

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА им.
А.А.СМОРОДИНЦЕВА»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук
профессор
Соминина А.А.

Санкт-Петербург

2021

Оглавление

Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	14
1.1. Структура и функции белков вирусов гриппа В.....	14
1.2. Антигенная структура гемагглютиниона вирусов гриппа В.....	19
1.3. Рецептор-связывающий сайт гемагглютиниона вирусов гриппа В.....	26
1.4. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В.....	34
1.4.1. Делеции и инсерции.....	35
1.4.2 Реассортация генов.....	35
1.4.3. Резервуар генов вирусов гриппа В в природе.....	38
1.5. Антигенное картирование молекулы гемагглютиниона вирусов гриппа с использованием моноклональных антител.....	39
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	44
2.1. Получение аллантоисной жидкости, содержащей вирусы гриппа.....	44
2.2. Очистка и концентрация вирусов.....	44
2.3. Определение концентрации белка.....	44
2.4. Реакция гемагглютинации (РГА), реакция торможение гемагглютинации (РТГА).....	45
2.5. Получение гибридом.....	45
2.6. Получение асцитных жидкостей.....	45
2.7. Оценка свойств полученных моноклональных антител в непрямом варианте ИФА.....	46
2.8. Определение изотипов моноклональных антител.....	46
2.9. Оценка нейтрализующей активности противовирусных антител в микрокультуральном ИФА.....	46
2.10. SDS-электрофорез.....	47
2.11. Иммуноблоттинг МКА.....	48
2.12. Клонирование эскейп – мутантов.....	48

2.13. Секвенирование эскейп – мутантов.....	48
Глава 3. Результаты исследования.....	50
3.1. Характеристика моноклональных антител к вирусам гриппа В Ямагатской эволюционной линии.....	50
3.1.1 Характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 (генетическая линия 2) Ямагатской эволюционной линии в ИФА.....	50
3.1.2. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской эволюционной линии в РТГА.....	50
3.1.3. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской эволюционной линии в реакции нейтрализации.....	53
3.1.4. Определение направленности МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской линии в иммуноблоттинге.....	53
3.1.5. Определение изотипов IgG МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской эволюционной линии.....	54
3.1.6. Характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной линии.....	55
3.1.7. Определение изотипов IgG МКА к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной линии.....	58
3.1.8. Заключение.....	58
3.2. Антигенное картирование гемагглютиниона вирусов гриппа Ямагатской линии с использованием моноклональных антител.....	58
3.2.1. Клонирование эскейп–мутантов вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием моноклональных антител.....	58
3.2.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютиниона вируса гриппа В/Массачусетс/2/12.....	59
3.2.2.1. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютиниона вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 1G4, 2B10 и 3C2.....	60

3.2.2.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютини́на вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 4E11.....	61
3.2.2.3. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютини́на вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 1G9.....	62
3.2.2.4. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютини́на вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 3B12.....	63
3.2.2.5. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютини́на вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 5B11.....	64
3.2.2.6. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютини́на вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 5F11.....	65
3.2.2.7. Влияние аминокислотных замен в составе молекулы гемагглютини́на ЭМ вирусов гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской линии на характер взаимодействия с МКА.....	67
3.2.3. Антигенное картирование молекулы гемагглютини́на вируса гриппа В/Флорида/04/06 с использованием моноклональных антител.....	71
3.2.3.1. Влияние аминокислотных замен в составе молекулы гемагглютини́на ЭМ вирусов гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской линии на характер взаимодействия с МКА.....	72
3.2.4. Заключение.....	74
3.3. Характеристика моноклональных антител к вирусам гриппа В Викторианской эволюционной линии.....	74
3.3.1. Характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 (генетическая линия 1А) Викторианской эволюционной линии в ИФА.....	75

3.3.2. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии в РТГА.....	75
3.3.3. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии в реакции нейтрализации.....	82
3.3.4. Определение направленности МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/ Викторианской эволюционной линии в иммуноблоттинге.....	84
3.3.5. Определение изотипов IgG МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии.....	84
3.3.6. Характеристика МКА, полученных к вирусу гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской эволюционной линии.....	85
3.3.7. Определение изотипов IgG МКА к вирусам гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской эволюционной линии.....	88
3.3.8. Заключение.....	88
3.4. Антигенное картирование гемагглютининов вирусов гриппа В Викторианской линии с использованием моноклональных антител.....	89
3.4.1. Клонирование эскейп-мутантов вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием моноклональных антител.....	89
3.4.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютининов вируса гриппа В/Брисбен/46/15.....	89
3.4.2.1. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютининов вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 7С8 и 7D9.....	91
3.4.2.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютининов вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 8А8, 6А9 и 10F1.....	92
3.4.2.3. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютининов вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 7G9.....	93

3.4.2.4. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 6E11, 9B5 и 10D3.....	94
3.4.2.5. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 6A4, 9G5 и 7H8.....	95
3.4.2.6. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 11G2.....	97
3.4.2.7. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 11G10.....	98
3.4.2.8. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 10B6.....	99
3.4.2.9. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 10D9.....	100
3.4.2.10. Влияние аминокислотных замен в составе молекулы гемагглютинаина ЭМ вирусов гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской линии на характер взаимодействия с МКА.....	102
3.4.3. Идентификация иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вирусов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04.....	106
3.4.3.1. Влияние аминокислотных замен в составе гемагглютинаина ЭМ вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии на характер их взаимодействия с МКА.....	107
3.4.4. Заключение.....	110
3.5.1. Влияние единичных аминокислотных замен в гемагглютинине вируса	

гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной линии на рецептор-связывающие свойства.....	110
3.5.2. Влияние единичных аминокислотных замен в гемагглютинине вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии на рецептор-связывающие свойства.....	114
3.5.3. Заключение.....	116
Обсуждение.....	117
Выводы.....	129
Список сокращений.....	130
Список литературы.....	131
Приложение А.....	159
Приложение Б.....	161
Приложение В.....	163
Приложение Г.....	164
Приложение Д.....	168

Введение

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] и особенно связаны, в частности, с тяжелыми заболеваниями у детей [Garg S. et al., 2013]. Хотя показатели госпитализации и смертности, связанные с гриппом В, ниже, чем для субтипа А (H3N2), они были выше, чем у менее вирулентного сезонного вируса гриппа А(H1N1)pdm09 [McCullers J., 2012]. Хотя существует общее мнение, что заболевания, вызываемые вирусами гриппа В, протекает более мягко, по сравнению с гриппом А, фактические данные показывают, что эти инфекции клинически практически неразличимы [Hong K. et al., 2015; Irving S. et al., 2012]. Эпидемии затрагивают все возрастные группы, но частота осложнений при гриппе, как правило, выше у детей младшего возраста и

пожилых людей. При этом, более высокие показатели осложнений и смертности наблюдаются у пожилых людей вследствие сопутствующих хронических заболеваний. [Matias G. et al., 2014].

Несмотря на значимость вирусов гриппа В для общественного здравоохранения, их эпидемиологические характеристики и их глобальная эволюционная и антигенная динамика изучены хуже по сравнению с вирусами гриппа А [Tan Y. et al., 2013; 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; Rota P. et al., 1990]. Линии Ямагата и Виктория имели сложную эволюционную историю с момента их расхождения, социркулируя по всему миру по меньшей мере с 2002 года [Lo Y-C. et al., 2013].

В ряде исследований были определены генетические и эволюционные характеристики вирусов гриппа В в определенных географических регионах [Tan Y. et al., 2013; Nakagawa N. et al., 2009; Roy T. et al., 2011; Oong X. et al., 2015; Sam I-C. et al., 2015; Tewawong N. et al., 2015; Seleka M. et al., 2017; Sharabi S. et al., 2018; Yang J. et al., 2018; Todd S. et al., 2018; Cortes-Alcala R. et al., 2018; Gentile A., et al. 2018; Nguenha N. et al., et al. 2018; Varghese B. et al., 2018; Caini S. et al., 2018], однако эволюционная динамика вирусов гриппа В на общегеномном уровне в глобальном масштабе еще мало исследована [Chen R. et al., 2008; Dudas G. et al., 2015; Vijaykrishna D. et al., 2015; Bedford T. et al., 2015]. Тем не менее, существующие представления об эволюционной динамике вирусов гриппа В показывают, что они подвергаются более медленной эволюции, чем вирусы гриппа А [Bedford T. et al., 2014, 2015]. Генетические изменения включают нуклеотидные вставки, нуклеотидные делеции и реассортацию между и внутри линий, способствуя их продолжающейся диверсификации [Chen R. et al., 2008, Dudas G. et al., 2015, McCullers J. et al., 1999, Nerome R. et al., 1998]. Недавние исследования

показали, что гены полимеразного комплекса (PB1 и PB2) и гемагглютинина (HA) вирусов Викторианской и Ямагаткой ветвей остаются в виде отдельных линий, несмотря на высокий уровень общей реассортации, вероятно, вследствие геномной несовместимости между сегментами вирусного генома [Dudas G. et al., 2015; Kim J. et al., 2016]. Предполагается, что вирусы Викторианской линии подвергаются более быстрому антигенному дрейфу [Vijaykrishna D. et al., 2015] и дольше сохраняются в локальных географических зонах до 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 гемагглютинаина (HA1), ответственные за индукцию синтеза вируснейтрализующих антител.
- Провести эпитопное картирование гемагглютинаина вирусов гриппа В обеих эволюционных линий с построением трехмерных моделей гемагглютинаина.
- 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 гемагглютинаина 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 эпитопном 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 гемагглютиниона эскейп-мутантов вирусов гриппа В, относящихся к Ямагатской и Викторианской эволюционным линиям, позволило выявить ранее не идентифицированные иммунодоминантные эпитопы в составе молекулы гемагглютиниона.
- 3) Установлено, что эпитопы, ответственные за связь с вируснейтрализующими антителами, могут находиться в двух разных антигенных сайтах гемагглютиниона вирусов гриппа В
- 4) Документировано, что антигенная изменчивость современных вирусов гриппа В Викторианской линии может осуществляться за счет инсерций аминокислотных остатков в составе гемагглютиниона.
- 5) Аминокислотные замены в положениях 202 и 242 гемагглютиниона 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 гемагглютинаина 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.

Обзор литературы

1.1. Структура и функции белков вирусов гриппа В

В 1940 году вспышка острого респираторного заболевания у детей с клиническими проявлениями, сходными для вируса гриппа А (ВГА), привела к изоляции нового вируса, который был серологически отличен от известных штаммов гриппа А. Этот новый вирус гриппа был назван вирусом гриппа В [Francis T. Jr., 1940]. В настоящее время хорошо известно, что ВГА и вирусы гриппа В (ВГВ) ежегодно циркулируют среди населения и вызывают респираторные заболевания с различным уровнем тяжести.

ВГВ принадлежат к семейству ортомиксовирусов. Геном вируса представлен минус-нитевой фрагментированной молекулой РНК. ВГВ имеют восемь сегментов и кодирует три полимеразных белка (РА, РВ1 и РВ2), нуклеопротеин (NP), неструктурный белок (NS1), ядерный экспортный белок (NEP, иногда называемый NS2), матриксный белок (M1), белок М2, формирующий ионный канал, и три поверхностных гликопротеина (НА, NA и NB). Геном ВГВ не кодирует ни один из «вспомогательных» белков ВГА, таких как РВ1-F2 или РА-X [Krumbholz A., et al., 2011; Shi M., et al., 2012]. Белки ВГА и ВГВ обычно показывают существенные различия в длине, аминокислотном составе и функциях [Jackson D., et al., 2011]. ВГВ в настоящее время разделены на две генетически и антигенно отличные линии, В/Victoria/2/1987 подобные и В/Yamagata/16/1988 подобные вирусы [Rota P. et al., 1990; McCullers J. et al., 2004; Vijaykrishna D, et al., 2015].

Белки полимеразного комплекса РА, РВ1 и РВ2. Несмотря на обширную информацию о полимеразных белках ВГА, данные о полимеразных белках ВГВ очень ограничены. Было обнаружено, что РВ2 преимущественно локализуется в ядре, тогда как РВ1 и РА локализованы как в ядре, так и в цитоплазме. Парные взаимодействия для всех трех белков также наблюдались и локализовались в ядре. Эта картина сходна с тем, что наблюдалось для полимеразных белков вируса гриппа А [Deng Q. et al.,

2011]. При наличии несомненного сходства белков PA, PB1 и PB2 у вирусов гриппа А и В имеются и ключевые отличия. Основным отличием между полимеразы вирусов гриппа А и В является их механизм связывания с кэпом. В частности, полимеразы вируса гриппа В могут связываться и расщеплять как m7G-кэпированные, так и неметилованные G-кэпированные мРНК. Это контрастирует с полимеразы вируса гриппа А, которые связываются исключительно с m7G-кэпированными мРНК [Wakai S. et al., 2011]. Т.о., исследования показали, что общая структура и связывание полимераз с вРНК схожи у гриппа А и В [Reich S. et al., 2014], но у вирусов гриппа В есть и уникальные отличия в механизме связывания с кэпом [Liu Y. et al., 2015]. Показано, что полимеразы ВГА играют центральную роль в адаптации к хозяевам и являются одним из факторов патогенности [Medina R. and Garcia-Sastre A., 2011; Cauldwell A. et al., 2014]. Вклад белков PA, PB1 и PB2 ВГВ в патогенность изучен недостаточно. Тем не менее, имеются данные о том, что мутация K338R в PA у ВГВ связана с патогенностью для мышей [Bae J-Y. et al., 2018].

Нуклеопротеин (NP) ВГВ кодируется сегментом 5. Структурные исследования показали, что NP ВГВ состоит из «головки», «тела» и гибкой хвостовой петли. Канавка между головкой и телом содержит расширенную петлю (аминокислотные остатки 125-149), в пределах которой имеются два лизиновых кластера, критических для связывания с РНК. Гибкая хвостовая петля NP ВГВ обеспечивает сборку гомоолигомеров. Высококонсервативный солевой мостик (R472-E395), по-видимому, участвует в стабилизации петли и, следовательно, в сборке гомоолигомеров [Ng A. et al., 2012]. N-концевая часть NP ВГВ представляет особый интерес, поскольку она содержит 50 аминокислот в своем N-конце, которые не найдены в NP ВГА. Показано, что N-конец NP необходим для ядерной локализации и предположено, что мотив K₄₄RTR₄₇ в NP может действовать как сигнал ядерной локализации (NLS) [Wanitchang A. et al., 2013]. Более того, весь N-конец, по-видимому, необходим для оптимальной локализации в ядре во время заражения, и было

высказано предположение, что остатки 51-81 содержат бипартирный NLS [Sherry L., et al., 2014].

Основной функцией нейраминидазы (NA) ВГВ является расщепление сиаловых кислот и высвобождение вирусного потомства с поверхности клетки. Активная форма NA ВГВ представляет собой тетрамер, и каждый мономер содержит два сайта гликозилирования (Asn283 и Asn143). Asn283 специфичен для ВГВ, тогда как Asn143 является консервативным среди вирусов гриппа [Burmeister W. et al., 1992]. Девятнадцать высококонсервативных остатков формируют активный сайт NA ВГВ. Остатки в каталитическом сайте (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 и Y406) непосредственно взаимодействуют с сиаловыми кислотами, в то время как каркасные остатки структурно поддерживают ферментативный активный сайт (E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, H274, E277, N294 и E425).

Белок NB является уникальным для ВГВ, кодируется в шестом сегменте, перекрываясь кодирующей последовательностью NA ВГВ. Стартовый кодон NB расположен на четыре нуклеотида перед стартовым кодоном NA [Williams M. et al., 1989]. NB представляет собой интегральный мембранный гликопротеин из 100 аминокислот, который включен в вирион [Betakova T. et al., 1996]. N-конец содержит два сайта N-гликозилирования, которые дополнительно модифицируются добавлением многочисленных остатков N-ацетилглюкозамина [Williams M. et al., 1988]. Пальмитилирование C-концевых остатков имеет важное значение для распространения NB к поверхности клеток [Demers A. et al., 2014]. До сих пор нет однозначных данных, работает ли NB в качестве ионного канала. Также предполагается, что NB играет роль на поздних стадиях заражения ВГВ. В целом, спустя более 30 лет после открытия NB, его роль и функция остаются не вполне понятными [Koutsakos M. et al., 2016].

Имеется ограниченное количество данных о **матричном белке (M1) ВГВ**, который кодируется сегментом 7. M1 играет важную роль в адаптации ВГВ к мышам и показано значение этого белка у вакцинного штамма-донора

V/Ann Arbor/1/66 для живой аттенуированной вакцины против гриппа В [McCullers J. et al., 2005]. Функциональная роль М1 в жизненном цикле ВГВ не вполне ясна. М1 содержит сигнал ядерной локализации (NLS), два сигнала ядерного экспорта и может действовать как «челночный» белок между ядром и цитоплазмой в инфицированных клетках. Все эти особенности необходимы для функционирования М1, поскольку они были обязательны для производства жизнеспособного вируса [Cao S. et al., 2014].

Как и у ВГА сегмент 7 ВГВ кодирует второй белок, называемый М2. Белок М2 представляет собой небольшой гидрофобный интегральный мембранный белок [Paterson R. et al., 2003], который синтезируется на поздних стадиях инфекции [Odagiri T. et al., 1999]. Белок переносится через TGN на клеточную поверхность [Watanabe S. et al., 2003] и включен в вирионы [Odagiri T. et al., 1999]. N-конец белка, по-видимому, важен для его транспорта внутри инфицированных клеток [Watanabe S. et al., 2003]. Предполагается, что М2 участвует во включении vRNP в вирионы [Imai M. et al., 2004]. Кроме того, М2 необходим для производства жизнеспособного вирусного потомства [Imai M. et al., 2004; Jackson D. et al., 2004; Hatta M. et al., 2004], а уменьшение включения М2 в вирионы снижает инфекционность вируса, что указывая на роль М2, аналогичную роли М2 ВГА [Jackson D. et al., 2004]. Действительно, М2 содержит HXXXW мотив, аналогичный М2 ВГА, и, следовательно, может проводить ионы. Кристаллическая структура М2 показывает сходство с М2 ВГА, но также имеет и уникальные особенности. М2 образует суперспирализованные тетрамеры с полярными остатками, которые выстилают образованные поры, что обеспечивает резистентность М2 к препаратам адамантанового ряда [Ma C. et al., 2008]. Zhang и соавторы недавно предложили новую роль М2 в ингибировании р53-опосредованной транскрипции и апоптоза [Zhang H. et al., 2015].

Уникальной особенностью М2 является его механизм экспрессии. Терминирующий кодон трансляции М1 перекрывается со старт-кодом М2 (UAAUG) [Horvath C. et al., 1990]. Такой стоп-старт механизм был

уникальным в своем роде, когда он был первоначально идентифицирован, но с тех пор аналогичные механизмы были идентифицированы у других вирусов, таких как калицивирусы [Powell M. et al., 2008].

NS1 ВГВ представляет собой белок длиной 281 аминокислотных остатков, кодируемый сегментом 8. Установлено, что NS1 важен для репликации вируса [Dauber B. et al., 2004; Hai R. et al., 2008]. NS1 ВГВ состоит из N-конца (остатки 1-90), С-конца (остатки 120-281) и линкерного домена (остатки 91-119) [Guan R. et al., 2011]. NS1 локализуется в ядре инфицированных клеток на ранних стадиях инфекции, но в основном в цитоплазме на более поздних стадиях.

Предполагается, что NS1 является мощным ингибитором ответа IFN [Dauber B. et al., 2004; Donelan N. et al., 2004]. В эту функцию вовлечены как N-, так и С-концы, при этом, С-концевая часть более активно участвует в ингибировании IFN- β [Dauber B. et al., 2006].

NS1 также может непосредственно связываться и блокировать стимулированный интерфероном убиквитин-подобный белок ISG15, который конъюгирован с вновь синтезированными белками [Iwasaki A. et al., 2014]. При связывании с ISG15, NS1 предотвращает активацию ISG15 ферментом UBE1L, и эта активность опосредуется N-концом NS1 [Guan R. et al., 2011; Yuan W. et al., 2001]. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что NS1 релокализует связывание ISG15 с ядерными пятнышками [Sridharan H. et al., 2010]. В целом, NS1 ВГВ играет ключевую роль в уклонении от иммунного ответа, как и NS1 ВГА, хотя механизмы действия, по-видимому, у этих двух вирусов отличаются.

NEP белок (или NS2) ВГВ взаимодействует с аппаратом ядерного экспорта, содержит последовательность сигналов ядерного экспорта на N-конце и обладает активностью ядерного экспорта [Paragas J. et al., 2001]. Кроме того, NEP продуцируется на поздних стадиях инфекции, первоначально накапливаясь в ядре, а затем переносится в цитоплазму и, наконец, в проксимальные области плазматической мембраны – местах

почкования вириона. NEP белок обнаруживается в вирионах как часть комплекса vRNP. Интересно, что NEP ВГВ, по-видимому, взаимодействует непосредственно с vRNP и М1 в отличие от ВГА, где М1 действует как мостик между NEP и vRNP [Imai M. al., 2003].

1.2. Антигенная структура гемагглютинина вирусов гриппа В.

Первоначально полипептид НА синтезируется в виде крупномолекулярного предшественника (НА0), который после завершения процесса трансляции расщепляется клеточными протеазами на тяжелую (НА1) и легкую (НА2) цепи и гликозилируется. Образовавшийся гликопептид содержит обе полипептидные цепи (НА1 и НА2), соединенные дисульфидными связями. Определение кристаллической структуры эктодомена НА вируса гриппа В/Hong Kong/8/73 (В/НК/73) позволило отобразить его антигенную структуру [Wang Q. et al., 2008]. Установлено, что НА имеет удлиненный фьюжен-домен (F), представленный суперспирализованной структурой НА2, области НА1 (1-42) и НА1 (288-342), глобулярную мембранно-дистальную область (НА1 АК 116 – 274), содержащую рецептор-связывающий сайт, и рудиментарный эстеразный домен (НА1 43-115 и 275-287). Функциональная форма НА ВГВ является гомотримером. Каждая субъединица НА вируса В/НК имеет семь дисульфидных мостиков [Wang Q. et al., 2008], и пять из них имеют аналоги в НА вируса гриппа А субтипа Н3: Cys4₁-Cys137₂, Cys60₁-Cys72₁, Cys94₁-Cys143₁, Cys292₁-Cys318₁ и Cys144₂-Cys148₂ [Krystal M. et al., 1983]. На каждой субъединице НА1/НА2 имеется в общей сложности 10 потенциальных сайтов N-гликозилирования, семь из которых расположены в НА1 (25, 59, 123, 145, 163, 301 и 330) и три в НА2 (145, 171 и 184). Интересно, что гликозилирование НА1 в положении 145 впервые появляется в штамме вируса гриппа В/Great Lakes/54 и сохраняется до настоящего времени. Возможно, что наличие такого гликана выгодно для вируса гриппа В для уклонения от иммунного ответа, учитывая его расположение в одном из основных антигенных сайтов – петле-150. С другой

стороны, гликозилирование HA1 в положении 123 почти полностью исчезло в HA линий В/Виктория и В/Ямагата из-за преобладающего присутствия Ile125 вместо Thr125 [Ni F. et al., 2013]. Неясно, почему сайт гликозилирования в положении 123 HA1 оказался таким недолговечным. Одним из объяснений является то, что, поскольку, петля-120 является одним из основных антигенных сайтов HA ВГВ, вирусом используются различные мутационные стратегии, чтобы избежать распознавания иммунной системой хозяина. Сайт гликозилирования N123 в HA1 был выгоден для В/НК/73, но не закрепился в последующих штаммах вируса гриппа В. Однако, у большинства штаммов линии В/Виктория появился новый сайт гликозилирования в положении 230 HA1, который присутствовал примерно у половины штаммов вирусов гриппа В ранних лет выделения и не выявляется у большинства штаммов линии В/Ямагата [Ni F. et al., 2013].

Четыре основных антигенных региона находятся в глобулярной головке HA1 и включают в себя петлю-120 (остатки 116-137), петлю-150 (остатки 141-150), петлю-160 (остатки 162-167) и спираль-190 (остатки 194-202) [Wang Q. et al., 2008]. Эти участки HA находятся под воздействием позитивного отбора, что указывает на влияние антительного ответа на эволюцию вируса [Nunes B. et al., 2008].

Петля-120, как представляется, является регионом, где наиболее часто выявляются мутации у изолятов ВГВ [Verhoeven M. et al., 1983]. Действительно, было обнаружено, что варианты вируса В/Виктория подобного штамма с определенными заменами в положениях 129 и 137 в HA1, полученные с использованием обратной генетики, влияют на антигенные свойства вируса [Lugovtsev V. et al, 2007]. Предполагалось, что аминокислотные остатки в положениях 75, 77, 116, 118 и 122 (HA1) представляют собой эпитоп, который уникален для штаммов подобных В/Виктория/2/87 [Nakagawa N., et al, 2006].

К настоящему времени, помимо кристаллической структуры НА вируса гриппа В/Hong Kong/8/73, получены данные о кристаллической структуре НА вирусов В/Brisbane/60/08 Викторианской эволюционной линии и вирусов В/Florida/04/06 [Dreyfus et al., 2012] и В/Yamanashi/166/98 [Ni F. et al., 2013] Ямагатской эволюционной ветви. В целом, общие структуры НА всех вирусов гриппа В напоминают друг друга. Однако показаны структурные вариации отдельных регионов молекулы НА по сравнению с наблюдаемой структурой НА эталонного штамма В/НК/73, представленные в виде $C\alpha$ -среднеквадратичного отклонения ($C\alpha$ -RMSD) молекулярного расстояния, выраженного в ангстремах, по сравнению с другими штаммами [Ni F. et al., 2013]. Например, средние $C\alpha$ -RMSD НА В/НК/73 для области НА1 51-54, 56-59, 73-75, 121-123, 129, 137 составляет 0,96 Å и 1,29 Å для В/Yamanashi/98 и В/Brisbane/08, соответственно. Тот факт, что с эти регионы служат сайтом для связывания с антителами, подтверждает их вклад в антигенность НА ВГВ. Как и ожидалось, в этих регионах расположены участки, которые подвергаются постоянным аминокислотным заменам, в таких положениях, как НА1 56, 73, 75, 122, 129, 137, и идентифицированы как подверженные положительному отбору в предыдущих филогенетических и антигенных исследованиях [Nunes B. et al., 2008; Shen J. et al., 2009]. В целом, штаммы линии В/Yamagata ближе к ранним штаммам вируса гриппа В как по структуре, так и по аминокислотной последовательности в этом регионе.

Остатки 179-181 в НА1 относятся к петле-120. Этот регион имеет мотив $^{179}\text{TKG}^{181}$ у ранних штаммов вируса гриппа В (1972-1982 годы), включая В/НК/73. Однако этот мотив изменяется на $^{179}\text{TEG}^{181}$ в 97% штаммов В/Victoria. Это резко контрастирует со штаммами линии В/Yamagata, где мотив $^{179}\text{TKG}^{181}$ сохраняется только в ~ 11% штаммах, тогда как 60% штаммов, включая штамм В/Florida/06, имеют $^{179}\text{TEG}^{181}$ мотив и 21% штаммов, включая В/Yamanashi/98, приобретают новый мотив $^{179}\text{TKE}^{181}$. Мотив $^{179}\text{TEG}^{181}$ у В/Флорида/06 и В/Brisbane/08 имеет сходное $C\alpha$ -RMSD, отличающееся от В/НК/73 НА на 1,24 Å и 1,07 Å,

соответственно. Однако мотив ¹⁷⁹ТКЕ¹⁸¹ найденный в штамме В/Yamanashi/98, имеет значительно большее $C\alpha$ -RMSD (2,27 Å) от НА В/НК/73. По-видимому, остатки в области 179-181 находятся под более сильным и разнообразным селективным давлением у ВГВ линии В/Yamagata, чем у штаммов линии В/Victoria. Со структурной точки зрения регион 179-181 у НА вируса В/Yamanashi/98 более выступает, чем у гемагглютиниана В/Brisbane/08.

В сравнении с НА В/НК/73, НА В/Yamanashi/98 и В/Brisbane имеют $C\alpha$ -RMSD 1,21 Å и 1,10 Å в области НА1 283-285, соответственно. Эта область относится к петле-120 и является частью эпитопа, который связывается с человеческими моноклональными антителами CR8071 в комплексе с НА В/Florida/06 [Dreyfus et al., 2012].

Петля-150 представляет собой необычно длинную выступающую петлю, кончик которой (Thr147) направлен в сторону от основной части структуры гемагглютиниана на расстояние ~ 9 Å. Этот сайт является одним из наиболее очевидных сайтов для связывания антител с НА В/НК/73 [Wang Q. et al., 2008]. В петля-150 часто обнаруживаются отдельные аминокислотные замены, которые вызывают изменение антигенных свойств [Abed Y., et al., 2003; Berton et al., 1984; Berton and Webster, 1985; Hovanec and Air, 1984; Lugovtsev et al., 2007; Nakagawa et al., 2003].

Мотив ¹⁴⁸NGN¹⁵⁰ сохраняется у ранних штаммов вируса гриппа В и у 96% штаммов линии В/Victoria, тогда как, в линии В/Yamagata мотивы ¹⁴⁸SKS¹⁵⁰, ¹⁴⁸SKI¹⁵⁰ и ¹⁴⁸SRS¹⁵⁰ присутствуют в НА вируса гриппа В в 47%, 28% и 20% случаев, соответственно [Ni F. et al., 2013]. Таким образом, 150-петля, вероятно, подвержена более сильному селективному давлению у штаммов линии В/Yamagata [Shen J. et al., 2009], что определяет более значительные структурные различия в этой области, чем у вирусов линии В/Victoria. Например, для аминокислотных остатков в регионах НА1 139-142 и 145-151, где наблюдаются большие структурные различия относительно НА В/НК/73, В/Yamanashi/98 и В/Florida/06 (В/Yamagata) имели среднее $C\alpha$ -

RMSD 1,65 Å и 1,81 Å, соответственно, тогда как для В/Brisbane/06 (линия В/Victoria) это значение составляло 1,30 Å. Предполагается, что у современных изолятов ВГВ петля-150, по-видимому, является нейтрализующим эпитопом, специфичным для штаммов вирусов гриппа В Ямагатской линии [Nakagawa N., et al., 2003].

