - P. S29,

8. Сорокин Е.В. Эпитопный анализ молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской линии / Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Соминина А.А., Писарева М.М., Комиссаров А.Б., Кошелева А.А., Груднин М.П. // *Вопросы вирусологии*. - 2014. -Т. 59. № 6. - С. 27-31.

9. Сорокин Е.В. Эпитопное картирование молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В линии Ямагата с использованием моноклональных антител / Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Соминина А.А., Писарева М.М., Комиссаров А.Б., Кошелева А.А. // *Фундаментальные исследования*. - 2014. - № 9-1.- С. 100-104.

10. Sorokin E., Tsareva T., Sominina A., Pisareva M., Komissarov A., Kosheleva A. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of influenza B/Yamagata and B/Victoria lineage viruses using monoclonal antibodies / Sorokin E., Tsareva T., Sominina A., Pisareva M., Komissarov A., Kosheleva A. // *The fifth ESWI influenza conference, 14-17 September, - 2014, Riga, SPB5P08, - p. 151*

11. Sorokin E.V. Identification of neutralizing epitopes in hemagglutinin molecule of influenza B virus / Sorokin E.V., Tsareva T.R., Pisareva M.M., Sominina A.A. // *Preparedness to the influenza pandemic – an international outlook, St.-Petersburg, Russia, March 15-17, - 2007, - p. 31-32*

12. Sorokin E.V. Identification of epitopes in hemagglutinin and nucleoprotein of influenza B viruses / Sorokin E.V., Tsareva T.R., Lobova T.G.

Pisareva M.M. Sominina A.A. // Options for the control of influenza VI, June 17-23, - 2007, Toronto, Ontario, Canada, P 810, - p. 211

13. Сорокин Е.В. Молекулярно-генетическая идентификация вируснейтрализующих сайтов в составе тяжелой цепи гемагглютинаина вируса гриппа В / Сорокин Е.В., Писарева М.М Царева Т.Р. Соминина А.А. // Сборник трудов 6-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2007», Москва, 28-30 ноября, - 2007, - том II, - с. 402-403

Патенты на изобретения Российской Федерации

1. Патент 2491338 РФ, МПК C12N C07K G01N. Применение моноклональных антител для идентификации Ямагатской или Викторианской эволюционных линий вируса гриппа типа В, штамм гибридомы 4Н7 для получения моноклональных антител, предназначенных для определения вирусов гриппа В Ямагатской ветви, штамм гибридомы В/4Н1 для получения моноклональных антител, предназначенных для определения вирусов гриппа В Викторианской ветви [Текст] / Е. В. Сорокин, Т. Р. Царева, А. А. Соминина, О. И. Киселев; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава России. - 2011127014/10, заявл. 30.06.2011, опубликовано: 27.08.2013, Бюл. № 24.

**БЛАГОДАРНОСТИ:**

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, д.м.н., профессору Сомининой Анне Адольфовне за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы.

Автор искренне благодарен всем соавторам печатных работ и помощь в проведении исследований. Особую признательность хочу выразить сотрудникам ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России Т.Р. Царёвой, М.М. Писаревой, А.Б. Комиссарову, А.А. Ивановой, К.С. Комиссаровой, А.В. Фадееву, А.И. Желтухиной и Р.А. Кадыровой за помощь и участие в настоящей работе. Выражаю также свою благодарность д.б.н. В.З. Кривицкой и к.м.н Коноваловой Н.И за ценные советы и плодотворные дискуссии.