Петля–160 расположена на мембрано-дистальном выступе молекулы НА. Это единственный регион, где часто встречаются вставки и делеции [Novanec and Air, 1984; McCullers et al., 1999; Nerome et al., 1998]

В сравнении с НА В/НК/73, который имеет самую короткую петлю-160, штаммы и Ямагатской и Викторианской линий имеют вставки в этом регионе. Относительно эталонного штамма В/Victoria/2/87, который имеет аминокислотную вставку NDN между остатками 162 и 163, 42% В/Victoria НА последовательностей имеют одинаковый мотив, тогда как 51% последовательностей, включая штамм В/Brisbane/08, имеют NDK [Ni F. et al., 2013]. В сравнении с эталонным штаммом В/Yamagata/16/88, который имеет единичную инсерцию аспарагиновой кислоты (D) между остатками 162 и 163, только 9% НА-последовательностей из 282 недавних штаммов линии В/Yamagata сохраняют эту вставку, 88% последовательностей, включая В/Yamanashi/98 и В/Florida/06, имеют вставку DN. Примерно 3% штаммов имеют в последовательности гемагглютинина вставку с двумя другими аминокислотными остатками [Ni F. et al., 2013].

Таким образом, изменения структуры гемагглютинина за счет инсерций/делеции и аминокислотных замен в этой области, по-видимому, являются эффективным способом изменчивости вируса гриппа В [McCullers et al., 1999] в частности, для того, чтобы выжить в течение длительного периода времени без антигенного шифта, как это наблюдается у вирусов гриппа А [Nerome et al., 1998].

Хотя до недавнего времени петля-160 считалась в плане антигенного дрейфа эпитопом, специфичным для вирусов гриппа В Викторианской линии

[Nakagawa et al., 2001; Nakagawa et al., 2005], для современных штаммов Ямагатской линии петля-160 также является антигенным сайтом.

Спираль–190 и окружающие ее области. Область спирали-190 (включая собственно спираль-190 и петлю-240) расположена на мембранно-дистальном конце молекулы НА и формирует верхний и левый края рецептор связывающего сайта (РСС). Спираль-190 постоянно находится под воздействием позитивного отбора у вирусов как Ямагатской, так и Викторианской эволюционных линий [Nunes B. et al., 2008; Shen et al., 2009; Pechirra et al., 2005].

Два остатка в спирали-190 имеют большие структурные отличия от НА В/НК/73, это положения 194 и 206. Среднее $C\alpha$ -RMSD для этих двух остатков от НА В/НК/73 составляет 0,46 Å, 0,65 Å и 1,05 Å для В/Yamanashi/98, В/Florida/06 (линия В/Yamagata) и В/Brisbane/08 (линия В/Victoria), соответственно. Кроме того, частые аминокислотные замены находятся в трех положениях в НА1: 195, 199 и 200. Среднее $C\alpha$ -RMSD на этих участках с НА В/НК/73 составляет 0,33 Å, 0,40 Å и 0,58 Å для В/Yamanashi/98, В/Florida/06 (Ямагатская линия) и В/Brisbane/08 (Викторианская линия), соответственно. Следовательно, НА штаммов Викторианской линии, по-видимому, больше расходятся с НА В/НК/73 в этой области [Ni F. et al., 2013].

«Горячая точка» в спирали-190 находится в положении 194-196, где может присутствовать потенциальный сайт N-гликозилирования. Подобно вирусам гриппа А [Skehel and Wiley, 2000], вирусы гриппа В также используют добавление или удаление сайта гликозилирования в качестве механизма антигенного дрейфа [Robertson et al., 1985, 1990; Oxford et al., 1990, 1991; Gambaryan et al., 1999; Nakagawa et al., 2004; Muyanga et al., 2001; Saito et al., 2004; Ikonen et al., 2005].

Область НА₁ 235-240 имеет наибольшее $C\alpha$ -RMSD от НА В/НК/73 –2,23-2,34 Å для В/Yamanashi/98, В/Florida/06 и В/Brisbane/08 в результате большой структурной перестройки в этой области. Остаток Glu-235 в НА

В/НК/73 заменен на Gly-235 в 100% штаммов Викторианской и 99% штаммов Ямагатской линий, соответственно [Ni F. et al., 2013]. Наличие Gly-235 приводит к расширению петли-240 и вызывает сдвиг на один аминокислотный остаток в ориентации боковой цепи. Например, боковая цепочка Pro-238 в структуре гемагглютинаина В/Yamanashi/98 и В/Brisbane/08 размещена в аналогичном положении с Leu-237 в В/НК/73. Следовательно, боковая цепочка Gln-239 в структуре НА всех других вирусов гриппа В находится в том же месте, что и у Pro-238 в НА В/НК/73. Переориентация боковых цепей в области НА1 235-240 может сильно изменять антигенные свойства этого региона.

На основании анализа и сравнения последовательностей НА вирусов В из базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) были предложены более подробные антигенные карты и новые антигенные сайты для НА гриппа В (табл. 1) [Stray and Pittman, 2012]

Таблица 1. Антигенные сайты гемагглютинаина вируса гриппа В

ВА	ВВ1	ВВ2	ВС	ВД	ВЕ
136*, 137, 141, 146, 147, 148, 149, 150, 154	194, 195, 196, 197, 199, 200, 205, 206	162, 162а- с, 163, 164, 165	47, 48, 80, 81, 116, 276, 281	121, 122, 125, 126, 127, 129, 179, 180, 181, 248, 249, 252, 253, 254, 255	56, 58, 68, 69, 71, 73, 75, 76

*Приведена нумерация аминокислотных остатков по НА В/Lee/40

В частности описан новый антигенный сайт ВС. Ранее описанный эпитоп в верхней части НА [Krystal M. et al, 1983], предложено разделить на основе очевидных функциональных различий на два сайта – ВВ1 и ВВ2. При этом сайт ВВ1 состоит из «головки» аминокислотных остатков, расположенных над рецептор связывающим карманом, тогда как сайт ВВ2 представляет

собой последовательность из остатков с другой стороны вершины молекулы НА [Stray and Pittman, 2012].

В целом трехмерная модель НА вирусов гриппа В Викторианской и Ямагатской эволюционных линий представлена на рис. 1 [Suptawiwat O. et al., 2017].

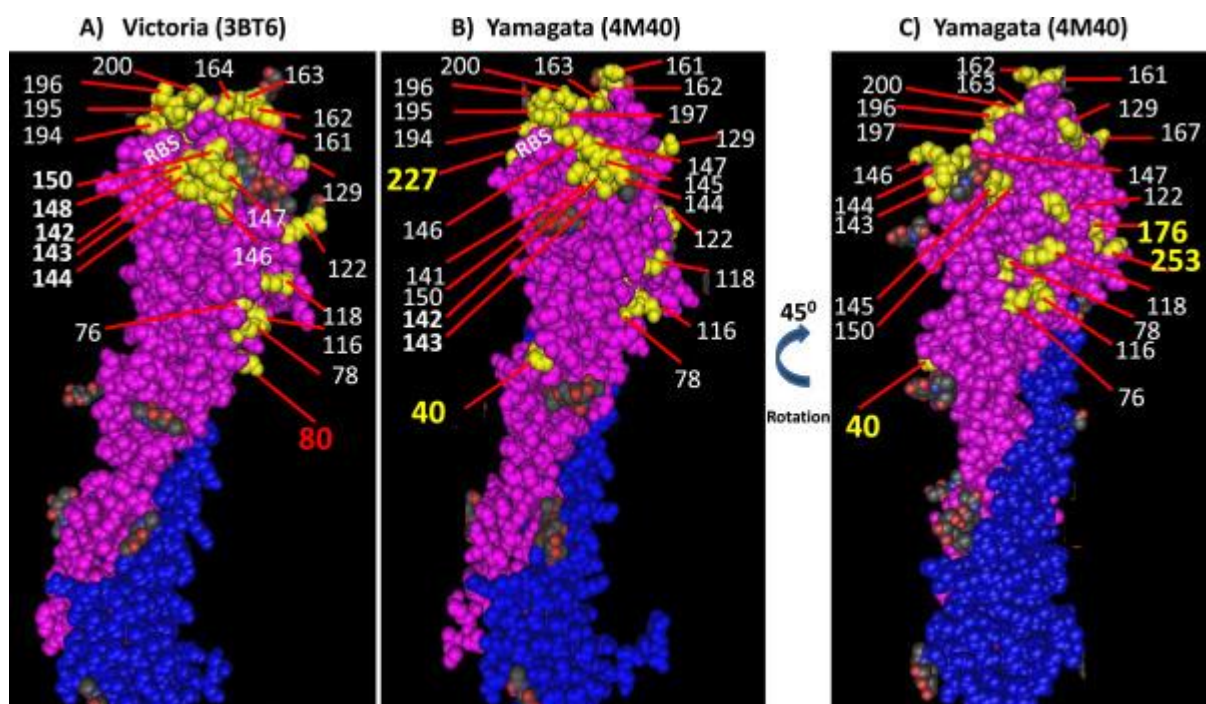


Рис. 1. Антигенные детерминанты гемагглютинаина вирусов гриппа В. Мономер белка гемагглютинаина вируса гриппа В (НА1 обозначен розовым цветом и НА2 выделен синим цветом) вирусов линии В/Ямагата (4M40) и линии В/Виктория (3BT6) показаны с использованием программы Cn3D, версия 4.3.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Аминокислотные остатки в известных антигенных сайтах отмечены белыми цифрами. Остатки, находящиеся за пределами известных антигенных участков, обозначены желтыми цифрами для штаммов Ямагатской линии и красными – для штаммов Викторианской линии [Suptawiwat O. et al., 2017].

1.3. Рецептор-связывающий сайт гемагглютинаина вирусов гриппа В.

Впервые кристаллическая структура НА ВГВ в комплексе с $\alpha(2,3)$ и $\alpha(2,6)$ связанными аналогами рецепторов была определена с разрешением 2,8 Å для штамма вируса гриппа В/Hong Kong/8/73 [Wang Q. et al., 2007]. Показано, что рецептор-связывающий сайт расположен в верхней части

мембранного-дистальной области гемагглютинина, образован спиралью-190 (HA1 193 – 202) в верхней части, петлей-240 (HA1 237 – 242) с левого края и петли-140 (HA1 136 – 143) с правого края (рис. 2).

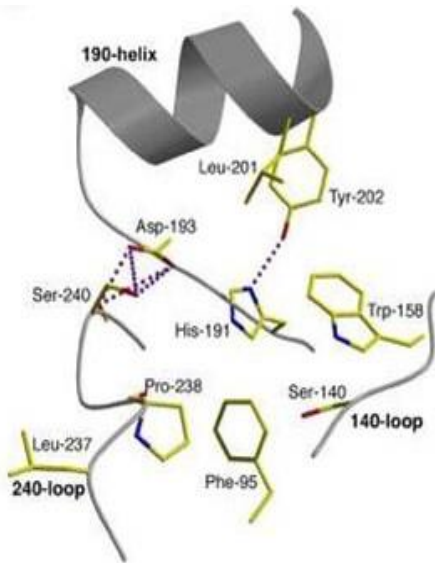


Рис. 2. Структура рецептор-связывающего сайта гемагглютинина вируса гриппа В/Hong Kong/8/73 по данным Wang Q. и соавт. [Wang Q. et al., 2007].

Четыре аминокислотных остатка в цепи HA1 – Phe-95, Trp-158, His-191 и Tyr-202, составляющие основу РСС, высококонсервативны, и сохраняются среди почти всех известных последовательностей HA вируса гриппа В [Air G. et al., 1990; Xu G. et al., 1994; Xu G. et al., 1996; Rota P. et al., 1992; Nakagawa N. et al., 2002; Muyanga J. et al., 2001; Lindstrom S. et al., 1999; Shaw M. et al., 2002]. В дополнение к π -взаимодействию (нековалентное взаимодействие между органическими соединениями, содержащими ароматические компоненты) между этими четырьмя ароматическими остатками РСС дополнительно стабилизируется водородной связью между His-191 и Tyr-202 и еще четырьмя водородными связями между Asp-193 и Ser-240.

Основываясь на кристаллографической структуре HA В/Hong Kong/8/1973, показано, что рецептор-связывающий карман HA гриппа В образован шестью прерывистыми основными последовательностями, которые включают аминокислотные остатки в положениях 95, 136-142, 150,

158-160, 191-201 и 236-241. Чтобы определить частоту и характер аминокислотных замен в РСС был проведен анализ последовательностей НА всех вирусов гриппа В человека имеющихся в базе данных по гриппу NCBI по состоянию на ноябрь 2011 г. Было выяснено, что все штаммы ВГВ содержали фенилаланин в положении 95. Только у одного штамма В/Indiana/5/2006 (GenBank Acc. No. Q0A1E5) в положении 95 был выявлен тирозин (Tyr). Анализ элементов в положениях 136-142 показал, что азиатские и южноамериканские штаммы Викторианской линии содержали мотив Lys136-Ile137, тогда как вирусы линии Ямагата имели мотив Arg136-Leu137. Остальные аминокислотные остатки-Gly138-Thr139-Ser140-Gly141-Ser142 были высококонсервативными у всех штаммов, причем единственной заметной заменой является Gly141→Arg, которая обычно встречается у вирусов, адаптированных к куриным эмбрионам [Lugovtsev et al., 2009].

Позиция 150 показывает некоторую изменчивость. В азиатских и южноамериканских штаммах Asn является наиболее распространенной заменой, составляющей ~ 50% от общей численности популяции. Напротив, в странах Европы, Северной Америки и Океании в положении 150 чаще всего встречается остаток серина, что составляет примерно 41% от общей численности. Африканские штаммы чаще всего содержали в этом положении изолейцин (~ 7,5% от общего числа). Остатки в положениях 158-160 являются высококонсервативными и в подавляющем большинстве случаев это Trp158-Ala159-Val160. Единственными существенными заменами являлись Trp158→Gly у штамма В/Kentucky/01/2007 (GenBank Acc. No. ACA33485) и Val160→Arg у вируса В/Uruguay/NG/2002 (GenBank Acc. No. Q08GG5). Эти замены, основываясь на их локализации и характере боковых цепочек, как предполагается, могут влиять на распознавание терминальной части Neu5A.

Аминокислотные остатки в положениях 191-201 формируют спираль-190 РСС и включают важный сайт гликозилирования Asn194-X-Thr196. Последовательность His191-Ser192-Asp193 является очень консервативной и

представлена в ~ 99,9% штаммов. Сайт гликозилирования 194-196, представляющий С-концевую часть спирали-190, демонстрирует значительную изменчивость. В позиции 194 наиболее часто расположен Asn аспарагин (~ 93%), а также Asp, Ser, Lys и еще реже Tyr или Ile. Положение 195 отличается между азиатскими и южноамериканскими штаммами, у которых в ~ 47,1% находится Glu, тогда как у африканских, европейских и североамериканских штаммов в данном положении присутствует Lys (~ 52,6%). В положении 196, как правило, в большинстве случаев расположен Thr, а остатки Ile и Ala встречаются значительно реже. Gln197 является очень консервативным и составляет ~ 99,7%. Остатки пролина присутствуют в положениях 196 и 197 достаточно редко. Эти замены очень интересны, т.к., известно, что Pro несовместим с α -спиралью в структуре белков и, следовательно, присутствие этого аминокислотного остатка будет укорачивать спираль-190. У азиатских и южноамериканских штаммов в положении 200 в большинстве случаев находится лизин, тогда как у африканских, европейских и североамериканских штаммах – Asn. Thr и Arg в данном положении имеется у незначительного количества штаммов. Позиция 201 очень консервативна, поскольку в этом положении у примерно ~ 99,7% штаммов ВГВ находится остаток лейцина.

Последовательность 236-241 является наиболее высококонсервативным участком рецептор-связывающего кармана и представлена Gly236-Leu237-Pro238-Gln239-Ser240-Gly241 у ~ 99,9→100% всех штаммов.

Несмотря на довольно высокую консервативность аминокислотных остатков, участвующих в формировании РСС, у вирусов Ямагатской, Викторианской линий и штаммов ранних лет выделения есть и существенные различия.

У НА В/Yamanashi/98 сохраняются π -взаимодействия. Хотя поворот боковой цепи Trp-158 приводит к потере водородной связи между Ser-140 и Trp-158, наблюдается новая водородная связь между Trp-158 и Tyr-202. Более того, большая структурная перестройка в петле 240 вызывает потерю

взаимодействия между Pro-238 и Ser-240, но взамен образуется водородная связь между боковой цепочкой Gln-239 и Ser-140. Две дополнительные водородные связи с боковой цепочкой Gln-239 становятся возможными в результате большой структурной перестройки в 240-петле из-за присутствия Gly-235. Эта новая конформация 240-петли присутствует в структуре НА В/Yamanashi /98 и В/Brisbane/08, а остаток Gly-235 наблюдается у 100% штаммов Викторианской линии и 99% Ямагатской. Таким образом, взаимодействие боковой цепочки Gln-239 посредством водородной связи сохраняется в НА почти у большинства современных штаммов вируса гриппа В [Ni F. et al., 2014].

Еще одно заметное изменение в РСС у современных изолятов ВГВ произошло в положении 136. Если штаммы ранних лет выделения содержали в положении 136 изолейцин в 100% случаев, то у современных Викторианских штаммов это Lys-136 (97%) и Arg-136 (1%), а у Ямагатских – Arg-136 (98%) и Lys-136 (1%). Боковые цепи Arg-136 в структуре НА В/Yamanashi/98 и Lys-136 в структуре НА В/Brisbane/08 расположены в аналогичном положении [Ni F. et al., 2014].

Кроме того, большой структурный сдвиг наблюдается в 240-петле, как следствие мутации Glu-235→Gly-235 как в линиях В/Victoria, так и в В/Yamagata. Структурный сдвиг вызывает переориентацию остатков на 240-петле, несмотря на высокую идентичность последовательности в этой области среди НА всех вирусов гриппа В

Таким образом, современные вирусы гриппа В обеих линий содержат РСС, который отличается от сайта ранних штаммов и способен связываться Sia-1-фрагментом как человеческого, так и птичьего рецепторов с гораздо более высоким сродством, чем НА В/НК/73 [Ni F. et al., 2014].

Одной из уникальных особенностей РСС НА ВГВ является остаток фенилаланина в положении 95, который резко контрастирует с остатком тирозина в эквивалентном положении у всех вирусов гриппа А субтипов Н1 – Н15. Это похоже на остаток Phe-98, который выявлен в НА вирусов гриппа

А субтипов Н16 – Н17 [Fouchier et al., 2005; Sun et al., 2013; Tong et al., 2012; Zhu et al., 2013]. В случае, когда в РСС присутствует Тир-98, гидроксильный атом кислорода на его боковой цепи образует одну водородную связь с His-183, стабилизирующей основание РСС сайта. Отсутствие гидроксильного атома кислорода на боковой цепи Phe-95 в НА вируса гриппа В приводит к потере трех водородных связей [Wang Q. et al., 2007] и, вероятно, отвечает за низкую аффинность связывания вируса гриппа В с рецепторами клетки.

Изучения влияния мутации Phe95→Тур и гликозизирования в сайте 194-196 на рецептор-связывающие свойства НА вируса гриппа В/Yamagata/73 дикого типа и мутантов (мутанты с единичными заменами Phe95→Тур и Asn194→Asp, а также мутант с двумя заменами – Phe95→Тур/Asn194→Asp), показало, что НА дикого типа обладает общим слабым связыванием для большинства гликанов, однако он явно демонстрирует предпочтение по отношению к «человеческим» рецепторам Neu5Acα(2,6)Gal, которые обильно обнаруживаются в верхних дыхательных путях человека. С другой стороны, мутация Asn194→Asp с потерей гликозилирования в HA1-194 приводит к преимущественному связыванию с птицеподобными рецепторами Neu5Acα(2,3)Gal. Установлено, что у мутанта с заменой Phe95→Тур и двойного мутанта с заменами Phe95→Тур/Asn194→Asp улучшается связывание с 6'SLN-LN рецепторами примерно в 10^7 раз по сравнению с мутантом с заменой Asn194→Asp. Таким образом, независимо от того, существует ли гликозилирование в HA1 в положении 194 (в случае Phe95→Тур) или нет (в случае Phe95→Тур/Asn194→Asp), мутация Phe95→Тур усиливает связывание НА с 6'SLN-LN рецепторами примерно в 10^7 раз. Напротив, потеря гликозилирования в HA1 194 увеличивает сродство к 3'SLN-LN рецепторам в 10^9 раз. Таким образом, в двойном мутанте с заменами Phe95→Тур/Asn194→Asp усиленное связывание с 3'SLN-LN осуществляется в основном за счет замены Asn194→Asp, тогда как более

сильное связывание с 6'SLN-LN в значительной степени является результатом замены Phe95→Tyr [Ni F. et al., 2014].

Ряд исследований свидетельствуют о том, что аффинность связывания НА с рецепторами является важным фактором, определяющим инфекционность вируса гриппа А [Pappas et al., 2010; Viswanathan et al., 2010]. Считается, что ограниченный резервуар хозяев у вируса гриппа В (за пределами человеческой популяции) является одной из основных причин того, что вирус гриппа В не обладает таким молекулярным эволюционным механизмом как антигенный сдвиг (шифт), который отвечает за почти все известные пандемии человека, вызванные вирусом гриппа А [Gamblin and Skehel, 2010]. Остается открытым вопрос о том, существует ли корреляция между ограниченным кругом хозяев и более низким сродством связывания НА вирусов гриппа В с рецепторами. Усиление аффинности связывания НА ВГВ с рецепторами в результате одной мутации Phe95→Tyr в рецептор-связывающем кармане дает правдоподобное объяснение очень ограниченному кругу хозяев, который известен у ВГВ. Следовательно, более слабое связывание НА вируса гриппа В с рецепторами, вероятно, налагает гораздо более высокие требования на «совершенную» композицию гликанов на поверхности клетки-мишени определенного хозяина. Таким образом, хотя важность аминокислотного остатка в положении 95 несомненна для аффинности связывания НА с рецепторами клеток, необходимы дальнейшие исследования, чтобы проиллюстрировать его влияние на патогенность и эволюцию вируса гриппа В [Ni F. et al., 2014].

Гемагглютинин вирусов гриппа связывается с сиалилгликопротеинами и сиалилгликолипидами на поверхности клетки хозяина [Gambaryan et al., 1997; Stevens et al., 2006]. Эти сиалил-гликаны, обычно связанные с галактозой (Gal) в конфигурациях $\alpha 2,6$ или $\alpha 2,3$, являются рецепторами для НА вируса, связывание с которыми способствует прикреплению, слиянию с мембранами и проникновению вируса в клетку [Skehel and Wiley, 2000; Suzuki, 2005].

Для вирусов гриппа А распределение гликанов хозяина и специфичность связывания НА с этими сиалилгликанами является основной детерминантой, определяющий круг хозяев для вируса. Установлено, что вирусы гриппа птиц предпочтительно связываются с α 2-3, а вирусы гриппа человека с α 2-6 сиалилгликанами [Gambaryan et al., 1997; Suzuki, 2005; Stevens et al., 2008]. Таким образом, специфичность связывания с углеводами отличается у вирусов гриппа А человека и птиц и может влиять на тканевой тропизм и трансмиссию этих вирусов. Однако биология связывания гликанов для гриппа В не была систематически охарактеризована.

Для характеристики и оценки специфичности рецептор-связывающих свойств ВГВ, 53 штамма вируса гриппа В были протестированы с панелью из тридцати олигосахаридов, которые включали, в том числе, гликаны с α -2,3 и α -2,6 связями [Wang Y. et al., 2012]. По характеру связывания этих изолятов вируса гриппа В с гликанами они были разделены на три группы, и была показана корреляция с их генотипами НА. Ямагата-подобные штаммы преимущественно связывались с α -2,6 гликанами (24:29, 83%), в то время как штаммы, линии В/Виктория/2/87, в большинстве случаев взаимодействовали и с α -2,3-, и с α -2,6 гликанами (13:24, 54%). Третья группа вирусов, взаимодействовала с сульфатированными гликанами, и все они относились к Викторианской линии. На основе сравнения последовательностей НА было показано, что остатки Asn-163, Glu-198, Ala-202 и Lys-203 специфичны для штаммов ВГВ Викторианской линии и, вероятно, значимы для распознавания углеводов [Wang Y. et al., 2012].

Показаны возрастные отличия при инфицировании людей вирусами гриппа В двух эволюционных линий. Около 70% вирусов Викторианской группы были идентифицированы у детей младше 18 лет, тогда как штаммы Ямагатской линия имели бимодальное распределение по возрасту со значительным сдвигом к инфицированию лиц в возрасте старше 25 лет [Vijaykrishna et al., 2015]. Подобная зависимость наблюдалась в разных регионах мира в разные эпидемические сезоны [Tan et al., 2013; Sočan et al. ,

2014]. Предполагается, что эти отличия обусловлены различиями в рецептор-связывающих свойствах НА вирусов Викторианской и Ямагатской эволюционных линий. Установлено, что ткани респираторного тракта детей в основном содержали α -2,3-связанные рецепторы с более низким уровнем α -2,6-рецепторов, чем у взрослых [Nicholls et al., 2007; Walther et al., 2013]. Эти различия между возрастными группами могут частично объяснять разную способность к инфицированию детей и взрослых у представителей ВГВ разных эволюционных линий, учитывая различия в характере связывания с α -2,3 и α -2,6 рецепторами у Ямагатских и Викторианских штаммов [Vijaykrishna et al., 2015].

Таким образом, аминокислотный состав рецептор-связывающего кармана вируса может влиять на тканевой тропизм, способность к трансмиссии, а также на эволюционную и эпидемиологическую динамику вирусов гриппа В.

1.4. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В.

Как и для вируса гриппа А для вируса гриппа В одним из наиболее изученных механизмов антигенных вариаций НА является накопление точечных мутаций в гене, кодирующим этот белок [Krystal et al., 1983]. Интересно отметить, что НА1 и НА2 регионы вируса гриппа В отличаются по характеру накопления мутаций: НА1 характеризуется накоплением преимущественно значимых (приводящих к аминокислотным заменам) мутаций – позитивная селекция, тогда как в НА2 происходит накопление в основном молчащих мутаций – негативная селекция [Zou et al., 1997].

В 1970-е и в начале 1980-х годов в циркуляции выявлялись преимущественно штаммы – предшественники Ямагатской эволюционной линии. Наряду с этим, в 1970-е годы, вероятно в Китае, появилась отличная от Ямагатской, Викторианская линия вирусов гриппа В, которая произошла в результате постепенной эволюции минорных Ямагатских сублиний [Chen J. et al., 2007]. По современным представлениям, в середине 1980-х годов, в результате дивергентного характера эволюции, сформировались две современные эволюционные линии вирусов гриппа В – Викторианская и

Ямагатская, родоначальниками которых были признаны референс-вирусы В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88, соответственно [Kanegae Y. et al., 1990]. Штаммы Викторианской эволюционной линии доминировали в циркуляции в 1980-е годы, а вирусы, относящиеся к Ямагатской линии, превалировали по всему миру в 1990-е [Lin Y. et al., 2004]. В 2001 году В/Victoria/2/87-подобные штаммы вновь появились в циркуляции, и с тех пор, обе филогенетически отличные линии вируса гриппа В циркулируют по всему миру [Paiva T. et al., 2013].

1.4.1. Делеции и инсерции.

Предполагают, что важным механизмом эволюционной изменчивости для вирусов гриппа В являются систематические инсерции и делеции. Нуклеотидные делеции и инсерции особенно часто встречаются в положениях 532-540 [Nerome et al., 1998]. В глобулярной части молекулы НА аминокислотные инсерции/делеции выявляются в положениях 162-164 [Verhoeven M., et al., 1983; Nerome et al., 1998]. Ранее такой механизм был характерен только для вирусов Ямагатской эволюционной линии. Однако в 2016 году в США и Норвегии были выделены штаммы Викторианской ЭЛ, которые имели две аминокислотные делеции в положениях 162 и 163 [Blanton L. et al., 2017a]. Другой кластер вирусов Викторианской ЭЛ был выявлен в 2017 году в Гонконге [Blanton L. et al., 2017b]. Эти штаммы несли три аминокислотные делеции в положениях 162, 163 и 164. Делеции и инсерции, вероятно, являются одним из важных механизмов, благодаря которому вирус гриппа типа В успешно существует в течение длительного времени без антигенного шифта.

1.4.2 Реассортация генов.

Анализ аминокислотных последовательностей НА и NA вирусов гриппа В, изолированных в период с 1989 по 1997 годы в нескольких городах США и Китая, показал, что ряд изолятов являлись естественно возникшими реассортантами по НА/NA генам между штаммами, относящимися к разным эволюционным ветвям (Ямагатской и Викторианской), как, например, штамм

B/Houston/1/92, который имеет HA, сходный с B/Yamagata/16/88-подобными изолятами и NA, сходную с B/Victoria/2/87-подобными штаммами [McCullers et al., 1999].

Филогенетический анализ генов, кодирующих HA, NP, мембранный (M) белок и два неструктурных белка NS1 и NS2, штаммов, изолированных с 1940 по 1998 годы, показал, что в отличие от вируса гриппа типа A(H3N2), эволюционные пути всех четырех указанных генов вируса гриппа B имеют сходную характеристику генетической дивергенции на две основные группы [Lindstrom et al., 1999]. Предполагается, что расхождение на две различные эволюционные линии по HA-гену начало происходить примерно в 1969 году [Luo et al., 1999]. Очевидно, что расхождение NS гена на две линии не связано с эволюцией HA генов, хотя имеется реассортация NS генов между штаммами различных HA-линий [Luo et al., 1999]. Филогенетический анализ PB2, PB1 и PA генов показал, что они дивергентно расходятся также на две основные линии. В целом, в результате реассортации, шесть генов вируса гриппа B, кодирующие внутренние белки, демонстрируют три основные эволюционные группы, включающие: а) PB2 и PB1 гены, б) PA, NP, M гены и в) NS ген [Hiromoto et al., 2000].

Показано, что в 2002-2011 г.г. вирусы Викторианской HA-линии неоднократно приобретали «внутренние» гены от вирусов Ямагатской линии для образования новых реассортантов. В частности, в течение 2004 года субпопуляция (приблизительно 15%) вирусов, подобных Виктории, приобрела все внутренние сегменты гена (PB2, PB1, PA, NP, MP и NS) от вирусов Ямагатской ветви [Vijaykrishna D. et al., 2015]. Установлено, что гены PB2 и PB1 сильно расходятся, аналогично гену HA. В частности, было показано, что гены PB2, PB1 и HA последовательно были получены из одной линии, за исключением короткоживущей субпопуляции в 2004 году. Эти результаты согласуются с подробным исследованием [Dudas et al., 2015], где была выявлена генетическая взаимосвязь между генами PB2, PB1 и HA. Напротив, у других генов наблюдается относительно недавняя

дивергенция, указывающая на то, что преобладающее разнообразие этих генов происходит из одной линии (рис. 3) [Vijaykrishna D. et al., 2015]

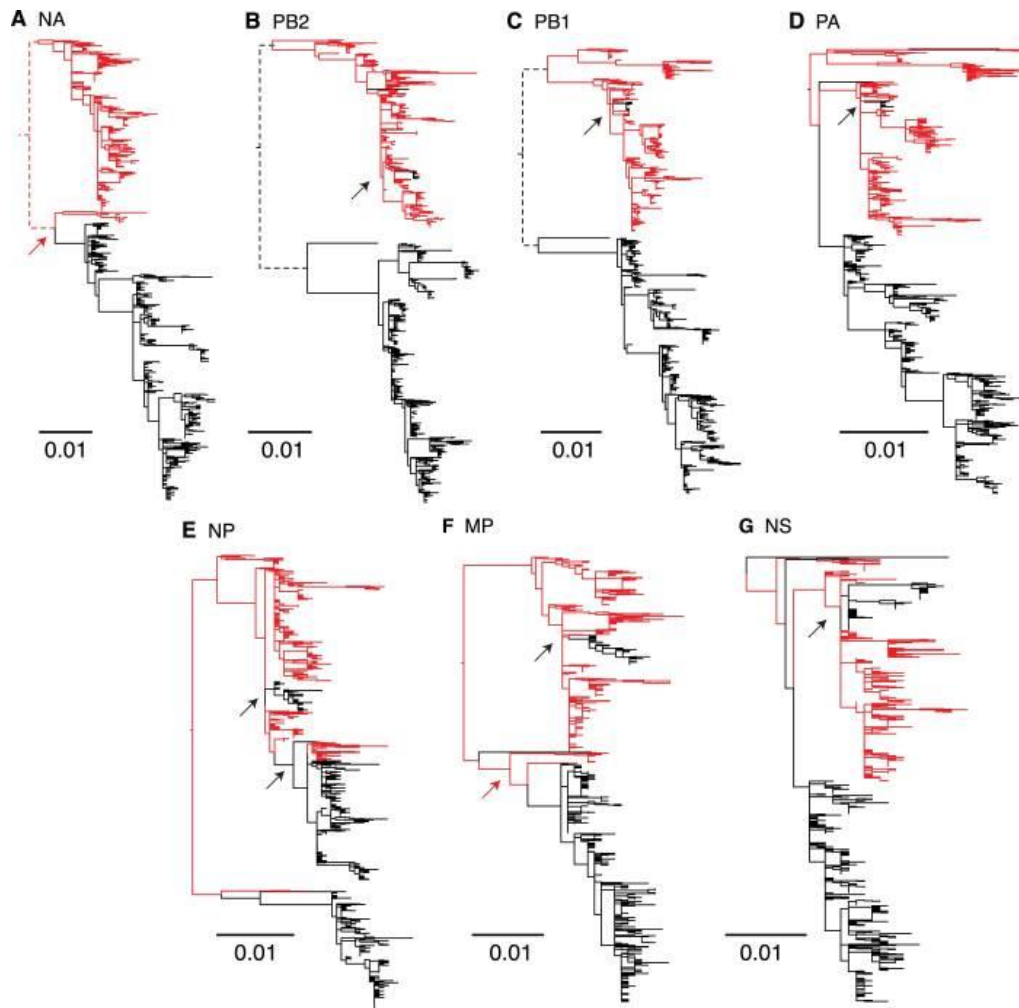


Рис. 3. Эволюционные взаимосвязи NA (A), PB2 (B), PB1 (C), PA (D), NP (E), М (F) и NS (G) генов вирусов гриппа В Викторианской и Ямагатской линий. Линии окрашены на основании линий НА: В/Виктория (черный) и В/Ямагата (красный), стрелки показывают повторную реассортацию между линиями [по данным Vijaykrishna D. et al., 2015]

Предполагается, что реассортация играет важную роль в вариабельности вируса гриппа В, т.к., это может приводить к появлению новых эпидемически значимых штаммов с отличными антигенными свойствами.

Таким образом, эволюционная изменчивость вирусов гриппа типа В определяется:

- генетической дивергенцией генов, кодирующих поверхностные белки на две основные отличные группы.
- социркуляцией генетически отличающихся линий в один эпидемический сезон.
- реассортацией генов между циркулирующими вирусами, что приводит к возникновению новых генетических вариантов.
- систематическими инсерциями и делециями нуклеотидов в НА гене.
- накоплением точечных мутаций в генах (преимущественно в НА гене).

1.4.3. Резервуар генов вирусов гриппа В в природе.

В отличие от вируса гриппа А, который имеет 18 субтипов НА и 11 субтипов NA, вирус гриппа В представлен единой группой НА и NA с тех пор, как был впервые изолирован в 1940 году. Считается, что это принципиальное отличие обусловлено тем, что вирус гриппа А циркулирует среди диких и домашних животных, таких как свиньи, лошади, киты, тюлени, норки, а также среди диких и домашних птиц. Это резко контрастирует с вирусом гриппа В, который имеет ограниченный резервуар хозяев.

Впервые резервуар генов вирусов гриппа В в природе был продемонстрирован группой голландских ученых [Osterhaus et al., 2000], которые в 1999 году выделили вирус гриппа В от 8-месячного тюленя с острым респираторным заболеванием. Данные изоляции были подтверждены также молекулярно-биологическими и серологическими тестами. Секвенирование части NS гена и НА гена показало, что NS фрагмент (201 нуклеотид) на 99-100% идентичен большинству изолятов вируса гриппа В людей. Сравнение сиквенса HA1 фрагмента нового штамма В/Seal/Netherlands/1/99 с сиквенсами вируса гриппа В человека показало, что этот штамм является В/Harbin/7/94-подобным штаммом и, более того, полностью идентичен по НА штамму В/Argentina/4105/95. Серологическое

обследование популяций тюленей показало наличие серопозитивных по гриппу В диких животных [Blanc A. et al., 2009; Bodewes R. et al., 2013]. Кроме того, имеются серологические данные о возможности циркуляции вирусов гриппа В у свиней [Ran Z. et al., 2015; Tsai C. and Tsai H., 2018].

Таким образом, впервые было установлено, что вирус гриппа В имеет резервуар среди животных, и предполагается, что тюлени могут являться тем источником, откуда в человеческой популяции появляются ранее циркулировавшие (реликтовые) штаммы.

1.5. Антигенное картирование молекулы гемагглютиниона вирусов гриппа с использованием моноклональных антител.

Вирусы гриппа обладают удивительной способностью адаптироваться и уклоняться от иммунного ответа человека посредством антигенного дрейфа. Это достигается за счет накопления мутаций в поверхностных гликопротеинах, что приводит к потере связывания с антителами. Из-за антигенного дрейфа вирусных поверхностных гликопротеинов, гемагглютиниона (НА) и нейраминидазы (НА), существует необходимость практически ежегодно обновлять состав вакцин.

Технологические достижения в выделении и получении специфических антител дали большое количество моноклональных антител (МКА) к вирусам гриппа А [Dunand C. et al., 2015, 2016; Tan G. et al., 2014; Tan G. et al., 2016] и В [Verma S. et al., 2017]. В свою очередь, характеристика Fab-фрагментов МКА, которые широко нейтрализуют вирусы гриппа А, значительно способствовала разработке ряда кандидатов в универсальные вакцины против гриппа [Krammer F. et al., 2013; Wang T. et al., 2010; Impagliazzo A. et al., 2015; Wohlbold T. et al., 2015].

Выявление антигенного «отпечатка» МКА показывает структурные детерминанты, ключевые для нейтрализации, и позволяет обоснованно подходить к разработке вакцин. Однако многие лаборатории не могут себе позволить по техническим и экономическим причинам структурно охарактеризовать большие панели МКА с использованием

рентгеноструктурной кристаллографии или криоэлектронной микроскопии, чтобы картировать эпитопы [Ekiert D. et al., 2009; Ekiert D. et al., 2011; Dreyfus C. et al., 2012; Tran E. et al., 2016]. Для рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии требуется дорогостоящее оборудование, специализированные методы и потенциально большое количество времени для получения и обработки данных. Альтернативным и быстрым подходом, предложенным еще в начале 1980-х годов, является методика получения эскейп-мутантов (ЭМ) вирусов в присутствии вируснейтрализующих МКА [Wiley D. et al., 1981; Gerhard W. et al., 1981; Jackson D. et al., 1982]. Как и у многих других РНК-содержащих вирусов, работа РНК-зависимой РНК полимеразы вирусов гриппа подвержена ошибкам, что приводит к появлению множества антигенных вариантов с каждым раундом репликации [Nelson M. and Holmes E., 2007; Lauring A. et al., 2010]. Это позволяет использовать вируснейтрализующие МКА в качестве селективного фактора и отбирать варианты вируса, резистентные к действию нейтрализующих МКА. Получение эскейп-мутантов не требует специального оборудования или техники и может выполняться с использованием обычных лабораторных реагентов и оборудования. В общем виде методика получения эскейп-мутантов представлена на рис. 4 [Leon P. et al., 2017]

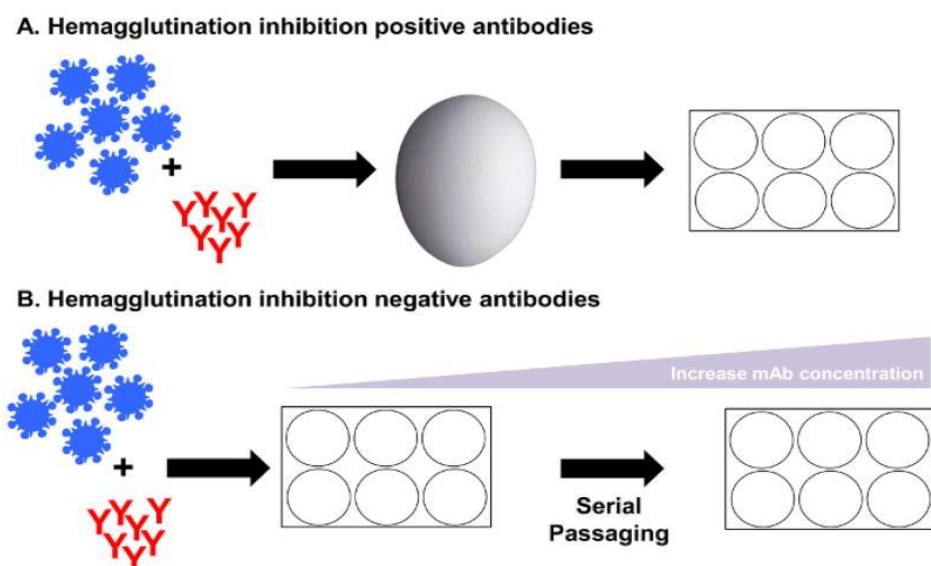


Рис. 4. Получение эскейп-мутантов [по данным Leon P. et al., 2017]

Методика будет зависеть от антигемагглютинирующей и нейтрализующей активности МКА. Получение эскейп-мутантов с использованием МКА, обладающих нейтрализующей и гемагглютинирующей активностью (рис. 4А), может потребовать однократного пассажа в развивающихся куриных эмбрионах. В случае, если вируснейтрализующие МКА не обладают антигемагглютинирующей активностью (рис. 4В), для получения эскейп-мутантов может потребоваться несколько пассажей в культуре клеток с увеличением количества МКА [Leon P. et al., 2017].

Хотя большинство аминокислотных остатков идентифицированных с использованием ЭМ картируются очень точно, одним из основных ограничений данного метода является то, что точечные мутации в ЭМ не обязательно отображают «молекулярный след» антитела, как это делает структурный анализ. Это связано с тем, что некоторые мутации происходят в положениях удаленных от места связывания антитела с эпитопом, и это приводит к значительным конформационным изменениям всей молекулы и антитела перестают распознавать сайт-мишень. Другое ограничение данной методики заключается в том, что она может быть использована только для вируснейтрализующих антител.

Тем не менее, данный методологический прием был успешно использован для эпитопного картирования гемагглютинина вирусов гриппа А субтипа H1N1pdm09 [Rudneva I., et al., 2012; Schmeisser F. et al., 2013; Matsuzaki Y. et al., 2014; Yasuhara A. et al., 2017; Retamal M. et al., 2014, 2017], A(H2N2) [Tsuchiya E. et al., 2001; Krause J., et al., 2012], A(H3) [Caton A. et al., 1982; Daniels P. et al., 1987; Bangaru S. et al., 2016; Benjamin E. et al., 2014; Beer K. et al., 2018], A(H5) [Kaverin N. et al., 2002, 2007; Ohkura T., et al., 2012; Velkov T. et al., 2013; Rockman S. et al., 2013], A(H7) [Schmeisser F. et al., 2015; Thornburg N. et al., 2016], A(H9) [Kaverin N. et al., 2004; Ilyushina N. et al., 2004; Okamatsu M. et al., 2008; Wan Z., et al., 2014; Zhu Y. et al., 2015; Peacock T. et al., 2016], гемагглютинина вирусов гриппа В до расхождения на

две эволюционные линии [Webster R. and Berton M., 1981; Berton M. et al., 1984; Hovanec D. and Air G., 1984; Webster R. and Berton M., 1985], вирусов гриппа В Ямагатской линии [Nakagawa N. et al., 2003], вирусов гриппа В Викторианской линии [Nakagawa N. et al., 2001, 2006], а также HE белка вируса гриппа С [Matsuzaki Y. et al., 2018].

Цель большинства универсальных вакцин против гриппа состоит в том, чтобы выработать устойчивый гуморальный иммунитет к области стебля HA. Показано, что мутантные вирусы, отобранные с использованием МКА, направленных к стеблевой части HA, в опытах *in vivo* на мышах обладали пониженной вирулентностью [Dunand C. et al., 2015]. Эти исследования обосновывают перспективность разработки вакцин с использованием в качестве иммуногена стеблевого региона HA. Кроме того, этот метод можно использовать для получения эскейп-мутантов, устойчивых к действию противовирусных препаратов, и определять детерминанты резистентности к ним. Наконец, эта методология не ограничивается исследованиями поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа, но также может быть более широко использована для определения эпитопов в гликопротеинах других вирусов.

Заключение

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о ряде отличий в антигенной структуре и механизмах антигенной изменчивости вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий. По литературным данным описан ряд известных ключевых аминокислотных позиций в антигенных сайтах молекулы гемаггютина, характерных для разных ветвей вирусов гриппа В.

На основании литературных источников можно сделать вывод, что использование картины трехмерной структуры молекулы в сочетании с техникой получения эскейп-мутантов, т.е. мутантов, резистентных к нейтрализующему действию того или иного МКА, позволяет осуществить

картирование антигенных участков в трехмерной структуре молекулы НА. При этом выявляются позиции аминокислотных остатков, распознаваемых нейтрализующими антителами.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Получение аллантоисной жидкости, содержащей вирусы гриппа.

Культивирование вирусов гриппа проводили в аллантоисной полости развивающихся куриных эмбрионов согласно Методическим рекомендациям НИИ гриппа [Соминина А.А. и др., 2006]

Для получения вирусосодержащей аллантоисной жидкости 10-11-дневные куриные эмбрионы стерильно заражали посевным вирусом в дозе от 10 до 100 ЭИД₅₀/0,2 мл. После герметизации парафином эмбрионы помещали в термостат на 48ч инкубации при температуре $(36 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ для вируса гриппа типа А или на 72 часа при температуре $(33 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ для вируса гриппа типа В. Далее эмбрионы охлаждали при температуре $+4^\circ\text{C}$, вирусосодержащую аллантоисную жидкость стерильно собирали и проводили контроль гемагглютинирующей активности (РГА).

2.2. Очистка и концентрация вирусов.

Вирусные частицы из аллантоисной жидкости осаждали ультрацентрифугированием при 50 000g в течение 2 ч, суспендировали в малом количестве 10 mM трис-ЭДТА буфера, pH 7,2 (STE) и производили очистку вируса через градиент 20-60% сахарозы ультрацентрифугированием 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 цельновирионные суспензии хранили до исследования в замороженном состоянии при -75°C .

2.3. Определение концентрации белка.

Для определения концентрации белка использовали набор “BCATM Protein Assay Kit” («Pierce», США). Реакцию проводили в полном соответствии с Инструкцией по применению. Учет результатов проводили при длине волны 560 нм, используя фотометр Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия). Концентрацию белка в исследуемых пробах

рассчитывали по калибровочной кривой, линейный участок которой соответствовал интервалу концентраций 0,05 - 2 мг/мл, по белку.

2.4. Реакция гемагглютинации (РГА), реакция торможение гемагглютинации (РТГА).

РГА и РТГА ставили общепринятым методом в соответствии с Практическими рекомендациями [Соминина А.А. и др., 2006]. За титр антител принимали их наибольшее разведение, полностью подавляющее гемагглютинацию 4 ГАЕ вируса.

2.5. 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 в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа по методу [Kohler G., and Milstein C., 1976] в следующей модификации. Мышей линии Balb/c иммунизировали путем внутрибрюшинного введения 70 мкг антигена вируса, очищенного ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Через несколько недель мыши были бустированы ОК соответствующего вируса гриппа В в дозе 50 мкг/мышь. 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). Клонирование гибридом проводили методом предельных разведений. Первичное тестирование клонов проводили в ИФА. Гибридные клоны с заданным спектром реагирования реклонировали на селективной среде НАТ («Sigma»). Стабильные клоны гибридом – продуцентов МКА подвергали криоконсервированию, а также использовали для получения асцитов.

2.6. Получение асцитных жидкостей.

Мышам линии BALB/c, предварительно праймированных пристаном (0,5 мл/мышь), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве 3 – 5 миллионов клеток на мышь. Спустя 2 – 3 недели асцитную жидкость отбирали из брюшной полости мышей. Исследования выполнены согласно "Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

2.7. Оценка свойств полученных моноклональных антител в непрямом варианте ИФА.

Вирусным материалом (очищенным концентратом), разведенным карбонатно-бикарбонатным буфером (КББ) до концентрации 2-4 мкг/мл, сенсibilизировали 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), рН 7,2 вносили МКА в ФСБ-Т в разведениях 10^{-3} - 10^{-6} и инкубировали 1 час при 37°C. Связавшиеся с антигеном МКА детектировали с помощью пероксидазных конъюгатов АТ к IgG мыши (Sigma, США) в ФСБ-Т 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% H₂O₂ в ацетат-цитратном буфере, рН 5,0. После остановки реакции 2N H₂SO₄ оптическую плотность измеряли на фотометре Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия) при длине волны 450 нм (OD₄₅₀).

2.8. Определение изотипов моноклональных антител.

Изотипы моноклональных антител определяли в ИФА с использованием коммерческого набора «Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents» («Sigma») в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя.

2.9. Оценка нейтрализующей активности противовирусных антител в микрокультуральном ИФА.

Двукратные разведения МКА (50 мкл) соединяли с равными объемами вируссодержащего материала, содержащего 100 ТЦД₅₀ вируса. 100 мкл смеси вирус/МКА инкубировали 1 час при 37°C, после чего ее наносили на

отмытый 0,01М ФСБ, рН 7,2, монослой культуры клеток MDCK, выращенных в 96-луночных планшетах для культуральных работ (NUNC, Дания). Планшеты выдерживали в CO₂ – инкубаторе до развития ЦПД в контрольных лунках (контроль репродукции 100 ТЦД₅₀ вируса в отсутствие МКА). Культуральную жидкость полностью удаляли, клетки фиксировали в течение 10 мин 80% холодным ацетоном и промывали. Ингибирование синтеза внутриклеточных вирусных белков в присутствии МКА учитывали в микрокультуральном ИФА. Для этого в лунки с фиксированными клетками вносили по 100 мкл конъюгата вируспецифичных МКА с пероксидазой хрена. После 1 часа инкубации при 37°C и отмытки ФСБ пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 0,02% H₂O₂ в ацетат-цитратном буфере, рН 5,0. После остановки реакции с помощью 2N H₂SO₄ измеряли оптическую плотность на фотометре Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия) при длине волны 450 нм (OD₄₅₀). Нейтрализующим титром АТ считали последнее разведение МКА, при котором наблюдалось двукратное снижение ОП₄₅₀ по сравнению с контролем репродукции вируса.

2.10. SDS-электрофорез.

Электрофорез (ЭФ) вирусных очищенных концентратов проводили по методу Леммли [Laemmli U., 1970] в 5-20% градиенте полиакриламида. Вирусные белки разделяли после обработки при различных режимах. Нередуцирующие условия включали обработку проб в течение 2 мин при 100°C, либо в течение 1,5ч при 37°C в лизирующем буфере (0,06 М трис - HCl, рН 6,8; 2% SDS - Na, 6% глицерин; 0,01% бром-феноловый синий), не содержащем бета-меркаптоэтанол (β-ME). Для проведения ЭФ в редуцирующих условиях вирусный концентрат кипятили в лизирующем буфере, содержащем 5% β-ME, в течение 2 мин. В каждую ячейку геля вносили по 5-10 мкг обработанного вируса. После проведения ЭФ белки в геле окрашивали 0,01% раствором Coomassie R250 (Sigma) в 25% изопропанолу и 10% уксусной

кислоте. Молекулярные массы белков определяли по калибровочной кривой с помощью маркеров (Sigma color burst C1992).

2.11. Иммуноблоттинг МКА.

После ЭФ белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НМ) (Millipore Co.) в буфере для переноса (20 mM трис, pH 8,3, 192 mM глицин, 20% этанол) при 100V в течение 1ч. Свободные места на НМ блокировали 18 ч 5% бычьим сывороточным альбумином, Sigma, приготовленном на ФСБ. Инкубацию реплики на НМ с МКА в концентрации 5-10 мкг/мл, разведенных на ФСБ с добавлением БСА, проводили при 37°C в течение 2ч. Затем НМ обрабатывали пероксидазным конъюгатом антител к IgG мыши (Sigma), разведенным 1/1000 блокирующим буфером при 37°C в течение 1 ч. Окраску белков на НМ проводили раствором для блоттинга, содержащим ТМБ с добавлением H₂O₂.

2.12. Клонирование 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 вводили в куриные эмбрионы. Через 72 часа аллантоисную жидкость собирали и исследовали в РГА. Выросшие эскейп-мутанты клонировали 3 раза методом предельных разведений, после чего исследовали их способность реагировать с гомологичными и гетерологичными МКА.

2.13. Секвенирование эскейп – мутантов.

Выделение РНК проводили с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). RT-ПЦР для амплификации фрагментов гена геммаглютинина проводилась с использованием набора реагентов AgPath-ID One-step RT-PCR Kit (Ambion, США). Анализ продуктов амплификации фрагментов проводили гель-электрофорезом в 1,7% агарозном геле в течение 90 мин при разности потенциалов 120 В.

Фотосъемка осуществлялась системой мультиплексной визуализации ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, США).

ДНК из образцов была выделена набором PCR Purification kit (Quiagen, Германия) или с использованием DEAE бумаги. Концентрацию ДНК после выделения определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo, США).

Секвенирование проводили методом Сэнгера с использованием коммерчески доступного набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Состав реакционной смеси: BigDye Terminator - 1 мкл, 5X Sequencing Buffer - 4 мкл, праймер - 1 мкл, ДНК (из расчета 50 нг ДНК в конечном объеме смеси – 10 мкл) - 5 мкл. Конечный объем смеси – 10 мкл. Для увеличения глубины секвенирования каждая реакция была поставлена в двух повторах. Программа секвенирующей реакции: 96°C 10с, 50°C 5 с, 60°C 4 мин (25 циклов). Реакцию секвенирования проводили в термоциклере BioRad CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler (BioRad, США).

Определение нуклеотидных последовательностей производились 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов ABI prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез проводился в полимере ABI prism3130 POP-7.

Сборка, хранение и обработка секвенированных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществлялись в программе Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США). Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance с использованием алгоритма CLUSTAL W. Для образцов были выполнены нуклеотидные и аминокислотные выравнивания последовательностей с референсным штаммом – последовательностью, кодирующей гемагглютинин вируса дикого типа.

Глава 3. Результаты исследования

3.1. Характеристика моноклональных антител к вирусам гриппа В Ямагатской эволюционной линии.

3.1.1 Характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 (генетическая линия 2) Ямагатской эволюционной линии в ИФА.

В целях изучения антигенной изменчивости вирусов гриппа типа В Ямагатской эволюционной линии (ЭЛ) была получена панель из восьми МКА к эталонному вакцинному штамму В/Массачусетс/2/12 [Wkly Epidemiol Rec., 2014], 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) 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) (приложение А, рис. 5-12)

3.1.2. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской эволюционной линии в РТГА.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на способности противовирусных антител ингибировать взаимодействие гемагглютинина вируса гриппа с рецепторами на поверхности эритроцитов. Ценность этой реакции состоит в том, что она позволяет оценить, взаимодействуют ли МКА с областью «рецепторного кармана» и антигенных сайтов молекулы гемагглютинина. Рецепторный карман гемагглютинина вируса гриппа является наиболее важной мишенью для действия противовирусных нейтрализующих антител, препятствующих присоединению вириона к клеточным рецепторам. В связи с этим, РТГА в определенной степени отражает вируснейтрализующие свойства МКА, что является одной из важнейших характеристик антител.

Рецепторная область представляет собой вариабельную область молекулы гемагглютинина, претерпевающую наибольшие изменения в процессе антигенного дрейфа, в результате чего вирус ускользает от действия специфических антител. Взаимодействие МКА с различными штаммами в РТГА позволяет оценить антигенные штаммовые различия в рецепторной области гемагглютинина, что имеет большое практическое и теоретическое значение.

МКА, полученные к штамму В/Массачусетс/2/12 Ямагатской линии обладают выраженной антигемагглютинирующей активностью только в отношении вирусов, принадлежащей этой эволюционной ветви (табл. 2). 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). В настоящее время наибольшее распространение в мире получили вирусы, подобные эталонному штамму В/Пхукет/3073/13, относящиеся к генетической линии 3 [Nonthongkham N. et al., 2016, Tramuto F. et al., 2016, Tewawong et al., 2016, Oong X., et al., 2015]. Однако данные РТГА позволяют говорить, что полученные МКА не потеряли актуальности с точки зрения идентификации новых изолятов. Кроме того, показано, что разработанные МКА не взаимодействуют в РТГА со штаммами вируса гриппа В ранних лет выделения и штаммами Викторианской линии.

Таблица 2. Взаимодействие МКА к В/Массачусетс/2/12 с различными штаммами вируса гриппа В в РТГА.

Эволюционная линия	Штамм	Титр МКА в РТГА*							
		1G4	1G9	2B10	3B12	3C2	4E11	5B11	5F11
Ямагатская ЭЛ	В/Массачусетс/2/12 (генетическая линия 2)	327680	655 360	655 360	327680	327680	20480	655 360	655 360
	В/Ямагата/16/88	10 240	81 920	40 960	10 240	20 480	20 480	163 840	20 480
	В/Панама/45/90	163 840	655 360	163 840	20 480	40 960	40 960	81 920	81 920
	В/Харбин/7/94	163 840	655 360	327 680	163 840	163 840	81 920	327 680	655 360
	В/Яманаши/168/98	81 920	655 360	327 680	40 960	81 920	81 920	163 840	327 680
	В/Виктория/504/00	327 680	655 360	81 920	81 920	81 920	40 960	163 840	327 680
	В/Шанхай/361/02	5 120	40 960	20 480	20 480	81 920	20 480	81 920	81 920
	В/Florida/07/04	20 480	40 960	20 480	20 480	40 960	20 480	40 960	40 960
	В/Флорида/04/06 (генетическая линия 1)	40 960	40 960	40 960	40 960	81 920	20 480	81 920	81 920
В/Пхукет/3073/13 (генетическая линия 3)	5 120	40 960	20 480	20 480	40 960	20 480	40960	40 960	
Викторианская ЭЛ	В/Шандонг/7/97	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/Малайзия/2506/04	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/Брисбен/60/08	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/Брисбен/46/15	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
Штаммы ранних лет выделения (до разделения на линии)	В/Ли/40	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/Грэйт Лэйкс/54	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/Россия/69	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/Гонконг/5/72	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/Сингапур/222/79	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80
	В/СССР/100/83	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80	<80

Примечание - *приведены обратные величины титров.

3.1.3. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской эволюционной линии в реакции нейтрализации.

Способность антител нейтрализовать вирус, ингибируя тем самым инфекционный процесс, является важнейшей характеристикой их функциональной активности. Использование МКА позволяет определить, является ли антигенная детерминанта вирусного белка (в данном случае гемагглютинина), с которой они взаимодействуют, индуктором синтеза вируснейтрализующих антител (АТ). Для оценки вируснейтрализующих свойств АТ был использован микрокультуральный вариант ИФА, основанный на учете остаточной репродукции вируса в монослойных культурах после инкубации его с МКА. Нейтрализующим титром АТ считали последнее разведение МКА, при котором наблюдалось двукратное снижение OD_{450} по сравнению с контролем репродукции вируса. Было установлено, что все МКА проявляли вируснейтрализующую активность: МКА 1G4 до 570 нг/мл, 1G9 до 52 нг/мл, 2B10 до 310 нг/мл, 3B12 до 240 нг/мл, 3C2 до 80 нг/мл, 4E11 до 88 нг/мл, 5B11 – 36 нг/мл и 5F11 до 208 нг/мл (см. приложение Б, рис. 13-20).

3.1.4. Определение направленности МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской линии в иммуноблоттинге.

При электрофорезе был использован штамм иммуноген вируса гриппа В/Massachusetts/2/12.

При электрофорезе, проведенном в редуцирующих условиях, когда разрушены S=S связи, и белки теряют свою конформационную структуру, наблюдалось следующее распределение белковых полос на окрашенном геле:

- предшественник гемагглютинина (HA0), еще неразрезанный ферментами, молекулярная масса (М.м.) 70 кДа;
- мономерная форма нейраминидазы (NA) с М.м. 60 кДа;
- две субъединицы NA: NA1 и NA2 с М.м. 58 и 25 кДа соответственно;

- NP-белок (52-54 кДа);
- М-белок (27 кДа).

Молекулярные массы были определены по калибровочной кривой, построенной с учетом длины пробега на геле маркерных белков.

При электрофорезе, проведенном в нередуцирующих условиях, когда конформационная структура белков, включая четвертичную, частично сохраняется, на геле визуально выявлялись полосы, соответствующие следующим белкам:

- неразделенный на субъединицы гемагглютинин с М.м. 75 кДа;
- NP -белок (52-54 кДа);
- М-белок (27 кДа);
- три высокомолекулярные полосы, соответствующие олигомерным формам поверхностных белков – тримерной (3хНА) и димерной (2хНА) формам гемагглютинина с М.м. 230 и 150 кДа соответственно, и димер нейраминидазы (2хНА) с М.м. 120 кДа.

Проведение иммуноблоттинга после электрофореза в нередуцирующих условиях показало, что все МКА взаимодействовали с двумя олигомерными (2хНА и 3хНА) формами НА и с неразделенным на субъединицы НА (НА0). В восстановленных условиях эти МКА слабо взаимодействовали с неразделенным НА0 и практически не взаимодействовали с тяжелой субъединицей НА1.

Представленные данные свидетельствуют о том, что все исследуемые МКА, полученные к вирусу гриппа В/Massachusetts/2/12 специфичны преимущественно в отношении конформационной структуры гемагглютинина.

3.1.5. Определение изотипов IgG МКА к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской эволюционной линии.

Определение изотипа IgG МКА 1G4, 1G9, 2B10, 3B12, 3C2, 4E11, 5B11 и 5F11 проведено с использованием набора Mouse Monoclonal Antibody

Reagents («Sigma», ISO2-1KT) в соответствии с рекомендациями фирмы – производителя. Определение изотипов IgG показало, что МКА 1G4, 1G9, 2B10, 3B12, 3C2 и 5F11 имели изотип IgG2a, 4E11 – IgG3 и 5B11 – IgG1.

Т.о., установлено, что все МКА к вирусу гриппа В/Massachusetts/2/12 специфичны только в отношении вирусов гриппа В Ямагатской эволюционной линии, генетических групп 1, 2 и 3, обладают выраженной антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью и направлены к большой субъединице (НА1) молекулы гемагглютинина.

3.1.6. Характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной линии.

Дополнительно в исследование была взята ранее разработанная панель из четырех МКА (8Н3, 8Н11, 9А3 и 10F4) к штамму В/Флорида/04/06, относящемуся к генетической линии 1 Ямагатской ветви.

Все полученные МКА реагировали до высоких титров в ИФА (до 10^{-6}) с вирусами Ямагатской ЭЛ, при полном отсутствии взаимодействия с вирусами гриппа В Викторианской ЭЛ и штаммами ранних (1954-1983гг.) лет выделения, с сезонными вирусами гриппа А субтипов А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) (приложение 3, рис. 21-24), а также с потенциально пандемическими вирусами гриппа А(Н2N2), А(Н5N1), А(Н7N9) и А(Н9N2).

МКА 8Н3, 8Н11, 9А3 и 10F4 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 разработанные МКА не проявляли антигемагглютинирующей активности в отношении вирусов 1940 - 1983 гг. выделения и Викторианских изолятов (табл. 3).

Таблица 3 - Взаимодействие МКА к вирусу В/Флорида /04/06 с различными штаммами вируса гриппа В в РТГА.

Эволюционная линия	Штамм	Титры МКА в РТГА*			
		8НЗ	8Н11	9А3	10F4
Штаммы ранних лет выделения	В/Ли/40	<20	<20	<20	<20
	В/Грэйт Лэйк/54	<20	<20	<20	<20
	В/Сингапур/222/79	<20	<20	<20	<20
	В/СССР/100/83	<20	<20	<20	<20
Штаммы Ямагатской эволюционной линии	В/Ямагата/16/88	10240	80	2560	<20
	В/Панама/45/90	20480	160	10240	<20
	В/Пекин/184/93	20	160	80	<20
	В/Харбин/07/94	20480	160	10240	<20
	В/Санкт-Петербург/210/95	160	320	320	<20
	В/Липецк/3/97	640	<20	320	<20
	В/Н.Новгород/348/97	20480	40	1280	<20
	В/Яманаша/166/98	20480	<20	2560	<20
	В/Флорида/07/04	20480	160	5120	320
	В/ Флорида /04/06	20480	160	5120	320
	В/Бангладеш/3333/07	20480	160	5120	320
	В/Массачусетс/2/12	20480	80	2560	160
Штаммы Викторианской эволюционной линии	В/ Пекин /243/97	<20	<20	<20	<20
	В/Шандонг/07/97	<20	<20	<20	<20
	В/Шига/51/98	<20	<20	<20	<20
	В/Малайзия/2506/04	<20	<20	<20	<20
	В/Брисбен/60/08	<20	<20	<20	<20

*Примечание — приведены обратные величины титров

Установлено, что все полученные МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, что обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса В/ Флорида /04/06 (рис. 25).

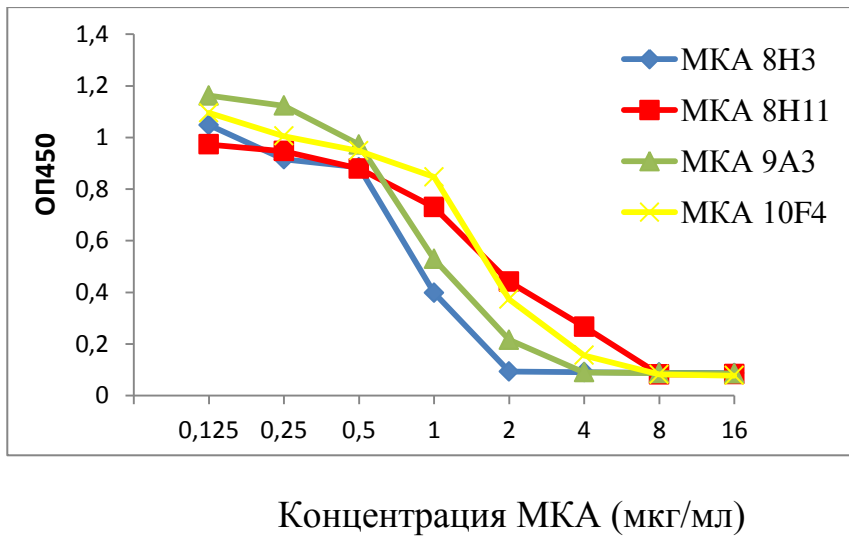


Рисунок 25 - Вируснейтрализующая активность МКА 8Н3, 8Н11, 9А3 и 10F4 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Флорида/04/06

Определение направленности МКА к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 было проведено с использованием иммуноблоттинга. При электрофорезе был использован штамм иммуноген вируса гриппа В/Флорида/04/06. Проведение иммуноблоттинга после электрофореза в нередуцирующих условиях показало, что все МКА взаимодействовали с двумя олигомерными (2хНА и 3хНА) формами НА и с неразделенным на субъединицы НА (НА0). В восстановленных условиях МКА 8Н11 и 10F4 взаимодействовали с тяжелой субъединицей НА1 и неразделенным НА0. МКА 8Н3 и 9А3 практически не определялись в данных условиях. Таким образом, согласно данным western-блота, установлено, что все МКА направлены к молекуле НА, при этом, МКА 8Н11 и 10F4 специфичны как в отношении конформационной структуры гемагглютинина, так и в отношении первичной последовательности гемагглютинина вируса гриппа, тогда как МКА 8Н3 и 9А3 специфичны преимущественно в отношении конформационной структуры гемагглютинина.

3.1.7. Определение изотипов IgG МКА к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной линии.

Определение изотипов IgG МКА было проведено как описано ранее. Определение изотипов IgG показало, что все МКА (8НЗ, 8Н11, 9А3 и 10F4) имели изотип IgG2a.

3.1.8. Заключение

Таким образом, были получены и охарактеризованы новые гибридомы-продуценты МКА к вирусам, к вирусам гриппа В/Массачусетс/2/12 (8 клонов) и В/Флорида/04/06 (четыре клон) Ямагатской эволюционной линии. Установлено, что все МКА специфичны только в отношении вирусов гриппа В Ямагатской ветви, в том числе, Ямагатских штаммов ранних лет выделения (1990-х гг), вирусов гриппа В генетической групп 1, а также современных изолятов, относящихся к генетическим группам 2 и 3. Установлено, что разработанные МКА обладают выраженной антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью и направлены к большой субъединице (НА1) молекулы гемагглютинина.

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

3.2.1. Клонирование эскейп-мутантов вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием моноклональных антител.

Известно, что получение ЭМ, резистентных к действию вируснейтрализующих МКА, является ценным инструментом в изучении изменчивости антигенной структуры гемагглютинина и идентификации иммунодоминантных эпитопов в составе НА1. Использование МКА позволяет определить, является ли антигенная детерминанта вирусного белка, с которой они взаимодействуют, индуктором синтеза вируснейтрализующих антител. Полученные с использованием МКА ЭМ имеют, как правило, одну или две,

реже - три нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные замены. При этом в РТГА с ЭМ в сравнении с исходным вирусом наблюдается 8-32х-кратное и более снижение титров МКА, использованных для селекции. Т.к., все разработанные МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, это обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса. Нами была получена панель из 16 ЭМ, резистентных к вируснейтрализующему действию каждого из МКА, в частности для МКА 1G4, 1G9, 2B10, 3B12, 3C2 и 4E11 по два ЭМ, для МКА 5B11 – три ЭМ и для МКА 5F11 – один ЭМ.

3.2.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Массачусетс/2/12.

В результате анализа НА ЭМ вируса гриппа В/Massachusetts/2/12 в сравнении со штаммом дикого типа были выявлены аминокислотные замены в шести положениях (табл. 4)

Таблица 4 - Аминокислотные замены в секвенированных последовательностях гемагглютинаина эскейп-мутантов вирусов В относительно референсного штамма В/Massachusetts/02/2012

№	Эскейп-мутанты и вирус дикого типа	Позиция (нумерация относительно референсного штамма В/Massachusetts/2/2012)		Замена
		с сигнальным пептидом	без сигнального пептида	
1	ЭМ 1G4/1	156	141	G→E
2	ЭМ 1G4/2	156	141	G→E
3	ЭМ 1G9/1	156	141	G→E
		252	237	G→R
4	ЭМ 1G9/2	252	237	G→R
5	ЭМ 2B10/1	156	141	G→E
6	ЭМ 2B10/2	156	141	G→E
7	ЭМ 3B12/1	255	240	P→Q
8	ЭМ 3B12/2	217	202	N→K
		255	240	P→Q

Продолжение таблицы 4 - Аминокислотные замены в секвенированных последовательностях гемагглютинаина эскейп-мутантов вирусов В относительно референсного штамма В/Massachusetts/02/2012

№	Эскейп-мутанты и вирус дикого типа	Позиция (нумерация относительно референсного штамма В/Massachusetts/2/2012)		Замена
		с сигнальным пептидом	без сигнального пептида	
9	ЭМ 3С2/1	156	141	G→E
10	ЭМ 3С2/2	156	141	G→E
11	ЭМ 4Е11/1	217	202	N→K
12	ЭМ 4Е11/2	217	202	N→K
13	ЭМ 5В11/1	151	136	R→I
		255	240	P→S
14	ЭМ 5В11/2	151	136	R→I
		156	141	G→E
15	ЭМ 5В11/3	151	136	R→I
		255	240	P→S
16	ЭМ 5F11	151	136	R→I
		211	196	D→G
17	В/Massachusetts/2/12	-	-	-

Оказалось, что все замены были расположены в областях, формирующих рецептор-связывающий сайт вируса гриппа В, а именно в петле–140, петле–240 и спирали–190.

3.2.2.1. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 1G4, 2B10 и 3С2.

В наших исследованиях было обнаружено, что ряд ЭМ, отобранных с помощью различных МКА, имели идентичные аминокислотные замены (АК). В частности, ЭМ 1G4/1, 1G4/2, 2B10/1, 2B10/2, 3С2/1 и 3С2/2 имели замену глицина на глутаминовую кислоту (G141→E), расположенную в петле–140 (рис. 26). Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных эпитопов в молекуле HA1 построена на основе

идентификации эпитопов в составе ЭМ и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы НА 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. 26 – 32: петля–140 обозначена желтым, петля–240 – зеленым, спираль–190 – голубым, А – вид сбоку, Б – вид сверху; НА нумерация В/Massachusetts/2/12.

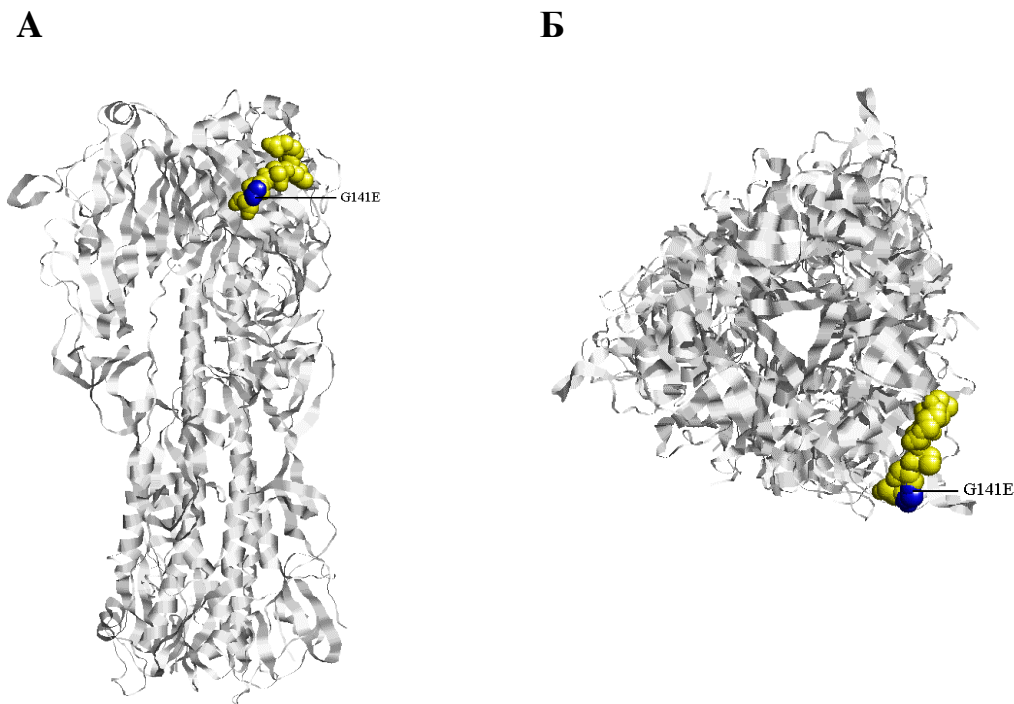


Рис. 26. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 1G4/1, 1G4/2, 2B10/1, 2B10/2, 3C2/1 и 3C2/2 вируса гриппа В/Massachusetts/2/12

3.2.2.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютиниона вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 4E11.

Анализ ЭМ 4E11/1 и 4E11/2, показал, что эти варианты ЭМ имели также единичную аминокислотную замену аспарагина на лизин в положении 202 (202N→K) (рис. 27). Этот аминокислотный остаток расположен в спирали 190

и принимает участие в формировании рецептор-связывающего кармана вируса гриппа типа В

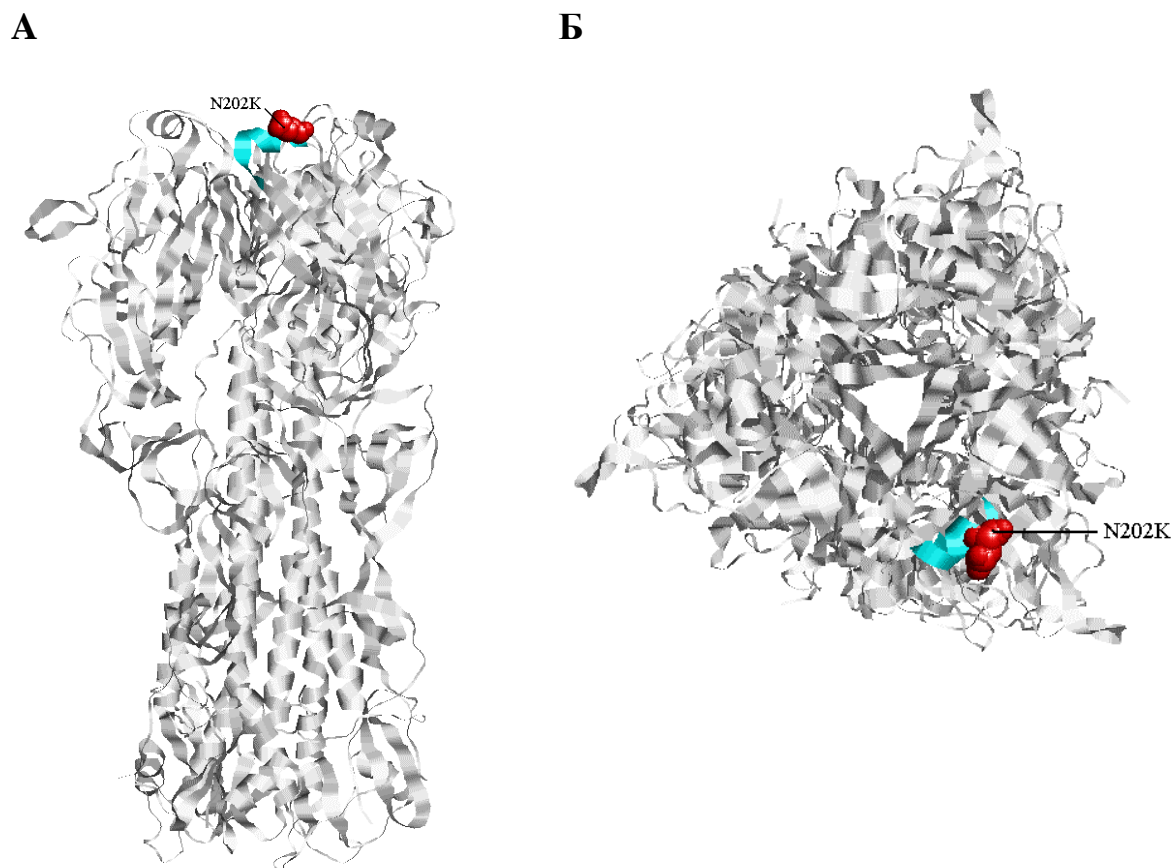


Рис. 27. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 4E11/1 и 4E11/2 вируса гриппа В/Massachusetts/2/12

3.2.2.3. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием 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. 28)

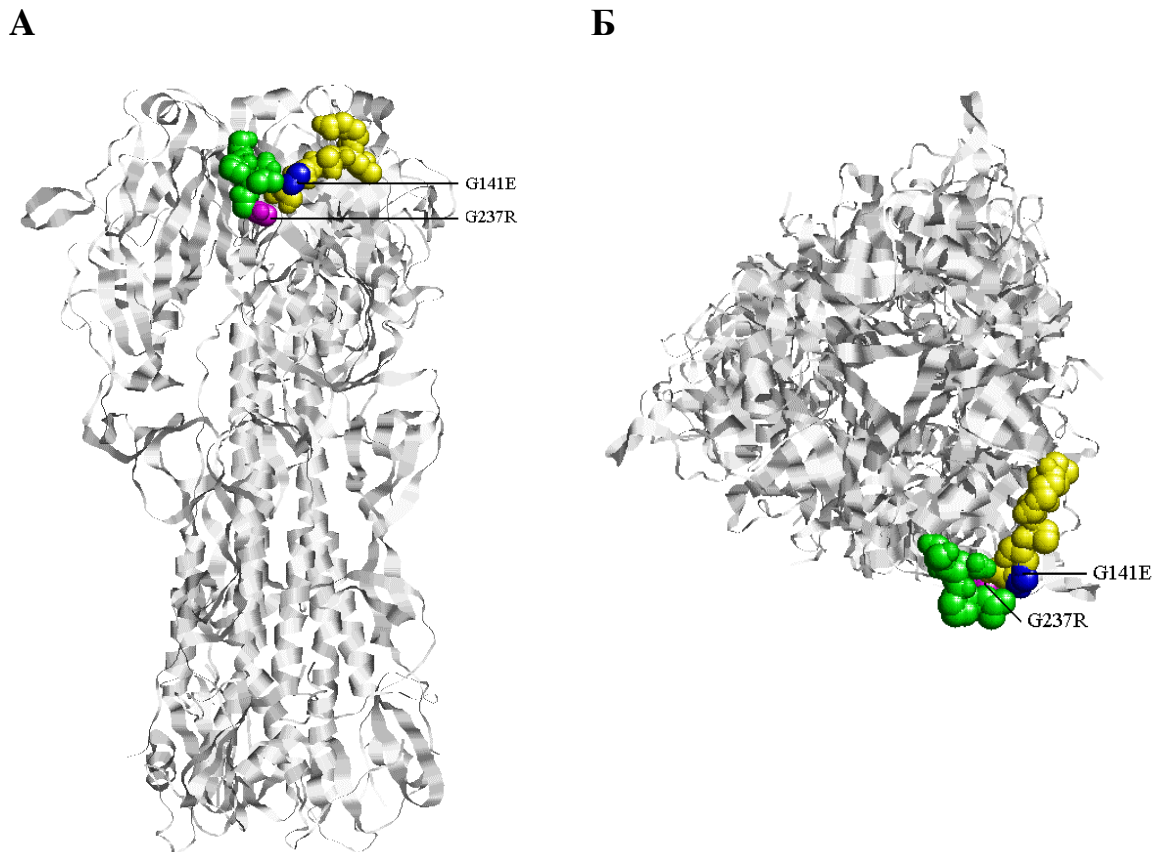


Рис. 28. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 1G9/1 (141G→E и 237G→R) и ЭМ 1G9/2 (237G→R) вируса гриппа В/Massachusetts/2/12

3.2.2.4. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием 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→К (рис. 29)

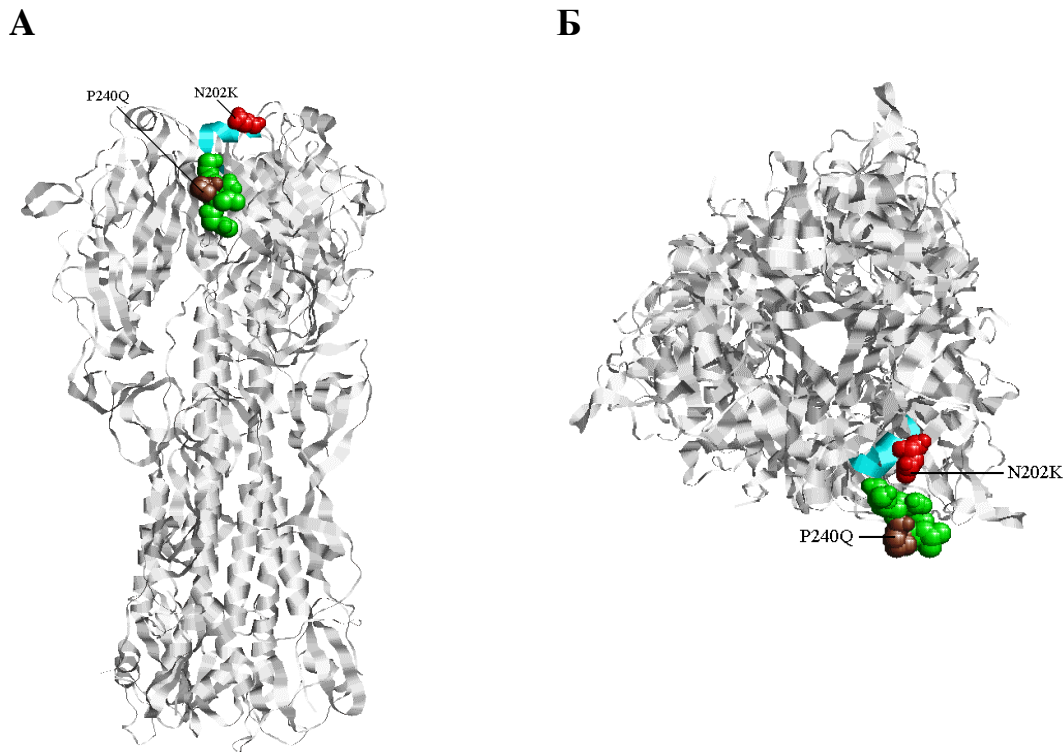


Рис. 29. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 3B12/1 (240P→Q) и ЭМ 3B12/2 (240P→Q и 202N→K) вируса гриппа В/Massachusetts/2/12

Остаток HA1 240, по-видимому является частью антигенного сайта гемагглютинина вируса гриппа В, который частично перекрываются с сайтом D в H3 HA [Wiley D. et al., 1981] и сайтом Ca1 в H1 HA [Caton A. et al., 1982, Gerhard W. et al., 1981]. 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].

3.2.2.5. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 с использованием МКА 5B11.

В нашем исследовании с использованием МКА 5B11 было получено три ЭМ. ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 имели две одинаковые замены в положениях 136 (136R→I) и 240P→S, то время как ЭМ 5B11/2 имел аналогичную замену 136R→I и вторую аминокислотную замену 141G→E (рис. 30).

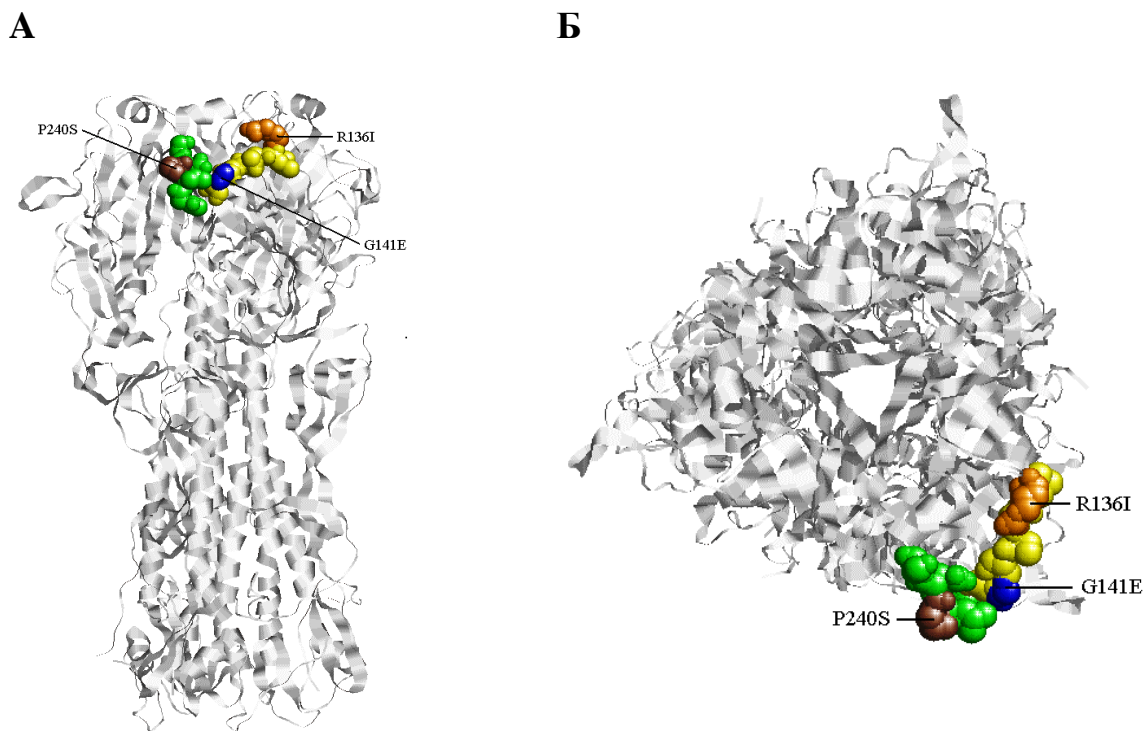


Рис. 30. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 5B11/1 и 5B11/3 (136R→I и 240P→S) и ЭМ 5B11/2 (136R→I и 141G→E) вируса гриппа В/Massachusetts/2/12

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 [Ni F. et al., 2013].

3.2.2.6. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютиниана вируса гриппа В/Massachusetts/2/12 с использованием МКА 5F11.

В результате клонирования вируса дикого типа В/Massachusetts/2/12 в присутствии МКА 5F11 был получен только один ЭМ, имеющий две аминокислотные замены в положениях 136R→I и 196D→G (рис. 31)

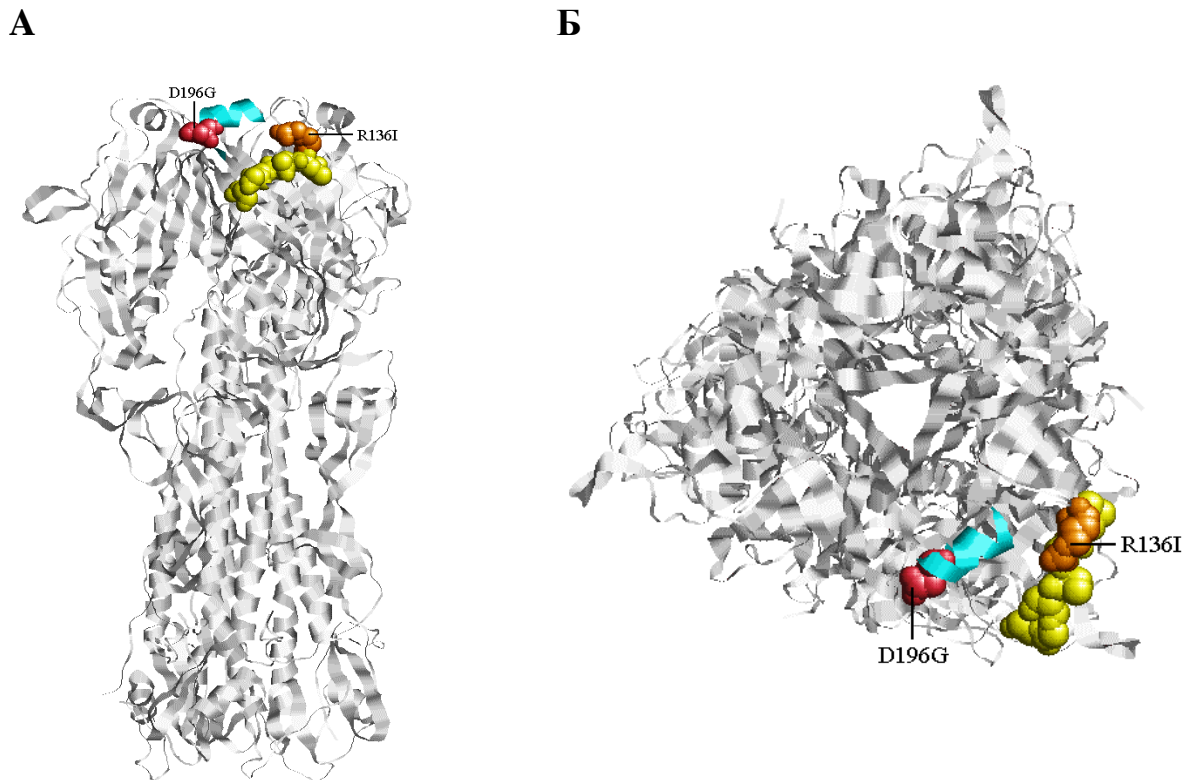
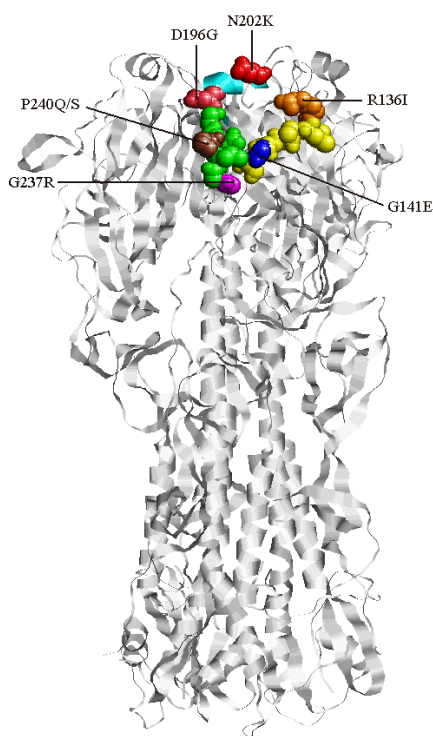


Рис. 31. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутанта 5F11 (136R→I и 196D→G) вируса гриппа В/Massachusetts/2/12

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, вариабельность аминокислотных остатков в положениях 196-198 определяет наличие/отсутствие потенциального сайта N-гликозилирования по позиции 196. Расположение всех аминокислотных остатков, выявленных в HA В/Massachusetts/2/12 в данном исследовании, представлено на рис. 32.

А



Б

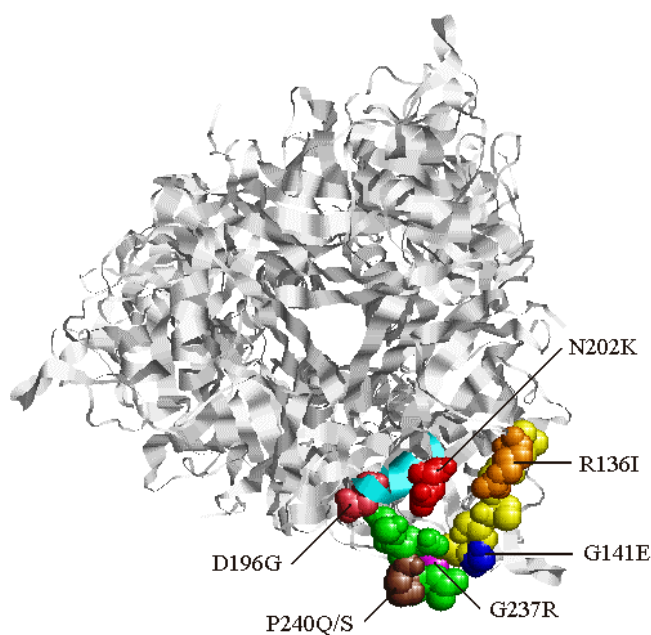


Рис. 32. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов вируса гриппа В/Massachusetts/2/12

Т.о., установлено, что все идентифицированные в данном исследовании аминокислотные остатки вовлечены в формирование рецептор-связывающего кармана гемагглютинаина вируса гриппа В.

3.2.2.7. Влияние аминокислотных замен в составе молекулы гемагглютинаина ЭМ вирусов гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской линии на характер взаимодействия с МКА.

Для определения влияния аминокислотных замен в молекуле HA на характер реагирования вируса со специфическими антителами, было изучено взаимодействие полученных ЭМ с МКА в перекрестной РТГА (табл. 5)

Как видно из таблицы, все полученные ЭМ имели низкую способность к взаимодействию с гомологичными МКА, использованными для селекции. В этом случае титры МКА варьировали от 1/64 для МКА 1G4 до 1/2048 для МКА 5F11 по сравнению с гомологичным титром.

МКА 1G4, 2B10 и 3C2 (специфичны к области 141) показали значительное снижение титров со всеми ЭМ, имеющими замену 141G→E. При этом, МКА 1G4 также имели заметное снижение титра (до 1/32) при взаимодействии с ЭМ 1G9/2, несущим замену 237G→R; ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (замена 202N→K) до 1/64 титра; ЭМ 3B12/2, имеющим замены 202N→K и 240P→Q, до 1/256 титра. Существенного снижения титра при взаимодействии с ЭМ 3B12/1 с единичной заменой P240→Q отмечено не было (1/4 титра). МКА 1G4 реагировали с ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 (замены 136R→I и 240P→S) и ЭМ 5F11 (136R→I и 196D→G) как и с вирусом дикого типа (1-1/2 титра). Т.о., можно предполагать, что МКА 1G4 распознает эпитопы в положениях 141, 202 и 237.

МКА 2B10 показали снижение взаимодействия до 1/16 титра с ЭМ 3B12/1(P240→Q) и 1/256 с ЭМ 3B12/2 (замены 202N→K и 240P→Q). При этом МКА 2B10 взаимодействовали до 1/8 титра с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (замена 202N→K). ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 (замены 136R→I и 240P→S) реагировали с МКА 2B10 до 1/4-1/8 титра. Можно предполагать, что замены в положениях и, 202N→K и 240P→Q, особенно в совокупности играют значимую роль для связывания с МКА 2B10

МКА 3C2, отличии от МКА 2B10 и МКА 1G4, практически не потеряли способности к взаимодействию с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (замена 202N→K), однако показали резкое снижение титров при реакции с ЭМ 3B12/1(P240→Q) до 1/128 и ЭМ 3B12/2 (замены 202N→K и 240P→Q) до 1/512 титра. Замены 136R→I, 240P→S и 136R→I и 196D→G не отразились на характере взаимодействия МКА с эскейп-мутантами. В данном случае можно предполагать, что помимо эпитопа 141, для МКА 3C2 существенное значение имеет конкретный аминокислотный остаток в положении 240.

МКА 1G9, распознающие аминокислотные остатки в положениях 141 и 237 слабо взаимодействовали с ЭМ, имеющими замены в 141 и 237 позициях. МКА 1G9 показали незначительное снижение титров при взаимодействии с 4E11/1 и 4E11/2 (замена 202N→K)

Таблица 5 - Взаимодействие в РТГА эскейп-мутантов вируса гриппа В/Massachusetts/2/12 с моноклональными антителами

Эскейп-мутант	АК замена(ы)	Область рецептор-связывающего кармана	Сайт	Титр ⁻¹ МКА в РТГА							
				1G4	1G9	2B10	3B12	3C2	4E11	5B11	5F11
				G141→E	G141→E G237→R	G141→E	N202→K P240→Q	G141→E	N202→K	R136→I G141→E P240→S	R136→I D196→G
1G4/1	G141→E	петля 140	BA	5120	2560	1280	81 920	640	2560	655 360	327 680
1G4/2	G141→E	петля 140	BA	5120	2560	1280	81 920	640	5120	655 360	327 680
1G9/1	G141→E G237→R	петля 140 петля 240	BA ----	10240	1280	640	40960	640	10240	327 680	163840- 327680
1G9/2	G237→R	петля 240	----	10240	640-1280	640	40960	640	5120- 10240	163840- 327680	81920- 163840
2B10/1	G141→E	петля 140	BA	5120	640-1280	640	81 920	320	5120	327680	327680
2B10/2	G141→E	петля 140	BA	5120	640-1280	640	163 840	320	5120	327680	327680
3B12/1	P240→Q	петля 240	----	81 920	40960- 81 920	20480- 40960	1280	2560	1280	327680	640
3B12/2	N202→K P240→Q	α-спираль 190 петля 240	BB1 ----	1280	5120	2560	< 80	640	<80	5120	5120
3C2/1	G141→E	петля 140	BA	5120	2560	1280	163840	640	5120	655 360	655 360
3C2/2	G141→E	петля 140	BA	5120	1280	1280	163840	640	5120	655 360	655 360
4E11/1	N202→K	α-спираль 190	BB1	5120	163 840	81 920	20 480- 40960	163840	160	327 680	327 680
4E11/2	N202→K	α-спираль 190	BB1	5120	163 840	81 920	40960	163840	160	327 680	327 680
5B11/1	R136→I P240→S	петля 140 петля 240	BA ----	163840	163840	81 920	<80	163840	10240- 20480	320-640	<80
5B11/2	R136→I G141→E	петля 140 петля 140	BA BA	640	5120	2560	<80	2560	2560	10240	160-320
5B11/3	R136→I P240→S	петля 140 петля 240	BA ----	163840	327680	163840	<80	327680	20480	640	<80
5F11	R136→I D196→G	петля 140 α-спираль 190	BA BB1	327680	655 360	327680- 655 360	80-160	327680	20480	2560	320
WT	-----	-----	-----	327680	655 360	655 360	327680	327680	20480	655 360	655 360

до 1/4, до 1/8-1/16 с ЭМ 3В12/1 (P240→Q) и резкое падение титров с ЭМ 3В12/2 (замены 202N→K и 240P→Q). ЭМ 5В11/1 и 5В11/3 (замены 136R→I и 240P→S) связывались с МКА на 1/2-1/4 титра, а ЭМ 5F11 (136R→I и 196D→G) взаимодействовал с МКА 1G9 подобно дикому типу.

МКА 3В12 распознавали аминокислотные остатки в положениях 202N и 240P. МКА 3В12 имели одинаковый характер реагирования с ЭМ 1G4, 2В10 и 3С2 (замена 141G→E) до 1/2-1/4 титра. МКА 3В12 одинаково взаимодействовали до 1/8 с ЭМ 1G9/2 (замена 237G→R) и ЭМ 1G9/2, имеющим две замены 141G→E и 237G→R. Аналогичное взаимодействие было с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (замена 202N→K). При этом МКА 3В12 взаимодействовали до 1/256 с ЭМ 3В12/1 (замена P240→Q) и полностью перестали реагировать с ЭМ 3В12/2 (замены 202N→K и 240P→Q). Аналогично, МКА 3В12 утратили способность к связыванию с ЭМ с ЭМ 5В11/1 и 5В11/3 (замены 136R→I и 240P→S), ЭМ 5В11/2 (136R→I и 141G→E). Также МКА 3В12 практически полностью перестали реагировать с ЭМ 5F11 (136R→I и 196D→G). Видимо, для МКА 3В12 наиболее значимыми являются остатки в положениях 240 и 136, и в меньшей степени – положение 202.

Анализ ЭМ 4E11 установил, что МКА 4E11 специфичны к эпитопу в положении 202. Действительно, МКА 4E11 взаимодействовали с гомологичными ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (замена 202N→K) на 1/128 по сравнению с вирусом дикого типа. Произошла полная утрата способности к взаимодействию с ЭМ 3В12/2 (замены 202N→K и 240P→Q) и значительная – до 1/16 титра с ЭМ 3В12/1 (замены 240P→Q). Менее значительное снижение титров (на 1/8) произошло при реакции с ЭМ 5В11/2 (136R→I и 141G→E).

МКА 5В11 по данным секвенирования ЭМ, были специфичны к областям 136, 240 и 141. Вызывает удивление тот факт, что МКА 5В11 взаимодействовали с ЭМ 1G4, 2В10 и 3С2, имеющими замену 141G→E, практически как и дикий тип вируса (отличия в РТГА не более 1/2). При этом МКА 5В11 слабо реагировали с ЭМ 3В12/2 (202N→K и 240P→Q), но почти до полного титра (на 1/2) с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (202N→K) и ЭМ 3В12/1(P240→Q).

Было отмечено существенное снижение титров с гомологичными ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 (136R→I и 240P→S) и менее значимое с ЭМ 5B11/2 (136R→I и 141G→E). Титр МКА 5B11 с ЭМ 5F11 (136R→I и 196D→G) составлял всего 1/256 от вируса дикого типа.

МКА 5F11 показали незначительное снижение титров на 1/2-1/8 с ЭМ 1G9/1 и 1G9/2 (замены 141G→E, 237G→R и 237G→R, соответственно). При этом МКА 5F11 слабо реагировали с ЭМ 3B12/1(P240→Q) и ЭМ 3B12/2 (202N→K и 240P→Q). МКА 5F11 очень слабо взаимодействовали с ЭМ 5B11/2 (136R→I и 141G→E) и гомологичным ЭМ 5F11 (136R→I и 196D→G). Взаимодействие с ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 (136R→I и 240P→S) отсутствовало полностью. Как известно, гемагглютинин вируса гриппа В включает четыре основные антигенные области – петля-120, петля-150, петля-160, спираль-190 и окружающие их области. Эти структуры расположены в непосредственной близости или частично включены в состав рецептор-связывающего сайта. Эти основные антигенные области расположены близко в пространстве и образуют большой протяженный антигенный сайт [Wang Q. et al., 2008]. Это согласуется с нашими результатами, когда одно МКА распознает антигенные детерминанты в двух структурно различных, но пространственно близких областях.

3.2.3. Антигенное картирование молекулы гемагглютинина вируса гриппа В/Флорида/04/06 с использованием моноклональных антител.

В результате анализа НА ЭМ вируса гриппа В/Флорида/04/06 в сравнении со штаммом дикого типа были выявлены аминокислотные замены в четырех положениях.

Анализ ЭМ 8H3, 8H11, 9A3 и 10F4, полученных к вирусу В/Флорида/04/06, показал, что эти варианты ЭМ имели одиночные аминокислотные замены в положениях N202K (спираль 190), 85 (H→Y), S242R (петля 240) и 40 (Y→H), соответственно (рис. 33). Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных эпитопов в молекуле НА1 построена на основе идентификации эпитопов в составе ЭМ и

опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы НА вируса гриппа В/Яманаши/166/98, PDB code: 4M40 [Ni F. et al., 2013], с использованием программы RasMol, версия 2.7.4.2.

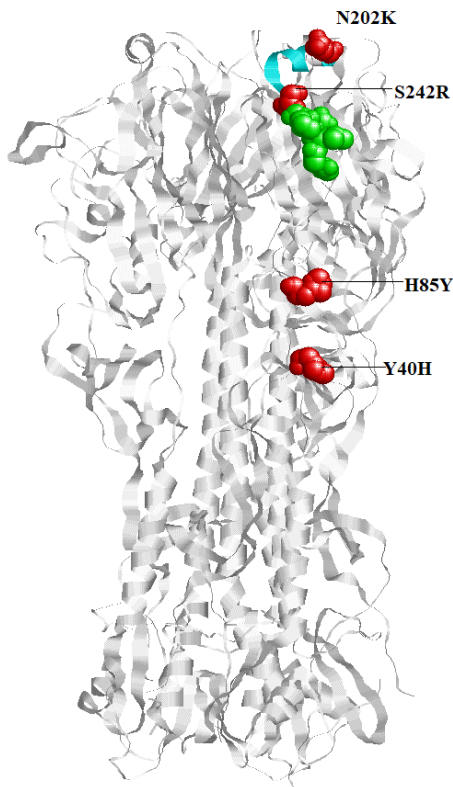


Рис. 33. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов 8НЗ (202N→K), ЭМ 8Н11 (85Н →Y), ЭМ 9А3 (240S→R) и ЭМ 10F4 (40Y→H) вируса гриппа В/Флорида/04/06. Петля–240 обозначена зеленым, спираль–190 – голубым; НА нумерация В/Флорида/04/06.

3.2.3.1. Влияние аминокислотных замен в составе молекулы гемагглютиниона ЭМ вирусов гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской линии на характер взаимодействия с МКА.

Для определения влияния аминокислотных замен в молекуле НА на характер реагирования вируса со специфическими антителами в перекрестной РТГА было изучено взаимодействие полученных ЭМ с различными МКА, специфичных к вирусам гриппа В Ямагатской линии (табл. 6).

Таблица 6 - Взаимодействие эскейп-мутантов вируса гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской линии с гомологичными и гетерологичными моноклональными антителами (по данным РТГА)

Штаммы и ЕМ вирусов гриппа	Титр МКА в РТГА*				АК замены
	8Н3	8Н11	9А3	10F4	
В/Флорида/04/06	20480	160	5120	320	нет (дикий тип)
ЭМ 8Н3	<u>20</u>	80	2560	160	N202K
ЭМ 8Н11	20480	<u><20</u>	2560	160	H85Y
ЭМ 9А3	<20	80	<u><20</u>	160	S242R
ЭМ 10F4	20480	160	2560	<u><20</u>	Y40H

* Примечание — приведены обратные величины титров

Установлено, что все полученные ЭМ полностью утратили способность к взаимодействию с гомологичными МКА, использованными для селекции. Кроме того, ЭМ 8Н3, 8Н11 и 10F4 не проявили каких-либо особенностей взаимодействия с гетерологичными МКА по сравнению со штаммами дикого типа (титр в РТГА 1-1/2). ЭМ 9А3 (замена S242R), кроме резистентности к гомологичным МКА, перестал взаимодействовать с МКА 8Н3, тогда как ЭМ 8Н3 (замена N202K) взаимодействовал с МКА 9А3 до полного титра. Т.о., в данном случае сохранилось только одностороннее антигенное родство. Вероятно, это связано с тем, что аминокислотные остатки в положениях 202 и 242 входят в спираль 190 и петлю 240, они расположены в мембранно-дистальном конце молекулы НА и включены в состав рецептор-связывающего кармана вируса гриппа В.

Таким образом, выполненные исследования дали возможность четко локализовать иммунодоминантные эпитопы в составе молекулы гемагглютинина вирусов гриппа В Ямагатской линии, ответственные за выработку вируснейтрализующих антител. ЭМ 8Н3 имел замену N202K, входящую в спираль 190 и рецептор-связывающий карман молекулы НА1. ЭМ 10F4 имел одиночную замену в положении 40 (Y→H), которая по современной классификации не входит ни в один из антигенных сайтов, но часто встречается

у полевых изолятов [Лобова Т.Г. и др., 2012]. ЭМ 8Н11 и 9А3 имели одиночные аминокислотные замены в положениях 85 (H→Y) и 242 (S→R) соответственно. Аминокислотный остаток в положении 85 является высококонсервативным, но изредка встречается у полевых изолятов, как, например, у штаммов В/Пекин/76/1998, В/Айдахо/03/2008 и В/Нью Джерси/07/2008. При этом, как и у ЭМ 8Н11, у данных штаммов имелась АК замена Н85Y [Stray S. and Pittman L., 2012]. Замена в положении 242 ранее описана не была, что расширяет представления об антигенно значимых детерминантах в составе гемагглютинаина вируса гриппа типа В.

3.2.4. Заключение

Благодаря наличию вируснейтрализующей активности у разработанных МКА была получена панель из 16 эскейп-мутантов эталонного штамма В/Массачусетс/2/12 и четыре эскейп-мутанта к вирусу В/Флорида/04/06, резистентных к МКА.

Проведенное секвенирование НА последовательностей ЭМ В/Массачусетс/2/12 и сравнение их с вирусом дикого типа позволило идентифицировать в составе молекулы НА1 вируса гриппа В Ямагатской эволюционной линии АК остатки в положениях 136 и 141 (петля-140), 196 и 202 (спираль-190), 237 и 240 (петля-240). Показано, что все идентифицированные аминокислотные остатки вовлечены в формирование рецептор-связывающего кармана гемагглютинаина вируса гриппа В и влияют на антигенную специфичность НА. Анализ первичной последовательности НА ЭМ вируса В/Флорида/04/06 показало наличие четырех аминокислотных замен, в том числе в положениях 202 (спираль-190) и 242 (петля-240), входящих в состав рецептор-связывающего сайта, а также замен в положениях 40 и 85, не входящих ни в один из описанных антигенных сайтов НА вирусов гриппа В.

3.3. Характеристика моноклональных антител к вирусам гриппа В Викторианской эволюционной линии.

3.3.1. Характеристика моноклональных антител к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 (генетическая линия 1А) Викторианской эволюционной линии в ИФА.

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, обозначенные как МКА 6А4, 6А9, 6Е11, 7С8, 7D9, 7G9, 7Н8, 8А8, 9В5, 9G5, 10В6, 10D3, 10D9, 10F1, 11G2 и 11G10. Данный штамм является В/Брисбен/60/08–подобным вирусом, рекомендованным для включения в состав вакцин в северном полушарии в сезоны 2016-2017 [Wkly Epidemiol Rec., 2016] и 2017-2018 годов [Wkly Epidemiol Rec., 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 субтипов А(Н1N1)pdm09, А(Н2N2), А(Н3N2), А(Н5N1), А(Н7N9) и А(Н9N2) (приложение 4, рис. 34 – 49).

3.3.2. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии в РТГА.

МКА были исследованы в РТГА с набором штаммов разных лет выделения, относящихся к различным эволюционным линиям (таблица 7). Установлено, что все МКА обладали выраженной антигемагглютинирующей активностью в отношении вируса-иммуногена В/Брисбен/46/15. По степени интенсивности взаимодействия в РТГА со штаммом – иммуногеном МКА были условно разделены на 2 группы – 1) МКА (6А9, 7С8, 7D9, 7G9, 8А8 и 10F1) с невысокой активностью (титры 1/80 – 1/320) и 2) МКА (6А4, 6Е11, 7Н8, 9В5, 9G5, 10В6, 10D3, 10D9, 11G2 и 11G10) с высокими титрами (1/5120 - 1/163840). Ни одно из МКА не взаимодействовало в РТГА с вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ. и штаммами 1940-1959 г.г. выделения. Отмечено, что МКА 6Е11, 9G5, 9В5 и 6А4 обладали способностью связываться с вирусом

Таблица 7 – Взаимодействие моноклональных антител с эталонными штаммами вируса гриппа В разных лет выделения в РТГА

Штамм	Титр ⁻¹ МКА в РТГА															
	6A4	6A9	6E11	7C8	7D9	7G9	7H8	8A8	9B5	9G5	10B6	10D3	10D9	10F1	11G2	11G10
Штаммы ранних лет выделения																
В/Ли/40	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Грейт Лэйкс/54	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Мэриленд/1/59	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Россия/69	1280	<20	1280	<20	<20	<20	<160	<20	10240	20480	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Гонконг/5/72	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	81920	<160	40960	<20	<160	<20
В/Сингапур/222/79	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	81920	<160	40960	<20	<160	<20
В/СССР/100/83	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	20480	<160	<160	<20	<160	<20
В/Миннесота/1/85	160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	20480	<160	10240	<20	<160	<20
Штаммы Ямагатской эволюционной линии																
В/Ямагата/16/88	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Панама/45/90	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Харбин/07/94	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Яманаша/166/98	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Виктория/504/00	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Флорида/07/04	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Массачусетс/2/12	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
В/Пхукет/3073/13	<160	<20	<160	<20	<20	<20	<160	<20	<160	<160	<160	<160	<160	<20	<160	<20
Штаммы Викторианской эволюционной линии																
В/Виктория/2/87	640	<20	320	160	<20	80	<160	<20	<160	<160	81920	<160	40960	80	<160	<20
В/Шандонг/7/97	5120	<20	10240	40	<20	80	40960	<20	<160	<160	40960	10240	163840	<20	1280	<20
В/Шига/51/98	10240	<20	5120	160	<20	80	40960	<20	<160	<160	40960	2560	40960	80	<160	<20
В/Токио/53/99	2560	<20	5120	160	<20	160	20480	<20	<160	<160	40960	640	40960	<20	5120	<20
В/Гонконг/330/01	<160	<20	<160	320	<20	160	40960	<20	<160	<160	40960	<160	163840	80	81920	160
В/Малайзия/2506/04	20480	<20	10240	160	<20	80	81920	<20	<160	<160	40960	1280	40960	80	10240	<20
В/Брисбен/60/08	40960	20	40960	320	160	160	20480	80	81920	40960	40960	81920	40960	80	1280	1280
В/Техас/2/13	40960	40	20480	160	80	80	20480	40	81920	40960	20480	81920	20480	80	<160	80
В/Брисбен/46/15	81920	80	81920	320	160	160	163840	80	163840	163840	81920	163840	81920	80	81920	5120

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 10В6 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 эталонным 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.

Предполагается, что штаммы Ямагатской линии эволюционировали от В/СССР/100/83-подобных штаммов [Rota P. et al., 1990, Ambrose C. et al., 2012]. Было показано, что вирусы Ямагатской разновидности отличались от штамма В/СССР/100/83 на 16-18 аминокислотных замен, а от эталонного представителя В/Виктория/2/87 на 25-27 аминокислотных замен [Rota P. et al., 1990]. Кроме того, у штаммов В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83 показано наличие делеций в гене НА, что характерно для В/Ямагата – подобных вирусов. Так как, МКА 6Е11 и 6А4 реагировали в РТГА со всеми протестированными штаммами Викторианской ЭЛ, за исключением В/Гонконг/330/01, можно предполагать, что эти МКА направлены к консервативному эпитопу, который имелся у вирусов гриппа В еще до 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 9B5, 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 α -спиралью молекулы HA, что характерно для эталонного штамма В/Брисбен/60/08 [Лобова Т.Г. и др., 2012].

МКА 7C8, 7G9, 10B6 и 10D9 взаимодействовали в РТГА со всеми вируса гриппа В Викторианской линии (В/Шандонг/7/97-, В/Гонконг/330/01-, В/Малайзия/2506/04- и В/Брисбен/60/08-подобные штаммы), что позволяет предполагать, что данные МКА направлены к консервативному эпитопу/эпитопам, специфичным для гемагглютинаина вирусов гриппа В Викторианской ветви.

Для оценки способности полученных МКА взаимодействовать с современными штаммами вируса гриппа В Викторианской филогенетической ветви было проведено тестирование МКА в РТГА с отечественными изолятами 2016-2017 г.г. выделения. Были проанализированы вирусы, выделенные в двух различных системах – в куриных эмбрионах (КЭ) и культуре клеток MDCK. Установлено, что МКА 6A4, 6E11, 7H8, 9B5, 9G5, и 10D3, реагировали в РТГА до высоких титров со всеми исследованными вирусами, независимо от системы выделения (таблица 8). МКА 7C8, 7G9 и 10F1 также взаимодействовали как с вирусами, выделенными в КЭ, так и с MDCK-вариантами, при этом, как правило, титры МКА при реагировании с «клеточными» изолятами был выше. Совершенно

Таблица 8 – Взаимодействие моноклональных антител со штаммами вируса гриппа В 2016-2017 г.г. выделения в РТГА

Штамм	Титр ¹ МКА в РТГА															
	6A4	6A9	6E11	7C8	7D9	7G9	7H8	8A8	9B5	9G5	10B6	10D3	10D9	10F1	11G2	11G10
В/С-Петербург/44/17 ¹	40960	<20	20480	160	80	80	81920	<20	81920	81920	20480	163840	40960	80	<160	160
В/С-Петербург/79/17 ¹	81920	20	81920	160	20	160	163840	20	81920	81920	20480	163840	40960	80	5120	1280
В/С-Петербург/80/17 ¹	20480	<20	20480	160	160	80	40960	20	40960	81920	20480	81920	81920	80	<160	<20
В/С-Петербург/83/17 ¹	81920	20	81920	80	≤20	80	81920	<20	163840	327680	40960	163840	40960	40	2560	<20
В/С-Петербург/104/17 ¹	40960	<20	40960	80	<20	80	40960	<20	40960	81920	20480	40960	20480	40	1280	<20
В/С-Петербург/106/17 ¹	40960	<20	40960	160	<20	160	40960	<20	81920	81920	20480	81920	40960	80	<160	<20
В/С-Петербург/114/17 ¹	40960	<20	20480	80	80	40	40960	<20	40960	40960	40960	40960	40960	40	<160	320
В/С-Петербург/120/17 ¹	20480	<20	20480	80	<20	80	10240	<20	10240	20480	10240	10240	10240	20	<160	160
В/С-Петербург/156/17 ¹	81920	≤20	81920	80	<20	80	81920	<20	81920	163840	20480	163840	20480	40	1280	<20
В/С-Петербург/174/17 ¹	20480	<20	40960	80	<20	80	20480	<20	40960	40960	20480	40960	20480	40	1280	<20
В/С-Петербург/187/17 ¹	40960	<20	40960	80	<20	80	20480	<20	40960	40960	20480	40960	20480	40	10240	640
В/С-Петербург/200/17 ¹	40960	160	40960	80	<20	80	20480	<20	40960	81920	20480	40960	20480	40	5120	<20
В/С-Петербург/201/17 ¹	40960	<20	40960	80	<20	80	20480	<20	20480	40960	10240	20480	20480	40	<160	<20
В/С-Петербург/203/17 ¹	20480	<20	20480	40	<20	40	10240	<20	20480	20480	10240	20480	20480	20	1280	320
В/С-Петербург/209/17 ¹	81920	<20	40960	80	<20	80	20480	<20	40960	81920	20480	40960	40960	40	2560	<20
В/С-Петербург/225/17 ¹	81920	<20	81920	80	<20	80	81920	<20	327680	163840	40960	327680	20480	80	320	<20
В/С-Петербург/225/16 ²	327680	160	163840	5120	320	1280	327680	640	327680	327680	160	327680	1280	320	<160	<20
В/С-Петербург/230/16 ²	81920	160	40960	10240	160	640	40960	2560	163840	163840	<160	163840	640	160	<160	<20
В/С-Петербург/292/16 ²	81920	160	40960	2560	160	640	40960	320	163840	81920	<160	81920	640	160	<160	<20
В/С-Петербург/323/16 ²	163840	80	81920	2560	160	320	81920	320	327680	163840	<160	163840	640	160	<160	<20
В/С-Петербург/324/16 ²	40960	160	40960	2560	320	640	81920	640	163840	163840	<160	163840	640	160	<160	<20
В/Иркутск/2/16 ²	40960	160	40960	10240	320	2560	81920	5120	40960	327680	<160	81920	1280	160	<160	<20
В/Иркутск/4/16 ²	163840	160	163840	20480	640	2560	327680	1280	327680	327680	320	327680	1280	320	<160	<20
В/Астрахань/2/17 ²	40960	<20	40960	160	160	80	81920	≤20	40960	163840	40960	81920	81920	80	<160	<20
В/С-Петербург/148/17 ²	327680	160	163840	20480	640	2560	327680	2560	163840	327680	160	327680	1280	160	<160	<20
В/Брисбен/46/15¹	81920	80	81920	320	160	160	163840	80	163840	163840	81920	163840	81920	80	81920	5120

Примечания

¹Штаммы, изолированные в куриных эмбрионах²Штаммы, изолированные в культуре клеток MDCK

другая картина наблюдалась при взаимодействии вирусов, выделенных в разных системах, с МКА 6А9, 7D9 и 8А8. МКА 6А9, 7D9 и 8А8 практически не взаимодействовали с вирусами, выделенными в КЭ (титр в РТГА $<20 - 1/20$), но при этом МКА 8А8 реагировали до более высоких титров со штаммами, выделенными в клетках MDCK, по сравнению со штаммом-иммуногеном В/Брисбен/46/15, а МКА 6А9 имели сходный уровень взаимодействия. МКА 7D9 также не взаимодействовали с большинством КЭ-вариантов вирусов, но при этом хорошо реагировали с MDCK-вариантами. С другой стороны МКА 10В6, 11G2 и 11G10 практически не взаимодействовали с MDCK-вариантами, а МКА 10D9 имели значительно более низкие титры в РТГА с MDCK-вариантами, по сравнению с изолятами, выделенными на КЭ. С целью проверки предположения, что МКА отличаются по уровню взаимодействия в РТГА с вирусами, изолированных в различных системах выделения, было проведено сравнение штаммов, выделенных параллельно в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK (таблица 9). Действительно, оказалось, что МКА 6А9, 7D9 и 8А8 практически не типировали варианты вирусов, выделенных в КЭ, тогда как, те же вирусы, но выделенные в клетках MDCK, реагировали с МКА в РТГА до высоких титров. МКА 6А4, 6Е11, 7С8, 7D9, 7Н8, 9В5, 9G5, 10D3 и 10F1, выявляли в РТГА оба варианта изолятов, но при этом титр МКА с MDCK-вариантами был выше по сравнению с КЭ-вариантами вирусов. МКА 10В6 и 11G2 практически не реагировали с MDCK-вариантами.

Известно, что вирусы гриппа В, адаптированные к размножению в куриных эмбрионах, отличаются по антигенной структуре НА от вирусов, выращенных в культуре клеток MDCK. Было показано, что культивирование вирусов в различных системах приводит к ряду специфических замен в большой субъединице НА. В частности, было обнаружено, что адаптация вирусов гриппа В к куриным эмбрионам приводит к потере сайта гликозилирования (N-X-T) в позициях 194-196 в молекуле НА1 [Lugovtsev V et al., 2007]. Кроме того, показано, что некоторые лабораторные варианты вируса гриппа В, выращенные

Таблица 9 – Сравнение взаимодействия моноклональных антител со штаммами вируса гриппа В в РТГА, изолированных параллельно в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK

Штамм	Титр ⁻¹ МКА в РТГА															
	6A4	6A9	6E11	7C8	7D9	7G9	7H8	8A8	9B5	9G5	10B6	10D3	10D9	10F1	11G2	11G10
В/С-Петербург/176/17 ¹	20480	<20	40960	80	<20	20	20480	<20	40960	40960	10240	20480	20480	40	<160	320
В/С-Петербург/176/17 ²	81920	320	163840	10240	640	5120	327680	5120	327680	327680	320	327680	2560	1280	<160	<20
В/С-Петербург/204/17 ¹	20480	<20	40960	160	≤20	80	20480	<20	40960	81920	20480	40960	20480	40	1280	<20
В/С-Петербург/204/17 ²	163840	320	81920	10240	2560	5120	327680	10240	327680	327680	320	327680	2560	2560	<160	<20
В/С-Петербург/210/17 ¹	81920	≤20	81920	160	≤20	160	81920	20	163840	163840	81920	327680	40960	160	1280	<20
В/С-Петербург/210/17 ²	163840	640	327680	10240	640	1280	327680	5120	327680	327680	320	327680	1280	2560	<160	<20
В/С-Петербург/234/17 ¹	20480	<20	20480	80	<20	80	20480	<20	40960	40960	20480	20480	20480	40	<160	<20
В/С-Петербург/234/17 ²	81920	320	163840	20480	1280	5120	327680	10240	163840	163840	160	163840	1280	1280	<160	<20
В/С-Петербург/235/17 ¹	81920	20	81920	160	<20	160	81920	<20	163840	163840	20480	163840	40960	80	640	320
В/С-Петербург/235/17 ²	81920	320	81920	5120	320	1280	327680	1280	327680	327680	160	327680	1280	640	<160	<20
В/С-Петербург/236/17 ¹	20480	<20	20480	80	<20	80	20480	<20	20480	40960	10240	20480	20480	40	<160	<20
В/С-Петербург/236/17 ²	163840	160	81920	2560	320	640	163840	640	327680	163840	160	327680	1280	640	<160	<20
В/С-Петербург/238/17 ¹	40960	<20	40960	80	<20	80	20480	<20	40960	81920	20480	40960	40960	40	5120	320
В/С-Петербург/238/17 ²	163840	80	81920	1280	320	640	327680	640	163840	163840	160	327680	1280	320	<160	<20
В/С-Петербург/257/17 ¹	81920	20	81920	160	20	160	81920	<20	163840	163840	40960	163840	40960	160	1280	<20
В/С-Петербург/257/17 ²	81920	320	163840	20480	640	5120	327680	10240	163840	327680	160	327680	1280	1280	<160	<20
В/Брисбен/46/15¹	81920	80	81920	320	160	160	163840	80	163840	163840	81920	163840	81920	80	81920	5120

Примечания

¹Штаммы, изолированные в куриных эмбрионах

²Штаммы, изолированные в культуре клеток MDCK

на куриных эмбрионах, проявляли альтернативные антигенные свойства благодаря единичной замене глицина в положении 141 [Lugovtsev V. et al., 2005, 2009]. Было показано, что адаптированный к куриным эмбрионам вирус В/Lyon/1271/96, несущий замену 141Gly→Arg, показал увеличение сродства к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе), в то время как связывание с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамином) было ослаблено. В тоже время, MDCK-адаптированный вариант того же вируса с Gly141 отображал улучшенное сродство с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамином) и значительно меньшее сродство к 3'-сиалил(N-ацетиллактозой) [Govorkova E. et al., 1999]. Вероятно, ряд МКА распознают антигенные области НА вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ, которые подвержены изменениям в результате культивирования в различных клеточных системах и имеют различную рецепторную специфичность. Этим можно объяснить отсутствие взаимодействия некоторых МКА с эталонными В/Виктория – подобными штаммами, т.к., все эти вирусы выращивались в КЭ.

3.3.3. Характеристика МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии в реакции нейтрализации.

Для оценки вируснейтрализующих свойств МКА был использован микрокультуральный вариант ИФА, основанный на учете остаточной репродукции вируса в монослойных культурах клеток MDCK после инкубации его с МКА. Нейтрализующим титром МКА считали последнее разведение МКА, при котором наблюдалось двукратное снижение OD₄₅₀ по сравнению с контролем репродукции вируса. Было установлено, что все МКА проявляли вируснейтрализующую активность в отношении вируса В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии (таблица 10).

Таблица 10 – Нейтрализующая активность МКА со штаммами вирусов гриппа В разных эволюционных групп

МКА	Штаммы ранних лет выделения			Викторианская ЭЛ	Ямагатская ЭЛ
	В/Россия/69	В/Гонконг/5/72	В/Сингапур/222/79	В/Брисбен/46/15	В/Массачусетс/2/12, В/Пхукет/3073/13
6А4	1,8 мг/мл	–	–	0,112 мкг/мл	–
6А9	–*	–	–	140 мкг/мл	–
6Е11	2,2 мг/мл	–	–	0,13 мкг/мл	–
7С8	–	–	–	2 мкг/мл	–
7D9	–	–	–	122 мкг/мл	–
7G9	–	–	–	40 мкг/мл	–
7Н8	–	–	–	0,18 мкг/мл	–
8А8	–	–	–	40 мкг/мл	–
9В5	14 мкг/мл	–	–	56 нг/мл	–
9G5	74 мкг/мл	–	–	36 мкг/мл	–
10В6	–	1,5 мкг/мл	1,5 мкг/мл	0,36 мкг/мл	–
10D3	–	–	–	52 нг/мл	–
10D9	–	1, 1 мкг/мл	9, 1 мкг/мл	0,56 мкг/мл	–
10F1	–	–	–	300 мкг/мл	–
11G2	–	–	–	1,28 мкг/мл	–
11G10	–	–	–	120 мкг/мл	–

–* Нейтрализующей активности не выявлено

При этом нейтрализующая активность различных МКА варьировала в широких пределах 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 с изолятами ранних лет выделения, обладали в отношении этих же штаммов и нейтрализующей активностью. Так МКА 6А4, 6Е11, 9В5 и 9G5 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 10D9 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 изолятах вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ.

3.3.4. Определение направленности МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии в иммуноблоттинге.

При электрофорезе был использован штамм иммуноген вируса гриппа В/Брисбен/46/15. Молекулярные массы были определены по калибровочной кривой, построенной с учетом длины пробега на геле маркерных белков.

Проведение иммуноблоттинга после электрофореза в нередуцирующих условиях показало, что все МКА взаимодействовали с двумя олигомерными (2хНА и 3хНА) формами НА и с неразделенным на субъединицы НА (НА0). В восстановленных условиях МКА 6А9, 7С8, 7D9, 7G9, 8А8 и 10F1 взаимодействовали с тяжелой субъединицей НА1 и неразделенным НА0. МКА 6А4, 6E11, 7Н8, 9В5, 9G5, 10В6, 10D3, 10D9, 11G2 и 11G10 проявляли крайне слабую активность в редуцирующих условиях электрофореза или не обладали ею вовсе. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что МКА 6А9, 7С8, 7D9, 7G9, 8А8 и 10F1, полученные к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 специфичны как в отношении конформационной структуры гемагглютинаина, так и в отношении первичной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа. С другой стороны МКА 6А4, 6E11, 7Н8, 9В5, 9G5, 10В6, 10D3, 10D9, 11G2 и 11G10 распознают преимущественно конформационную структуру молекулы гемагглютинаина.

3.3.5. Определение изотипов IgG МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской эволюционной линии.

Определение изотипа IgG МКА 6А4, 6А9, 6E11, 7С8, 7D9, 7G9, 7Н8, 8А8, 9В5, 9G5, 10В6, 10D3, 10D9, 10F1, 11G2 и 11G10 проведено с использованием набора Mouse Monoclonal Antibody Reagents («Sigma», ISO2-

1КТ) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Определение изотипов IgG показало, что МКА 6A9, 8A8 и 9B5 имели изотип IgG1, МКА 7C8, 7G9, 10F1, 10D9, 10B6 – изотип IgG2a, МКА 7D9 – изотип IgG2b и МКА 6A4, 6E11, 7H8, 9G5, 10D3, 11G2 и 11G10 – изотип IgG3.

Т.о., установлено, что все МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 специфичны только в отношении вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии и ряда штаммов ранних лет выделения, обладают выраженной антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью и направлены к большой субъединице (НА1) молекулы гемагглютенина.

3.3.6. Характеристика МКА, полученных к вирусу гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской эволюционной линии.

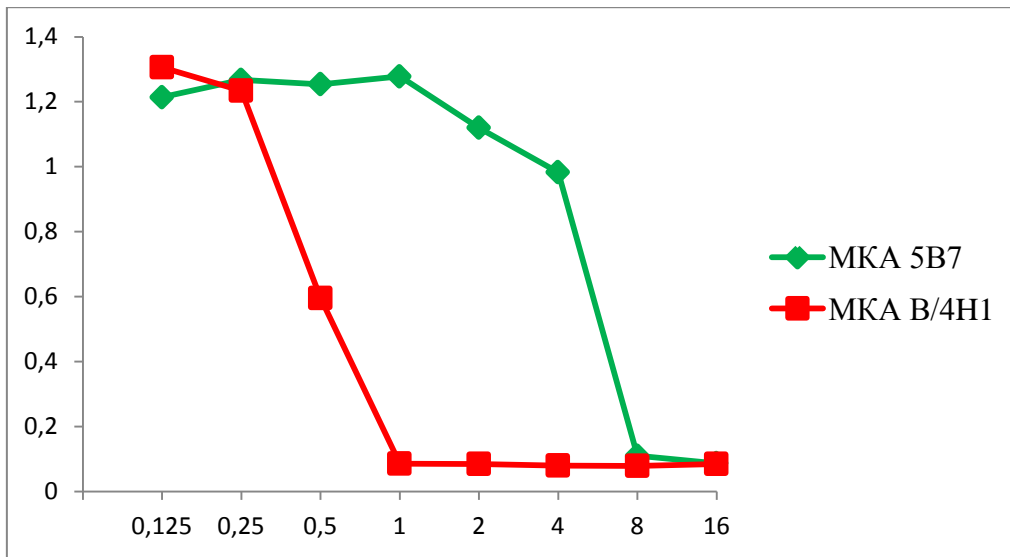
В целях изучения антигенной изменчивости вируса гриппа типа В Викторианской эволюционной линии ранних лет выделения была разработана панель из пяти МКА к вирусам гриппа, в том числе два – к вирусу В/Шандонг/07/97 (5B7 и В/4Н1) и три – к штамму В/Малайзия/2506/04 (9С1, 9F1 и 11F8). Все полученные МКА 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 вирусами гриппа А субтипов А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) (приложение 5, рис. 50-54), а также потенциально пандемическими вирусами А(Н2N2), А(Н5N1), А(Н7N9) и А(Н9N2).

Все полученные МКА реагировали в РТГА с Викторианскими штаммами при полном отсутствии взаимодействия с вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ и штаммами ранних (1954-1983гг.) лет выделения (табл. 11).

Таблица 11 - Спектр реагирования в РТГА моноклональных антител, полученных к вирусам гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской линии

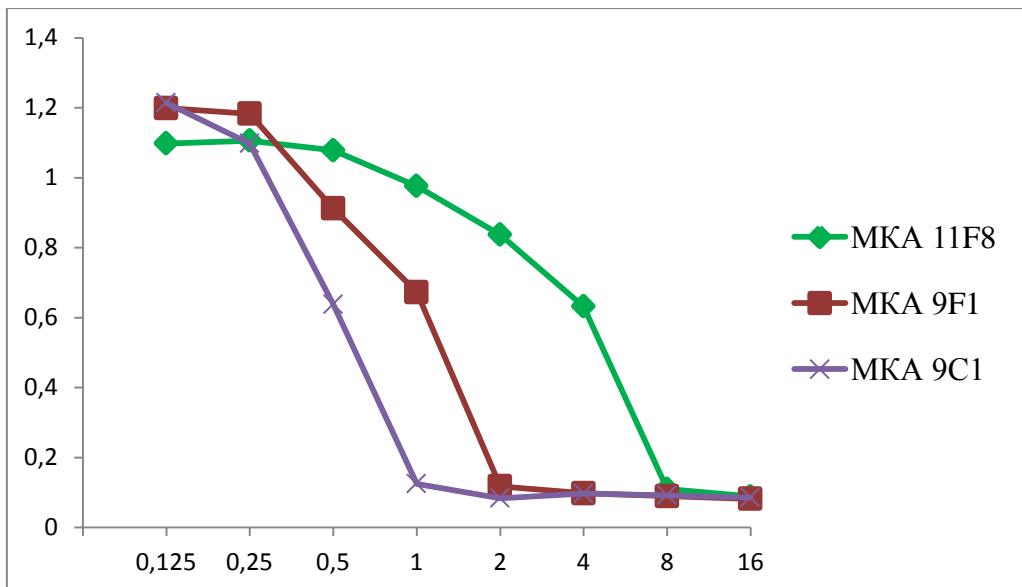
Эволюционная линия	Штамм	Титр ⁻¹ МКА				
		5В7	В/4Н1	9F1	11F8	9С1
До разделения на линии	В/Ли/40	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Грэйт Лэйк/54	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Сингапур/222/79	<20	<20	<20	<20	<20
	В/СССР/100/83	<20	<20	<20	<20	<20
Ямагатская линия	В/Ямагата/16/88	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Панама/45/90	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Пекин/184/93	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Харбин/07/04	<20	<20	<20	<20	<20
	В/С-Петербург/210/95	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Липецк/3/97	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Н.Новгород/348/97	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Яманаша/166/98	<20	<20	<20	<20	<20
	В/Флорида/07/04	<20	<20	<20	<20	<20
	В/ Флорида /04/06	<20	<20	<20	<20	<20
Викторианская линия	В/Шандонг/07/97	640	20480	20480	320	20480
	В/Малайзия/2506/04	640	20480	20480	640	20480
	В/Брисбэн/60/08	320	20480	20480	640	20480
	В/Краснодар/7/11	<20	20480	20480	320	5120
	В/ Краснодар /12/11	<20	20480	20480	2560	10240
	В/ С-Петербург /130/11	320	1280	20480	1280	20480
	В/ С-Петербург /132/11	1280	20480	20480	2560	10240
	В/ С-Петербург /144/11	<20	5120	20480	640	10240
	В/ С-Петербург /177/11	<20	20480	20480	640	20480
	В/Екатеринбург/7/11	<20	20480	20480	2560	10240
	В/ Екатеринбург /9/11	40	10240	20480	1280	10240
	В/ Екатеринбург /10/11	1280	20480	20480	2560	20480
В/Омск/2/11	<20	2560	20480	<20	20480	

Все МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью (рис. 55 и 56), что обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса.

ОП₄₅₀

Концентрация МКА (мкг/мл)

Рисунок 55 - Вируснейтрализующая активность МКА B/4H1 и 5B7 при взаимодействии с вирусом гриппа B/Шандонг/07/97.

ОП₄₅₀

Концентрация МКА (мкг/мл)

Рисунок 56 - Вируснейтрализующая активность МКА 9C1, 9F1 и 11F8 при взаимодействии с вирусом гриппа B/Малайзия/2506/04

Определение направленности МКА к вирусам гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 было проведено с использованием иммуноблоттинга. Проведение иммуноблоттинга после электрофореза в нередуцирующих условиях показало, что все МКА взаимодействовали с двумя олигомерными (2хНА и 3хНА) формами НА и с неразделенным на субъединицы НА (НА0). В восстановленных условиях МКА 5В7 и 11F8 взаимодействовали с тяжелой субъединицей НА1 и неразделенным НА0. МКА В/4Н1, 9С1 и 9F1 практически не определялись в данных условиях. Таким образом, согласно данным western-блота, установлено, что все МКА направлены к молекуле НА, при этом, МКА 5В7 и 11F8 специфичны как в отношении конформационной структуры гемагглютинаина, так и в отношении первичной последовательности гемагглютинаина вируса гриппа, тогда как МКА В/4Н1, 9С1 и 9F1 специфичны преимущественно в отношении конформационной структуры гемагглютинаина.

3.3.7. Определение изотипов IgG МКА к вирусам гриппа гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской эволюционной линии.

Определение изотипов IgG показало, что МКА В/4Н1 и 5В7, полученные к вирусу гриппа В/Шандонг/07/97 имели изотип IgG2а, а МКА 9С1, 9F1 и 11F8 к вирусу В/Малайзия/2506/04 – изотип IgG1.

3.3.8. Заключение

В результате проведенной работы получены новые гибридомы-продуценты МКА к вирусу гриппа В/Брисбен/46/15 (16 клонов) Викторианской эволюционной линии. Установлено, что все МКА специфичны только в отношении вирусов гриппа В Викторианской ветви, в том числе, Викторианской штаммов ранних лет выделения и современных изолятов. Установлено, что МКА 6А4, 6Е11, 9В5, 9G5, 10В6 и 10D9 взаимодействуют с рядом штаммов ранних лет выделения до разделения на две эволюционные линии.

Дополнительно в исследование были включены пять ранее полученных МКА к вирусам гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской ветви. Показано, что разработанные МКА обладают выраженной антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью и направлены к большой субъединице (НА1) молекулы гемагглютинина.

3.4. Антигенное картирование гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской линии с использованием моноклональных антител.

3.4.1. Клонирование эскейп-мутантов вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием моноклональных антител.

С учетом того, что все разработанные МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, это обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса. В результате была получена панель из 30 ЭМ вируса В/Брисбен/46/15, резистентных к вируснейтрализующему действию каждого из МКА, в частности, по одному ЭМ для МКА 6А4, 7Н8, 10F1 и 11G10, по два ЭМ для МКА 6E11, 7C8, 7D9, 8A8, 9B5, 9G5, 10B6, 10D3, 10D9 и 11G2, по три ЭМ для МКА 6A9 и 7G9.

3.4.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса гриппа В/Брисбен/46/15.

В результате анализа НА ЭМ вируса гриппа В/Брисбен/46/15 в сравнении со штаммом дикого типа были выявлены аминокислотные замены в двенадцати положениях и у двух ЭМ вставки в положениях 168 и 169 (таблица 12). 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.

Таблица 12 – Аминокислотные замены в секвенированных последовательностях гемагглютинаина эскейп-мутантов вирусов В относительно референсного штамма В/Брисбен/46/15

Название ЭМ	Позиция		Замена	Примечания
	с учетом сигнального пептида	без учета сигнального пептида		
EM 9B5/1	183	168	T→P	
EM 9B5/2	183	168	T→P	
EM 10B6/1	215	200	Q→R	
EM 10B6/2	215	200	Q→R	
EM 10D3/1	183	168	T→P	
EM 10D3/2	183	168	T→P	
EM 11G2/1	156	141	G→R	
EM 11G2/2	213	198	E→K	
EM 11G10	214	199	T→I	
EM 7H8	221	206	G→R	
EM 8A8/1	136	121	T→I	
EM 8A8/2	136	121	T→I	
EM 9G5/1	183	168	N	Вставка
	184	169	K	Вставка
EM 9G5/2	221	206	G→R	
EM 10F1	197	182	T→K	
EM 7D9/1	90	75	K→E	
EM 7D9/2	90	75	K→E	
EM 6E11/1	183	168	T→P	
EM 6E11/2	183	168	T→P	
EM 6A4	183	168	N	Вставка
	184	169	K	Вставка
EM 6A9/1	136	121	T→I	
EM 6A9/2	197	182	T→K	
EM 6A9/3	197	182	T→K	
EM 7G9/1	137	122	H→N	
EM 7G9/2	137	122	H→N	
EM 7G9/3	137	122	H→N	
EM 10D9/1	156	141	G→R	
	256	241	P→T	
EM 10D9/2	156	141	G→R	
	256	241	P→T	
EM 7C8/1	89	74	G→E	
EM 7C8/2	90	75	K→E	

Известно, что РСС находится в верхней части молекулы НА и сформирован спиралью–190 (НА1 193-202) на вершине, петлей–240 (НА1 237-242) – левая кромка, и петлей–140 (НА1 136-143) – правый край. При этом четыре аминокислотные остатка цепи НА1 (Phe-95, Trp-158, His-191, и Tyr-202), составляющие основу РСС, высококонсервативны у большинства вирусов гриппа В [Wang Q. et al., 2007]. 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).

3.4.2.1. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 7С8 и 7D9.

Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных эпитопов в молекуле НА1 построена на основе идентификации эпитопов в составе ЭМ и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы НА 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. 57 – 61 и 63 – 67: петля–120 обозначена оранжевым, петля–140 – желтым, петля–160 – красным, петля–240 – зеленым, спираль–190 – голубым, А – вид сбоку, Б – вид сверху; НА нумерация В/Брисбен/46/15.

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 (рис. 57).

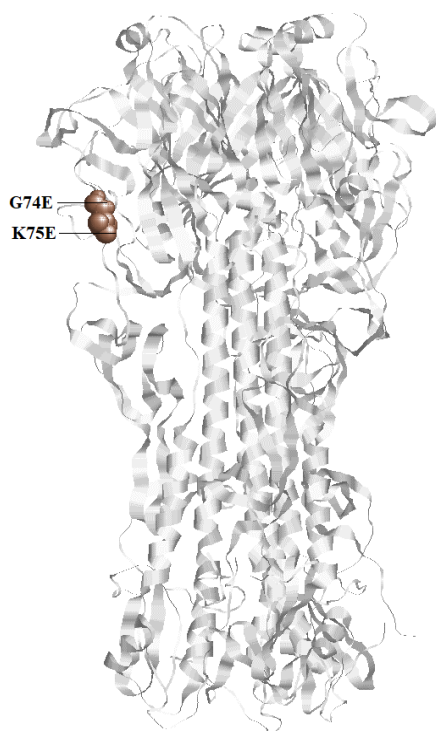


Рис. 57. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 7D9/1, 7D9/2 и 7C8/2 (K75→E) и ЭМ 7C8/1 (G74→E) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Аминокислотный остаток в положении 75 расположен в области, прилегающей к петле-120 [Wang Q. et al., 2008], и вовлечен в антигенный сайт BE [Stray S., Pittman L., 2012]. АК 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 [Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza the Francis Crick Institute. 2017. - https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/crick_sh2017_vcm_report_to_post.pdf].

3.4.2.2. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 8A8, 6A9 и 10F1 .

Анализ ЭМ 8A8/1, 8A8/2 и 6A9/1, показал, что эти варианты ЭМ имели единичную аминокислотную замену треонина на изолейцин в положении 121

(T121→I) (рис 18). Этот аминокислотный остаток расположен петле-120. ЭМ 6A9/2 и 6A9/3 также имели единичную замену T182→K (рис. 58). ЭМ 10F1 также имел единичную замену T182→K. Ранее показано, что АК остатки в положениях 121 и 182 входят в антигенный сайт BD [Stray S., Pittman L., 2012].

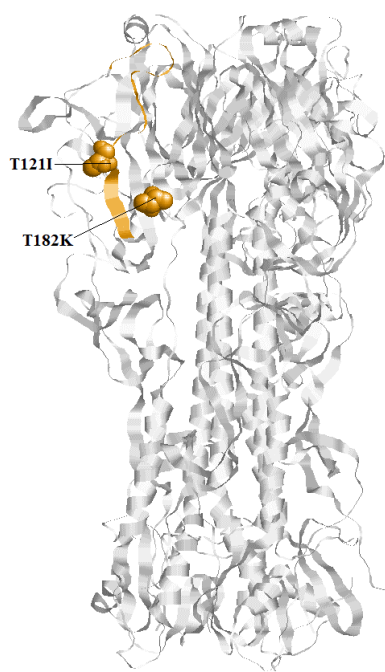


Рис. 58. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 8A8/1, 8A8/2 и 6A9/1 (T121→I) и ЭМ 6A9/2, 6A9/3 и EM 10F1 (T182→K) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Показано, что некоторые отечественные изоляты вируса гриппа В Викторианской ЭЛ, как, например, штамм В/Санкт-Петербург/289/17, имели аминокислотную замену в 121 положении – T121→N [Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza the Francis Crick Institute. 2017.-https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/crick_sh2017_vcm_report_to_post.pdf].

3.4.2.3. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 7G9.

Установлено, что ЭМ 7G9/1, 7G9/2 и 7G9/3, полученные с использованием МКА 7G9, имели единичную АК замену H122→N (рис. 59). АК остаток в положении 122 расположен в петле-120 и входит в антигенный сайт BD [Stray S., Pittman L., 2012].



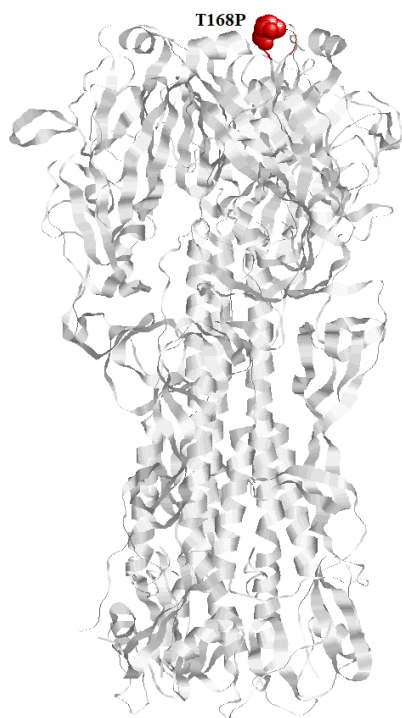
Рис. 59. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 7G9/1, 7G9/2 и 7G9/3 вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Как известно, 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)

3.4.2.4. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютиниона вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 6E11, 9B5 и 10D3.

Анализ ЭМ 6E11/1, 6E11/2, 9B5/1, 9B5/, 10D3/1 и 10D3/2, показал, что эти варианты ЭМ имели единичную аминокислотную замену треонина на пролин в положении 168 (рис 60).

А



Б

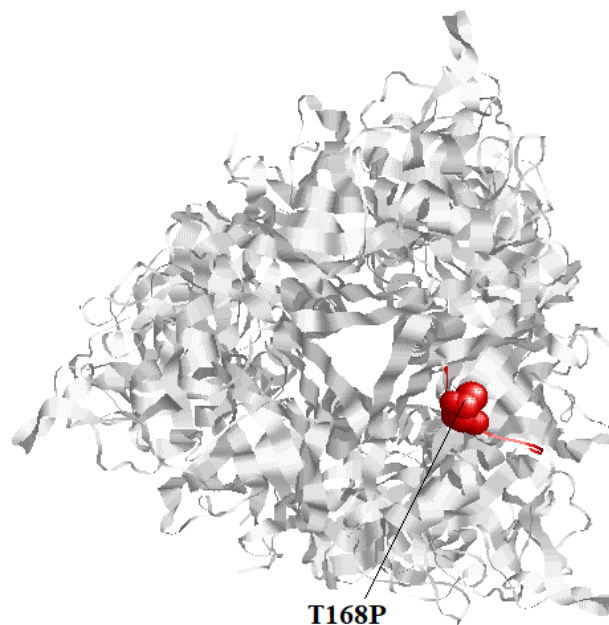


Рис. 60. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 6E11/1, 6E11/2, 9B5/1, 9B5/, 10D3/1 и 10D3/2 вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Петля 160 частично перекрывается с антигенным участком В в Н3 НА [Wiley D. et al., 1981] и сайтом Sa в Н1 НА [Caton A. et al., 1982; Gerhard W. et al., 1981].

3.4.2.5. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютиниона вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 6A4, 9G5 и 7H8.

Установлено, что ЭМ 6A4 и ЭМ 9G5/1 имели вставки N168 и K169 в петле-160, в тоже время ЭМ 9G5/2 нес замену G206→R. ЭМ 7H8, полученный с использованием МКА 7H8 имел единичную замену G206→R (рис. 61). Петля-160 является единственной областью в гемагглютинине вируса гриппа В, где

вставки и делеции неоднократно обнаруживались у изолятов вируса гриппа В Ямагатской эволюционной линии в разные эпидемические сезоны [Nerome R. et al., 1998; McCullers J. et al., 1999].

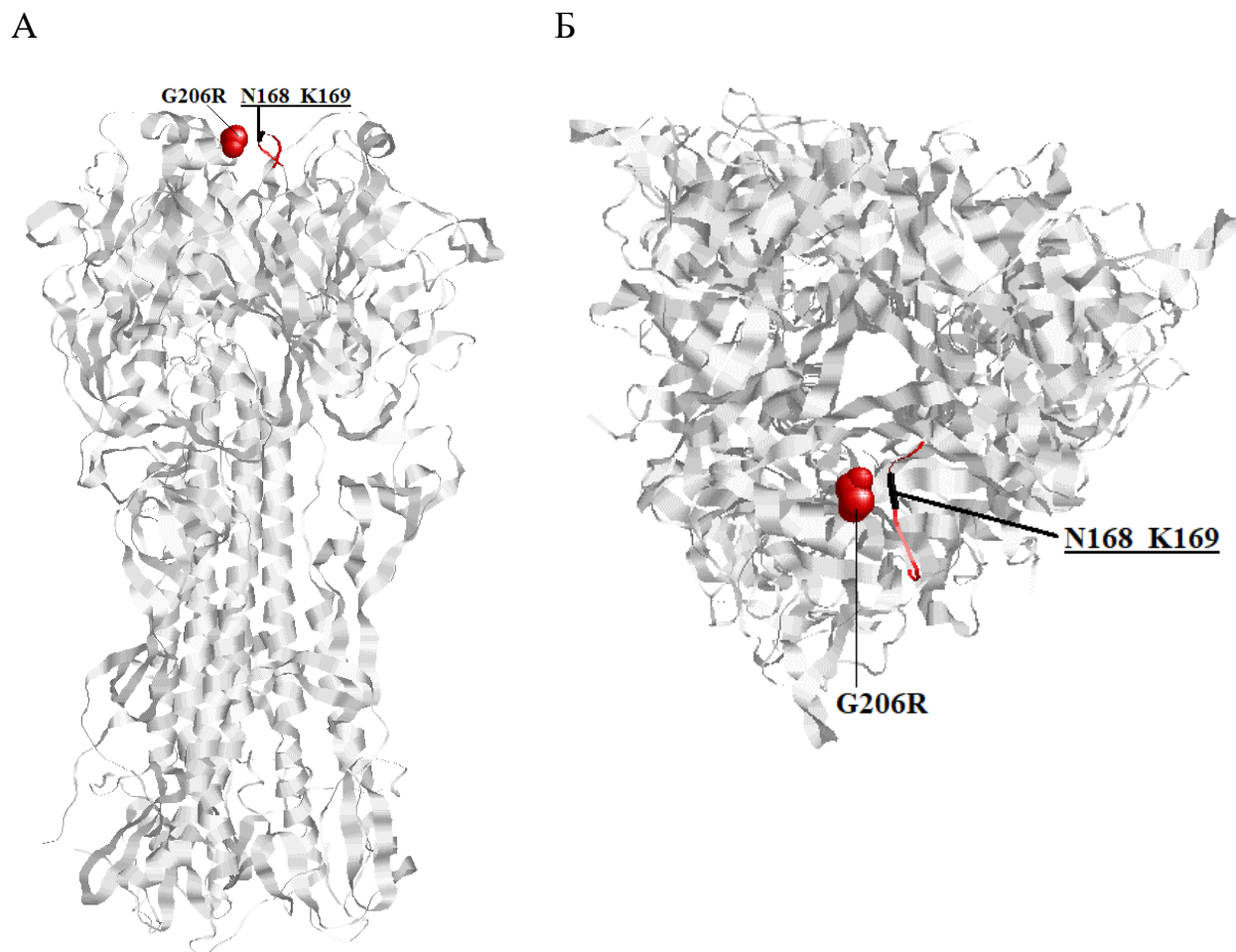


Рис. 61. Локализация аминокислотных инсерций и замен в молекуле HA1 ЭМ 6А4 (вставка N168 и K169), ЭМ 9G5/1(вставка N168 и K169), ЭМ 9G5/2 и ЭМ 7Н8 (G206→R) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

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 ЭМ 6А4 и ЭМ 9G5/1 (рис. 62)

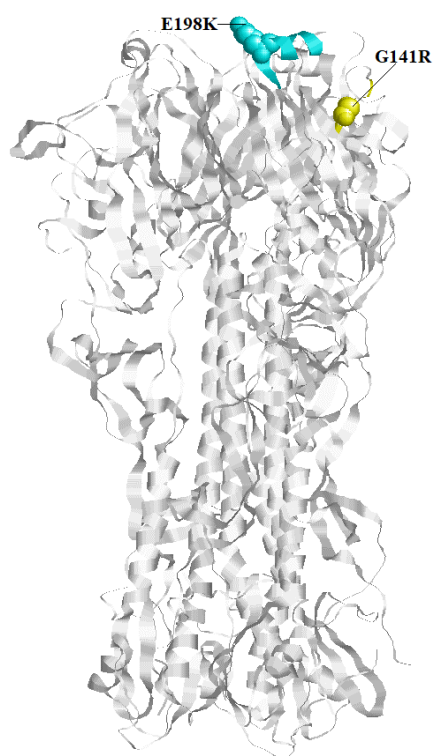
	151	200
B/Brisbane/46/15 wt (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
B/PERTH/58/2012 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 9B5/1 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--P--TATNPLTIEVPICTE
EM 9B5/2 (134)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--P--TATNPLTIEVPICTE
EM 10B6/1 (117)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 10B6/2 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 10D3/1 (125)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--P--TATNPLTIEVPICTE
EM10D3/2 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--P--TATNPLTIEVPICTE
EM 11G2/1 (151)	KIGTSRSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 11G2/2 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 11G10 (125)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7H8 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 8A8/1 (122)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 8A8/2 (122)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 9G5/1 (136)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--NKT--TATNPLTIEVPICTE
EM 9G5/2 (131)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 10F1 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7D9/1 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7D9/2 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 6E11/1 (128)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--P--TATNPLTIEVPICTE
EM 6E11/2 (131)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--P--TATNPLTIEVPICTE
EM 6A4 (127)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--NKT--TATNPLTIEVPICTE
EM 6A9/1 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 6A9/2 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 6A9/3 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7G9/1 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7G9/2 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7G9/3 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 10D9/1 (151)	KIGTSRSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 10D9/2 (151)	KIGTSRSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7C8/1 (151)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE
EM 7C8/2 (113)	KIGTSGSCPNI	TNGNGFFATMAWAVPKNDKNK--TATNPLTIEVPICTE

Рис. 62. 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

3.4.2.6. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 11G2.

Анализ ЭМ 11G2/1 и 11G2/2, полученных с использованием МКА 11G2, 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. 63)

А



Б

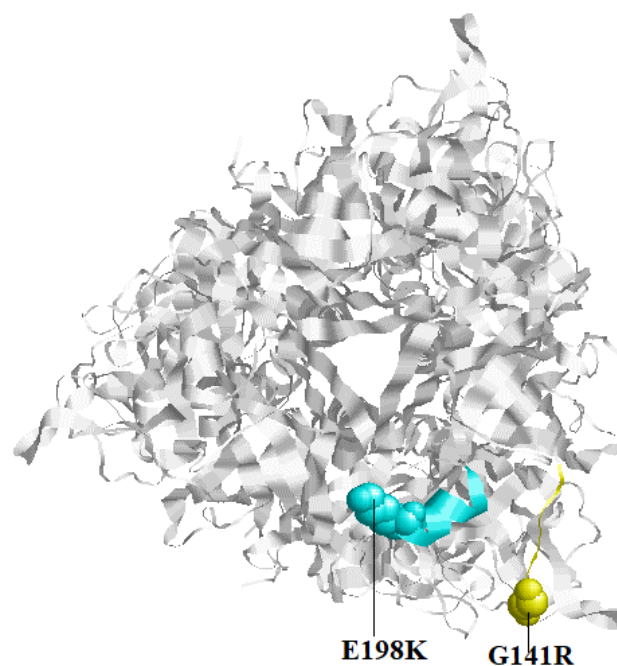


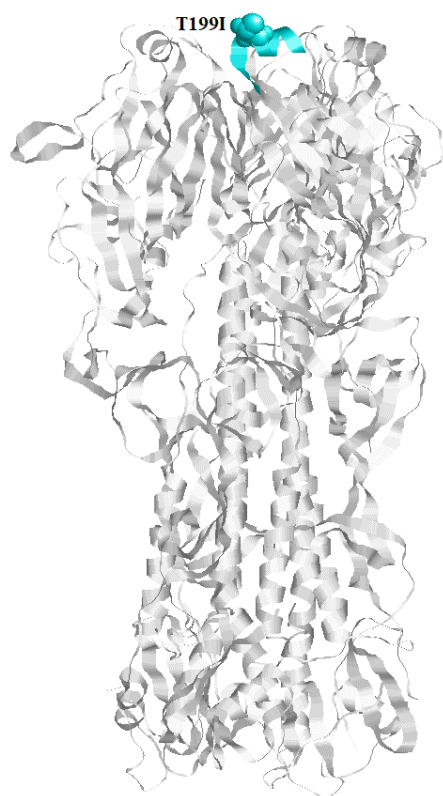
Рис. 63. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 11G2/1 (141G→R) и 11G2/2 (E198→K) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

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. Показано наличие замены E198→K у ряда изолятов [Tramuto F. et al., 2006].

3.4.2.7. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием 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 T199→I (рис. 64)

А



Б

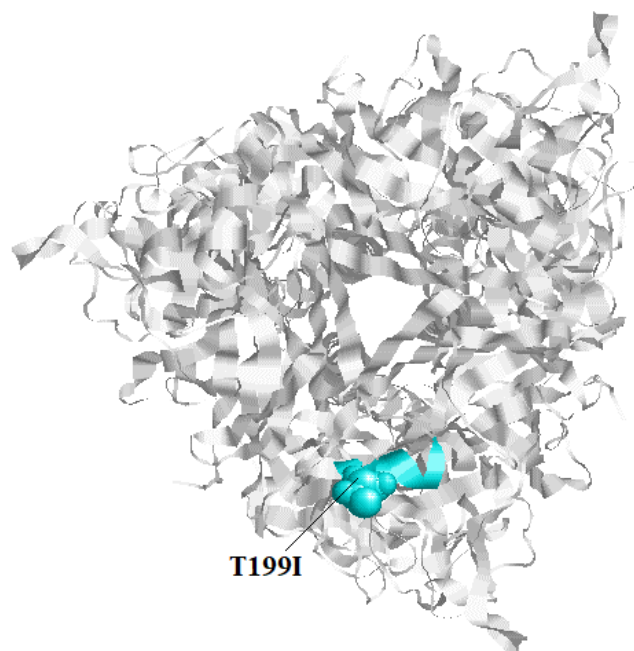


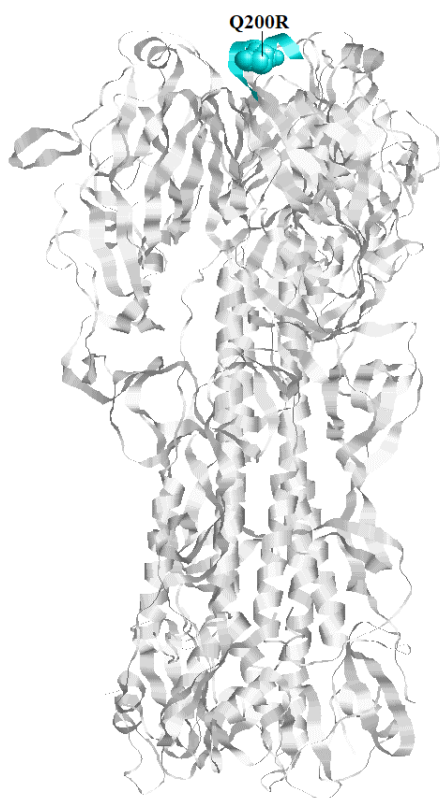
Рис. 64. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 11G10 (T199→I) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Остаток в положении 196 также входит в состав спирали-190, которая формирует верхнюю кромку рецептор-связывающего кармана гемагглютинина вируса гриппа В. У ряда природных изолятов были выявлены сходные аминокислотные замены, в частности, T199→N/I [Oong X. et al., 2015] и T199→A [Piralla A. et al., 2017].

3.4.2.8. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 10В6.

Анализ ЭМ 10В6/1 и 10В6/2, показал, что эти варианты ЭМ имели единичную аминокислотную замену глутамина на аргинин в положении 200 (Q200→R) (рис. 65).

А



Б

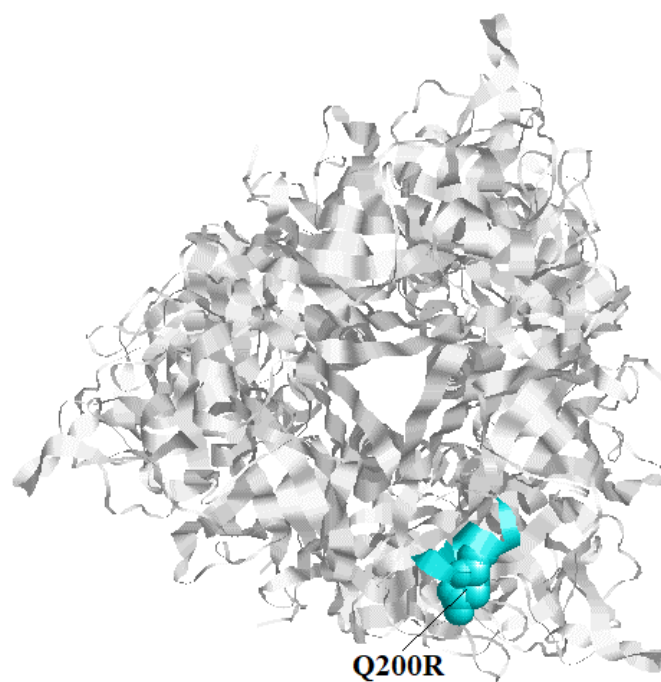


Рис. 65. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 10B6/1 и 10B6/2 (Q200→R) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Остаток в положении 200 также входит в состав спирали-190 гемагглютинаина вируса гриппа В. Положение 200 в HA консервативно, и глицин 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].

3.4.2.9. Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с использованием МКА 10D9.

Обе аминокислотные замены для ЭМ 10D9/1 и 10D9/2 располагаются в рецептор-связывающем кармане гемагглютинаина, но при этом, находятся в

двух различных областях – G141→R в петле-140, тогда как, P241→T в петле-240 (рис. 66).

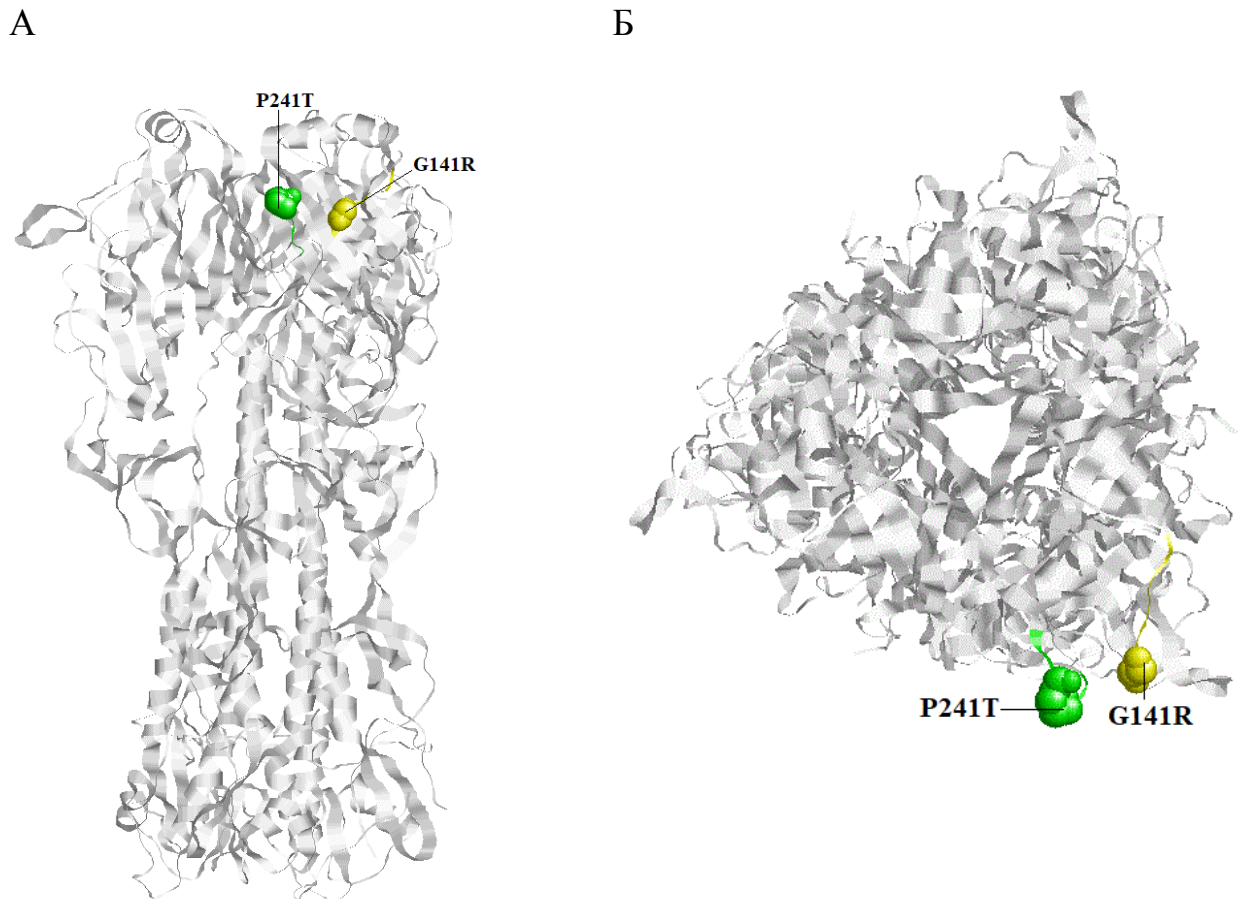
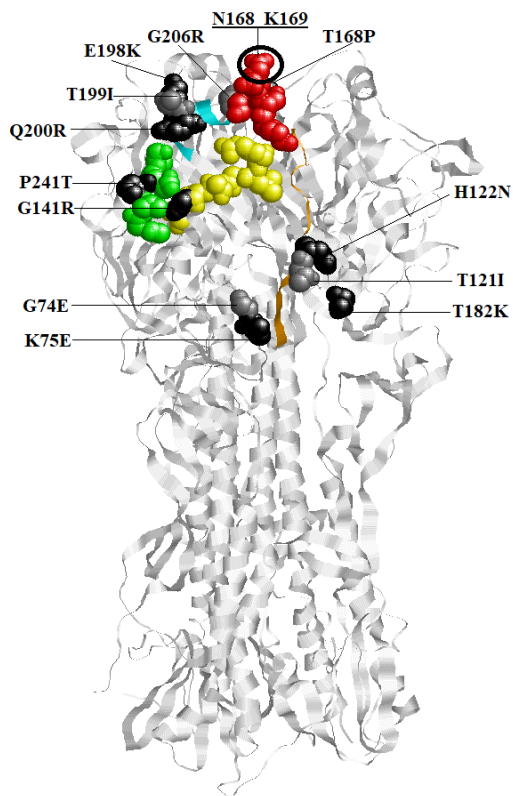


Рис. 66. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 ЭМ 10D9/1 и 10D9/2 (G141→R и P241→T) вируса гриппа В/Брисбен/46/15

Остаток HA1 241, по-видимому является частью антигенного сайта гемагглютинаина вируса гриппа В, который частично перекрываются с сайтом D в H3 HA [Wiley D. et al., 1981] и сайтом Ca1 в H1 HA [Caton A. et al., 1982; Gerhard W. et al., 1981].

Расположение всех аминокислотных остатков, выявленных в данном исследовании, представлено на рис 67.

А



Б

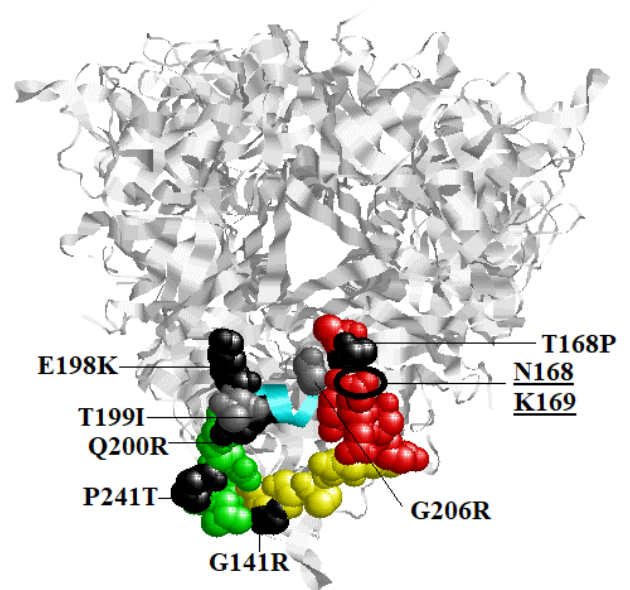


Рис. 67. Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов вируса гриппа В/Брисбен/46/15

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.

3.4.2.10. Влияние аминокислотных замен в составе молекулы гемагглютинина ЭМ вирусов гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской линии на характер взаимодействия с МКА

Для определения влияния аминокислотных замен в молекуле HA на характер реагирования вируса со специфическими антителами, было изучено взаимодействие полученных ЭМ с МКА в перекрестной РТГА (таблица 13).

Таблица 13 – Взаимодействие в РТГА эскейп-мутантов вируса гриппа В/Брисбен/46/15 с моноклональными антителами

Вирусы	АК замены	Титр ⁻¹ МКА в РТГА															
		6A4	6A9	6E11	7C8	7D9	7G9	7H8	8A8	9B5	9G5	10B6	10D3	10D9	10F1	11G2	11G10
В/Брисбен/46/15		81920	80	81920	320	160	160	163840	80	163840	163840	81920	163840	81920	160	163840	2560
ЭМ 6A4	168N 169K	< 160	<20	<160	320	80	160	640	<20	<160	<160	81920	<160	81920	80	10240	2560
ЭМ 6A9/1	T121I	81920	< 20	40960	320	160	320	40960	<20	163840	81920	40960	163840	40960	80	81920	1280
ЭМ 6A9/2	T182K	81920	< 20	40960	320	160	320	40960	<20	163840	81920	81920	163840	40960	<20	163840	1280
ЭМ 6A9/3		81920	< 20	40960	320	160	160	40960	<20	81920	81920	40960	163840	40960	<20	81920	1280
ЭМ 6E11/1	T168P	160	80	< 160	160	80	160	20480	40	<160	5120	163840	<160	40960	80	163840	2560
ЭМ 6E11/2		160	80	< 160	320	40	320	20480	40	<160	5120	81920	<160	40960	80	163840	2560
ЭМ 7C8/1	G74E	81920	80	81920	< 20	160	320	81920	80	327680	163840	163840	327680	40960	80	163840	1280
ЭМ 7C8/2	K75E	163840	80	163840	80	<20	320	81920	80	163840	163840	163840	163840	81920	320	163840	1280
ЭМ 7D9/1	K75E	81920	40	81920	160	< 20	320	81920	40	163840	81920	81920	163840	40960	80	163840	1280
ЭМ 7D9/2		81920	40	81920	320	< 20	320	81920	40	163840	81920	81920	163840	40960	160	163840	1280
ЭМ 7G9/1		81920	80	81920	640	320	40	163840	80	327680	327680	81920	327680	81920	160	327680	5120
ЭМ 7G9/2	H122N	81920	40	81920	640	160	20	327680	80	327680	163840	81920	163840	81920	160	327680	5120
ЭМ 7G9/3		81920	80	81920	640	160	40	163840	80	327680	327680	81920	327680	81920	160	327680	5120
ЭМ 7H8	G206R	40960	80	81920	640	320	320	< 160	160	1280	<160	163840	81920	163840	320	327680	5120
ЭМ 8A8/1	T121I	163840	40	81920	320	80	320	81920	< 20	163840	163840	81920	327680	40960	80	163840	1280
ЭМ 8A8/2		81920	40	81920	320	160	320	81920	< 20	163840	163840	81920	163840	40960	80	163840	1280
ЭМ 9B5/1	T168P	<160	80	<160	640	160	320	20480	80	160	5120	163840	<160	81920	80	163840	5120
ЭМ 9B5/2		<160	80	<160	640	160	320	40960	80	160	5120	163840	<160	81920	160	163840	5120
ЭМ 9G5/1	168N 169K	<160	<20	<160	320	80	320	160	<20	<160	< 160	81920	<160	81920	160	5120	1280
ЭМ 9G5/2	G206R	1280	<20	40960	640	160	320	<160	80	<160	< 160	163840	20480	81920	160	163840	10240
10B6/1	Q200R	163840	<20	163840	640	160	320	327680	20	163840	327680	640	327680	2560	160	<160	640
10B6/1		163840	<20	163840	640	160	320	327680	20	163840	327680	640	327680	2560	160	<160	640
ЭМ 10D3/1	T168P	<160	40	<160	160	80	160	20480	40	<160	2560	163840	< 160	81920	80	81920	5120
ЭМ 10D3/2		<160	40	<160	160	80	160	20480	40	<160	2560	163840	< 160	81920	80	81920	5120
ЭМ 10D9/1	G141R	81920	40	81920	160	80	160	163840	20	81920	163840	81920	163840	640	80	<160	1280
ЭМ 10D9/2	P241T	81920	40	81920	160	160	160	163840	20	81920	163840	81920	163840	640	80	<160	1280
ЭМ 10F1	T182K	163840	<20	81920	320	80	320	81920	<20	163840	163840	81920	327680	40960	< 20	163840	1280
ЭМ 11G2/1	G141R	81920	<20	81920	160	80	160	81920	<20	81920	40960	81920	163840	10240	80	< 160	2560
ЭМ 11G2/2	E198K	81920	<20	81920	160	80	160	40960	<20	163840	81920	81920	163840	40960	80	< 160	<20
ЭМ 11G10	T199I	163840	80	163840	640	160	320	81920	80	163840	163840	163840	327680	163840	320	40960	< 20

Как видно из таблицы, все полученные ЭМ имели низкую способность к взаимодействию с гомологичными МКА, использованными для селекции.

МКА 6А4 не взаимодействовали с ЭМ, имеющими замену Т168Р, инсерции 168N и 169К, а также показали низкий уровень связывания (1/64) с ЭМ 9G5/2 (замена G206R).

МКА 6А9 утратили способность к взаимодействию с ЭМ 10F1 (замена Т182К) и с ЭМ, имеющими инсерции 168N и 169К. Не вполне понятно, почему МКА 6А9 не взаимодействуют с ЭМ с заменами E198K, Q200R и G206R (спираль 190) и G141R (петля 140). При этом, МКА 6А9 реагируют на 1/2 гомологичного титра с ЭМ 10D9/1 и ЭМ 10D9/2, имеющими две АК замены в положениях G141R (петля 140) и P241T (петля 240).

МКА 6E11, 9B5 и 10D3 (специфичны к области 168) не выявляли ЭМ 6А4 и ЭМ 9G5/1 с инсерциями 168N и 169К. Кроме того, МКА 9B5 показали существенное снижение титров при взаимодействии с ЭМ 7H8 и 9G5/2, имеющими замену G206R. При этом МКА 6E11 и 10D3 взаимодействовали с ЭМ 7H8 и 9G5/2 до 1-1/8 гомологичного титра. Т.о., можно предполагать, что МКА 6E11, 9B5 и 10D3 имеют несколько различную специфичность связывания с НА.

МКА 7С8 распознавали аминокислотные остатки в положениях G74E и K75E. Данные МКА взаимодействовали до полного титра со всеми ЭМ, кроме гомологичных. При этом, МКА 7С8 взаимодействовал до полного титра с ЭМ 7D9/1 и ЭМ 7D9/2 (замена K75E). МКА 7D9 не реагировали с гомологичными эскейп-мутантами и ЭМ 7С8/1 (замена K75E), при этом отмечено взаимодействие МКА 7D9 с ЭМ 7С8/1 (замена G74E) до полного титра. Вероятно, МКА 7С8 более специфичны к участку с аминокислотным остатком в положении 74. При этом, для МКА 7D9 критически важным для связывания с НА является положение 75.

МКА 7G9 были специфичны и распознавали только замену в петле 120 в положении 122.

МКА 7Н8 не взаимодействовали с ЭМ 7Н8 и ЭМ 9G5/2 (замена G206R), очень слабо взаимодействовали с эскейп-мутантами 6А4 и 9G5/1, имеющими вставки в положениях 168 и 169 и показали снижение титра до 1/8 с ЭМ 6E11, 9B5 и 10D3, несущими замену T168P.

Характер взаимодействия МКА 8А8, выявляющих область 121, в целом был схож с МКА 6А9. МКА 8А8 утратили способность к взаимодействию с гомологичными ЭМ, ЭМ 6А9/1 (замена T121I), ЭМ 6А9/1, 6А9/2 и ЭМ 10F1 (замена T182K). Кроме того, МКА 8А8 не реагировали с ЭМ, имеющими инсерции 168N и 169K, а также ЭМ 11G2/1 (замена G141R) и 11G2/2 (замена E198K).

Использование МКА 9G5 для селекции ЭМ, позволило получить два ЭМ 9G5/1 и 9G5/2, со вставкой 168N и 169K (петля 160) и заменой G206R, соответственно. При этом МКА 9G5 перестали реагировать с ЭМ 9G5/2 и 7Н8 (замена G206R) и показали снижение титра на 1/32 – 1/64 с ЭМ 6E11, 9B5 и 10D3, имеющими замену T168P.

МКА 10B6 имели низкий уровень реагирования (до 1/128 от гомологичного титра) только с гомологичными ЭМ 10B6/1 и 10B6/2 (замена Q200R в спирали–190).

МКА 10D9 распознавали аминокислотные остатки в положениях G141R (петля 140) и P241T (петля 240). МКА 10D9 слабо (до 1/32 титра) взаимодействовали с ЭМ 10B6/1 и 10B6/2 (замена Q200R) и до 1/8 титра с ЭМ 11G2/1 (G141R).

МКА 10F1 утратили способность к связыванию только с ЭМ 10F1, ЭМ 6А9/2 и 6А9/3, имеющими замену T182K.

МКА 11G2, распознающие аминокислотные остатки в положениях 141 (петля 140) и 198 (спираль 190) перестали реагировать с ЭМ 10B6/1 и 10B6/2 (замена Q200R в спирали–190) и ЭМ 10D9/1 и 10D9/2 (замены G141R (петля 140) и P241T (петля 240)). Кроме того, МКА 11G2 слабо взаимодействовали с ЭМ 6А4 и ЭМ 9G5/1, имеющими инсерции 168N и 169K.

МКА 11G10 не взаимодействовал с гомологичным ЭМ и ЭМ 11G2/2 (замена E198K). Отмечено снижение титра МКА 11G10 с 10B6/1 и 10B6/2 (замена Q200R).

3.4.3. Идентификация иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютини́на виру́сов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04

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 одинаковые аминокислотные замены, локализованные в сайтах ВD и ВВ1. Так, ЭМ 5B7 вируса гриппа В/Шандонг/07/97 и ЭМ 11F8 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 имели одну и ту же АК в положении 122 (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 - АК 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 - K203T, K203I, K203R и K203N, соответственно. Другой ЭМ - 9F1/1 имел две АК замены: A202E и A317V.

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 АК в положениях 313 и 314 в HA1 природных дрейф-вариантов вируса, которые находятся в непосредственной близости от идентифицированной нами АК (A317V) в составе ЭМ 9F1/1. Тем не менее, наиболее вероятно предположение, что АК (A317V) в составе ЭМ 9F1/1 является результатом коселекции при клонировании штамма дикого типа.

Пространственная трехмерная модель локализации иммунодоминантных сайтов в молекуле HA1 была построена на основании идентификации изменчивых эпитопов в составе ЭМ и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы HA1 вируса гриппа В/Brisbane/60/08 [Dreyfus C. et al., 2012], с использованием программы RasMol, версия 2.7.4.2.

Идентифицированы замены АК в HA1 в позиции 122 в ЭМ 5В7 (Н→N) вируса гриппа В/Шандонг/07/97 и ЭМ 11F8 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04, а также в позиции 202 в ЭМ 9F1/1 (А→Е) этого вируса и в позиции 203 у ЭМ В/4Н1/4 (К→Т) и у ЭМ В/4Н1/6 (К→I) вируса гриппа В/Шандонг/07/97. Кроме того, локализованы замены К203R у ЭМ 9С1 и К203N у ЭМ 9F1/2 вируса гриппа В/ Малайзия /2506/04 (рис. 68).

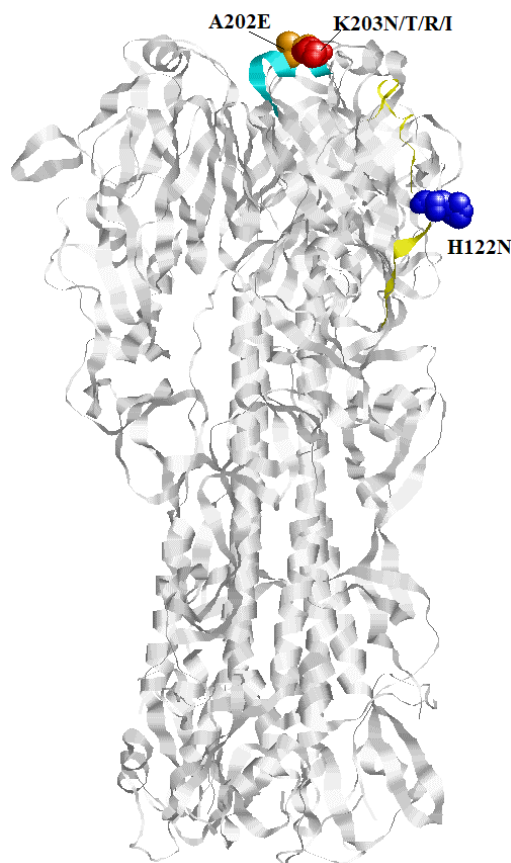


Рисунок 68 - Локализация аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов вирусов В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 Викторианской линии.

3.4.3.1. Влияние аминокислотных замен в составе гемагглютинина ЭМ вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии на характер их взаимодействия с МКА

Для определения влияния аминокислотных замен в молекуле HA1 на характер реагирования со специфическими антителами в перекрестной РТГА

изучено взаимодействие полученных ЭМ с различными типами МКА к вирусам гриппа В Викторианской эволюционной линии. Установлено, что все полученные ЭМ полностью утратили способность к взаимодействию с гомологичными МКА, использованными для селекции.

Два разных ЭМ вируса гриппа В/Шандонг/07/97 (В/4Н1/4 и В/4Н1/6) и мутанты вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 (9F1/1 и 9F1/2) различались по спектру реагирования с МКА.

Так, ЭМ В/4Н1/4, имевший замену К203Т, утратил способность к взаимодействию не только с гомологичными МКА, но и с МКА 9F1 и 9С1, тогда как ЭМ В/4Н1/6 (замена К203I) сохранил остаточную (1/128 титра) способность к связыванию МКА 9F1 при полной утрате способности к реагированию с МКА 9С1.

ЭМ 9F1/1 и 9F1/2 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 в результате замен АК в позициях 202, 317 и 203, соответственно, перестали реагировать с гомологичными МКА, но ЭМ 9F1/2 - одновременно и с МКА В/4Н1. Это свидетельствует о том, что для ЭМ значимым является не только определенное положение аминокислотного остатка, но и конкретная аминокислотная замена. МКА 9С1 утратили способность к связыванию с двумя ЭМ (В/4Н1/4 и В/4Н1/6), имевшими замену в 203 положении. Такого рода отличия были получены и при исследовании двух ЭМ к МКА 9F1. В частности, если ЭМ 9F1/1 с заменами АК (А202Е, А317V) стал резистентным только к гомологичным МКА, ЭМ 9F1/2 с заменой (К203N) приобрел удивительную способность ускользать сразу от трех МКА (В/4Н1, 9F1 и 9С1). ЭМ 9С1 утратил способность взаимодействовать с МКА 9С1 и В/4Н1, а также показал значительное снижение титра с МКА 9F1. ЭМ 5В7 вируса гриппа В/Шандонг/07/97 практически полностью перестал реагировать с МКА 11F8, а ЭМ 11F8 - с МКА 5В7, что могло бы быть объяснено АК заменой в одном и том же положении (Н122N) в составе этих ЭМ (табл. 14).

Таблица 14 - Взаимодействие в РТГА эскейп-мутантов вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии с гомологичными и гетерологичными моноклональными антителами

Штаммы	Титр ⁻¹ МКА в РТГА					АК замены	Локализация (сайт)
	5B7	В/4Н1	9F1	11F8	9С1		
В/Шандонг/07/97	640	20480	20480	320	20480	-	-
В/Малайзия/2506/04	640	20480	20480	640	20480	-	-
ЭМ 5B7	<20	20480	20480	<20	20480	H122N	Петля – 120, BD
ЭМ В/4Н1/4	640	<20	<20	160	<20	K203T	Спираль – 190, BB1
ЭМ В/4Н1/6	640	<20	160	160	<20	K203I	Спираль – 190, BB1
ЭМ 9F1/1	320	20480	<20	160	20480	A202E A317V	Спираль – 190, BB1
ЭМ 9F1/2	320	<20	<20	160	<20	K203N	Спираль – 190, BB1
ЭМ 11F8	20	20480	20480	<20	20480	H122N	Спираль – 120, BD
ЭМ 9С1	640	<20	160	160	<20	K203R	Спираль – 190, BB1

Примечание: выделены гомологичные пары ЭМ+МКА

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 подобные штаммы в меньшей мере подвержены селективному иммунопрессингу, в связи с чем имеют большие перспективы длительной циркуляции в человеческой популяции.

Основываясь на данных секвенирования последовательностей НА вирусов гриппа В, ранее было установлено, что АК N163, E198, A202 и K203 являются высоко консервативными у вирусов Викторианской ветви и, вероятно, могут влиять на связывание с углеводными цепями. Кроме того, АК в положениях 202 и 203 входят в состав рецептор-связывающего кармана и АК замены в этих положениях могут существенно влиять на антигенные и рецепторные свойства вирусной частицы [Wang et al., 2012].

3.4.4. Заключение

Благодаря наличию вируснейтрализующей активности у разработанных МКА была получена панель из 30 эскейп-мутантов эталонного штамма В/Брисбен/46/15, резистентных к МКА. Проведенное секвенирование НА последовательностей ЭМ, полученных в присутствии вируснейтрализующих МКА, и сравнение их с вирусом дикого типа позволило идентифицировать в составе молекулы НА1 вируса гриппа В Викторианской эволюционной линии АК остатки в положениях 74, 75, 121, 122 и 182 (петля–120 и прилегающие области), 141 (петля–140), 168 (петля–160), 198, 199, 200 и 206 (спираль–190 и прилегающие области), 241 (петля–240). Кроме того, впервые у вирусов гриппа В Викторианской линии выявлены инсерции (вставки) в петле–160 в положениях 168 и 169.

Кроме того, клонированы семь эскейп-мутантов к вирусам гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04. Анализ первичной последовательности НА ЭМ В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 позволил идентифицировать эпитопы, ответственные за индукцию вируснейтрализующих антител, в положениях 202 и 203 (спираль-190) и в положении 122 (петля-120).

Показано, что все идентифицированные аминокислотные остатки вовлечены в основные антигенные сайты гемагглютинаина вируса гриппа В и влияют на антигенную специфичность гемагглютинаина в составе эскейп-мутантов. Существенный интерес для науки представляет обнаружение соответствующих изолятов в составе естественно циркулирующих вирусов гриппа В в будущем.

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

Вирус гриппа типа В циркулирует почти исключительно в человеческой популяции и является причиной периодических эпидемий и иногда смертельных заболеваний. Первичным звеном в развитии инфекции является

связывание гликопротеина вируса гриппа – гемагглютини́на (НА) – с экспрессированными на поверхности хозяйской клетки углеводными цепями, которые терминированы остатками нейрамино́вой кислоты. Чаще всего это Neu5Ac, хотя встречаются и другие модификации – все они объединены под общим названием «сиаловые кислоты» (Sialic acid, SA).

Известно, что вирусы гриппа А птиц преимущественно имеют сродство к углеводам с α 2-3 гликозидной связью между SA и соседним остатком галактозы (Gal), тогда как вирусы гриппа А человека взаимодействуют преимущественно с SA α 2-6Gal-цепями [Mochalova et al., 2003; Gambaryan et al., 2006, 2012; Matrosovich et al., 2004]. Рецепторсвязывающая специфичность вирусов гриппа А детально изучена и считается одним из факторов патогенности [Viswanathan K. et al., 2010; Heider A. et al., 2015].

Показано, что рецептор-связывающая специфичность НА вируса гриппа А может изменяться под действием специфических аминокислотных замен в глобулярных областях этого белка [Tumpey T. et al, 2007]. Что касается вирусов гриппа В, то данных по рецепторсвязывающей специфичности НА этих вирусов крайне мало [Lugovtsev V. et al., 2009; Matrosovich M. et al., 1997; Mochalova L et al., 2010]. Ранее показано, что три аминокислотные замены в НА вируса гриппа В вызывали изменения рецептор-связывающих свойств в процессе адаптации вируса к куриным эмбрионам [Lugovtsev V. et al., 2009]. В настоящее время установлено, что В/Ямагата – подобные штаммы связываются преимущественно с SA α -2,6 Gal рецепторами, тогда как штаммы Викторианской линии сходно реагируют с обоими типами рецепторов [Wang Y.-F. et al., 2012].

Для изучения влияния АК замен в молекуле НА на эффективность рецепторного взаимодействия, полученные ЭМ были протестированы в трех независимых экспериментах в РГА с эритроцитами различных видов животных – курицы (содержат и SA α 2,3 Gal, и SA α 2,6 Gal рецепторы), морской свинки (содержат преимущественно SA α 2,6 Gal рецепторы) и

лошади, которые содержат только SA α 2,3 Gal рецепторы [Ito T. et al., 1997], табл. 15.

Таблица 15 - Влияние аминокислотных замен в гемагглютинине эскейп – мутантов вируса гриппа В/Флорида/04/06 на рецепторную специфичность.

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

Как видно из таблицы 15 вирус дикого типа В/Флорида/04/06 практически не взаимодействовал с эритроцитами лошади, что позволяет предполагать преимущественное связывание этого штамма с SA α 2,6 Gal рецепторами. Аналогичным образом вели себя и ЭМ 8Н11 и ЭМ 10F4. Однако ЭМ 8Н3 с заменой N202K приобрел способность реагировать с эритроцитами лошади, содержащими только SA α 2,3 Gal рецепторы. Ранее было показано, что большинство аминокислотных остатков, окружающих рецептор-связывающий карман НА вируса гриппа В были идентичны у В/Ямагата – и В/Виктория – подобных штаммов, за исключением АК N163, E198, A202 и K203 (нумерация для вирусов гриппа Викторианской линии). Аминокислотный остаток N163, один из потенциальных сайтов N – гликозилирования у В/Виктория – подобных штаммов, отсутствовал в последовательности НА В/Ямагата – подобных штаммов. Кроме того, отрицательно заряженные E198 и A202 и положительно заряженный K203, расположенные в спирали – 190 у вирусов Викторианской линии, были заменены на положительно заряженные K, K и N у вирусов Ямагатской линии, соответственно. В этой связи предполагается, что эти четыре

аминокислотных остатка потенциально могут играть принципиально важную роль в процессе узнавания SA α 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 вирусов подобных эталонному штамму В/Виктория/2/87, т.е., замена аспарагина на лизин в 202(203) положении действительно играет важную роль для распознавания вирусной частицей SA α 2,3 Gal рецепторов. При этом данная замена не играла существенной роли для связывания с SA α 2,6 Gal рецепторами, так как ЭМ 8НЗ не потерял способности агглютинировать эритроциты морской свинки, рецепторы которых содержат преимущественно именно этот тип связи. Необходимо отметить, что как дикий тип В/Флорида/04/06, так и все ЭМ в положении 163 имели делецию аспарагина, а в положениях 197(198) и 201(202) содержали характерные для штаммов Ямагатской эволюционной линии остатки лизина.

Ранее было показано, что штамм Ямагатской линии В/Виктория/504/00 при адаптации к росту в куриных эмбрионах приобретал замены G141E, R162M и D196Y, что приводило к смене специфичности с SA α 2,6 Gal на оба типа рецепторов [Lugovtsev V. et al., 2009]. Анализ последовательности НА вируса В/Флорида/04/06 и всех ЭМ показал, что в этих положениях никаких изменений не произошло и все клонированные ЭМ имели G141, K162 и D196, также как и дикий тип вируса, использованный для селекции. Кроме того, мы установили, что ни штамм дикого типа В/Флорида/04/06, ни один из полученных ЭМ, не имели замены в положении 95 (фенилаланин), который играет большое значение для структуры рецептор-связывающего кармана и обуславливает более низкий, по сравнению с вирусом гриппа А, аффинитет связывания с рецепторами НА вируса гриппа В [Ni F. et al., 2014].

Еще один ЭМ 9АЗ, как и ЭМ 8НЗ, приобрел способность взаимодействовать с эритроцитами лошади, содержащими SA α 2,3 Gal рецепторы. ЭМ 9АЗ имел аминокислотную замену S242R в составе петли – 240. Петля – 240 и спираль – 190 расположены на мембранно-дистальном

конце молекулы НА, формируют вершину и левую кромку рецептор-связывающего кармана НА вирусов гриппа В, и переориентация боковых цепей в петле 240 может сильно изменять 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 приводит к нарушению этого взаимодействия и изменяет не только антигенные, но и рецепторные свойства этого региона. Тот факт, что ЭМ 9А3 потерял способность взаимодействовать с МКА 8НЗ, также подтверждает предположение о взаимном влиянии аминокислотных остатков, входящих в петлю – 240 и спираль – 190.

Таким образом показано, что аминокислотный остаток в положении 202 НА вируса гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской линии играет принципиально важную роль для рецепторной специфичности вирусной частицы. Наличие лизина в этом положении позволяет вирусу взаимодействовать с SA α 2,3- Gal рецепторами. Аминокислотный остаток в положении 242 также оказывает влияние на рецептор-связывающие свойства НА вируса гриппа типа В.

3.5.2. Влияние единичных аминокислотных замен в гемагглютинине вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии на рецептор-связывающие свойства.

Известно, что «Викторианские» изоляты хорошо связываются с рецепторами обоих типов, тогда как В/Ямагата – подобные штаммы взаимодействуют преимущественно с SA α 2,6 Gal рецепторами. Основываясь на данных секвенирования последовательностей НА вирусов гриппа В, было показано, что АК N163, E198, A202 и K203 являются высоко консервативными у вирусов Викторианской ветви и могут влиять на связывание с углеводными цепями [Wang et al., 2012].

Для изучения влияния АК замен в молекуле НА на рецепторную специфичность полученные ЭМ были протестированы в трех независимых экспериментах в РГА с эритроцитами различных видов животных – кур

(содержат SA α 2,3 Gal и SA α 2,6 Gal рецепторы), морской свинки (содержат преимущественно SA α 2,6 Gal рецепторы) и лошади, содержащие, преимущественно, SA α 2,3 Gal рецепторы [Ito T. et al., 1997].

Как видно из таблицы 16 вирус дикого типа В/Шандонг/07/97 взаимодействовал с эритроцитами всех трех видов животных, что позволяет предполагать наличие связывания данного вируса с обоими типами рецепторов – и SA α 2,3 Gal, и SA α 2,6 Gal. Однако единичные АК замены в молекуле НА у ЭМ В/4Н1(4) (K203T) и ЭМ В/4Н1(6) (K203I), привели к тому, что эти ЭМ перестали связываться с эритроцитами лошади. Аналогичным образом вел себя и ЭМ 9F1(2) вируса В/Малайзия/2506/04, также имеющий замену лизина в положении 203 (K→N), тогда как дикий тип этого вируса взаимодействовал с обоими типами рецепторов.

Таблица 16 - 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 ⁻¹ вирусов и ЭМ в РГА с эритроцитами			АК замены
	кур (α 2,3 и α 2,6 рецепторы)	морской свинки (α 2,6 рецепторы)	лошади (α 2,3 рецепторы)	
В/Шандонг/07/97 (wt)	256	128	128	-
EM 5B7	1024	512	256	H122N
EM В/4Н1(4)	256	512	<2	K203T
EM В/4Н1(6)	256	256	<2	K203I
В/Малайзия/2506/04 (wt)	128	64	16	-
EM 9F1(1)	512	256	<2	A202E, A317V
EM 9F1(2)	512	128	<2	K203N
EM 11F8	256	64	16	H122N

Необходимо отметить, что ЭМ 5B7 и 11F8 вирусов В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 с одинаковой аминокислотной заменой H122N, не

отличались от штаммов дикого типа по характеру взаимодействия в РГА со всеми видами эритроцитов. Исходя из того, что у всех ЭМ В/4Н1(4), ЭМ В/4Н1(6) и ЭМ 9F1(2) лизин в положении 203 был заменен на различные аминокислотные остатки, а именно, треонин, изолейцин и аспарагин, и при этом, все эти ЭМ утратили способность связываться с эритроцитами лошади, можно предполагать, что именно К203 играет важную роль в связывании НА с SA α 2,3 Gal рецепторами.

Еще один ЭМ 9F1(1) утратил способность взаимодействовать с эритроцитами лошади. ЭМ 9F1(1) содержит две аминокислотные замены – А202Е и А317V. Известно, что АК остатки в положениях 202 и 203 входят в спираль 190, расположены в мембранно-дистальном конце молекулы НА и включены в состав рецептор-связывающего кармана вируса гриппа В. Поскольку наиболее вероятно, что АК (А317V) в составе ЭМ 9F1/1 является результатом коселекции при клонировании штамма дикого типа, можно предполагать, что именно аланин в положении 202, как и К203, имеет принципиально важное значение для связывания НА с SA α 2,3 Gal рецепторами.

Таким образом, полученные результаты подтверждают теоретические предположения [Wang et al., 2012] о том, что А202 и К203 в молекуле НА играют важную роль для распознавания вирусной частицей SA α 2,3 Gal рецепторов.

3.5.3. Заключение

Необходимо подчеркнуть, что очень важно осуществлять мониторинг рецептор-связывающих характеристик циркулирующих и вновь появляющихся штаммов вирусов гриппа как А, так и В, так как структура рецепторов вируса определяет его тканевой тропизм, а значит и вирулентный фенотип [Viswanathan K. et al., 2010; Heider A et al., 2015]. Так, уже показано, что пациенты, инфицированные штаммами вируса гриппа В, которые связываются не только с SA α 2-6Gal-звеньями, но и с сиалозидами «птичьего» типа (SA α 2-3Gal), более склонны к развитию бронхопневмонии и чаще

имели симптомы поражения желудочно-кишечного тракта [Wang Y.-F. et al., 2012]. В целом, знание механизмов взаимодействия вирусов гриппа с хозяйской клеткой, которое напрямую связано с рецептор-связывающими свойствами НА, дает ключ к пониманию тенденций в эволюции вируса, обусловленной изменением антигенных характеристик.

Обсуждение

Изучение антигенной структуры гемагглютинаина вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий имеет большое теоретическое и практическое значение. В этой связи была поставлена цель провести эпитопное картирование молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа типа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий с использованием полученных новых моноклональных антител и идентифицировать аминокислотные остатки, значимые для связывания с вируснейтрализующими антителами.

В соответствии с поставленными задачами на первом этапе работы были получены и охарактеризованы панели вируснейтрализующих МКА, специфичных к вирусам Ямагатской и Викторианской эволюционных линий.

Т.к., все разработанные МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью, это обеспечило в дальнейшем возможность получения ЭМ вируса. Была получена панель из 16 ЭМ, резистентных к вируснейтрализующему действию каждого из МКА, в частности для МКА 1G4, 1G9, 2B10, 3B12, 3C2 и 4E11 по два ЭМ, для МКА 5B11 – три ЭМ и для МКА 5F11 – один ЭМ вируса гриппа В/Massachusetts/2/12 и 4 ЭМ 8H3, 8H11, 9A3 и 10F4 вируса В/Флорида/04/06 Ямагатской эволюционной ветви. В результате анализа НА ЭМ вируса гриппа В/Massachusetts/2/12 в сравнении со штаммом дикого типа были выявлены аминокислотные замены в шести положениях, а анализ ЭМ 8H3, 8H11, 9A3 и 10F4, полученных к вирусу В/Флорида/04/06, показал, что эти варианты ЭМ имели одиночные аминокислотные замены в положениях

N202K (спираль 190), 85 (H→Y), S 242 R (петля 240) и 40 (Y→H), соответственно. Оказалось, что большинство замен были расположены в областях, формирующих рецептор-связывающий сайт вируса гриппа В, а именно в петле–140, петле–240 и спирали–190. Известно, что РСС находится в верхней части молекулы НА и сформирован спиралью–190 (НА1 193-202) на вершине, петлей–240 (НА1 237-242) – левая кромка, и петлей–140 (НА1 136-143) – правый край. При этом четыре аминокислотные остатка цепи НА1 (Phe-95, Trp-158, His-191, и Tyr-202), составляющие основу РСС, высококонсервативны у большинства вирусов гриппа В.

В наших исследованиях было обнаружено, что ряд ЭМ, отобранных с помощью МКА 1G4, 2B10 и 3C2, имели идентичную аминокислотную замену глицина на глутаминовую кислоту (G141→E), расположенную в петле–140. В предыдущих работах было показано, что положение 141 в НА гриппа В достаточно вариабельное. Так были получены ЭМ с заменой 141Gly→Val, у вирусов гриппа В еще до расхождения на две филогенетические линии [Webster R. and Berton M., 1981] и 141Gly→Arg вирусов гриппа Ямагатской ветви [Nakagawa N., et al., 2003]. Предполагается, что данный вирус-нейтрализующий эпитоп специфичен для вирусов гриппа В Ямагатской группы [Nakagawa N. et al., 2003]. Кроме того, показано, что некоторые лабораторные варианты вируса гриппа В, такие как, например, выращенные на куриных эмбрионах, проявляли альтернативные антигенные свойства благодаря единичной замене глицина в положении 141 [Lugovtsev V. et al., 2005, 2007]. Было показано, что адаптированный к куриным эмбрионам вирус В/Lyon/1271/96, несущий замену 141Gly→Arg, показал увеличение сродства к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе), в то время как связывание с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамином) было ослаблено. В то же время, МДСК-адаптированный вариант того же вируса с Gly141 отображал улучшенное сродство с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамином) и значительно меньшее сродство к 3'-сиалил(N-ацетиллактозой) [Govorkova E. et al., 1999]. Дополнительно, установлено, что содержащий замену 141Gly→Arg,

высокопродуктивный вариант вируса гриппа В/Victoria/504/2000 потерял способность связывать гликаны с $\alpha 2,6$ гликозидной связью. В сравнении, дикий тип В/Victoria/504/2000 предпочтительно взаимодействовал с гликанами с $\alpha 2,6$ гликозидной связью, но имел низкое сродство к гликанам с $\alpha 2,3$ гликозидной связью [Lugovtsev V. et al., 2009].

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 и замену глицина на аргинин в положении 237 (237G→R). ЭМ 1G9/2 имел единичную замену 237G→R. Примечательно, что обе аминокислотные замены располагаются в рецептор-связывающем кармане гемагглютиниона, но при этом, находятся в двух различных областях – 141G→E в петле-140, тогда как, 237G→R в петле-240. Показано, что присутствие G237 делает петлю-240 более протяженной, и единичная замена в этом положении меняет переориентацию боковых цепей. При этом, изменение ориентации боковых цепей в HA1 235-240 может кардинально изменять антигенные свойства этого региона [Ni F., et al., 2013]. Т.к., топографически G237 и G141 находятся вблизи, вероятно, замена 237G→R изменяет пространственную структуру таким образом, что это позволяет распознавать МКА 1G9 эпитоп в положении 141, что приводит к отбору, как видно на примере ЭМ 1G9/1, имеющего две замены - 237G→R и 141G→E.

Анализ ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 вируса В/Massachusetts/2/12 и ЭМ 8H3 В/Флорида/04/06, показал, что эти варианты ЭМ имели единичную аминокислотную замену аспарагина на лизин в положении 202 (202N→K). Ранее показано, что большинство аминокислотных остатков, окружающих рецептор-связывающий карман HA вируса гриппа В, идентичны у штаммов Ямагатской и Викторианской эволюционных линий, за исключением нескольких позиций: 163, 198, 202 и 203 (нумерация для вирусов гриппа Викторианской линии); при этом потенциальный сайт N-гликозилирования при Asn163 отсутствует в HA вирусов Ямагатской разновидности [Carbone V. et al., 2013]. Кроме того, отрицательно заряженный Glu198, нейтральный

Ala202 и положительно заряженный остаток Lys203 у вирусов Викторианской линии, расположенные в спирали 190, заменены соответственно на остатки Lys197, Lys201 и Asn202 у вирусов Ямагатской линии. Предполагается, что эти четыре аминокислотных остатка могут играть важную роль в специфичности узнавания сиалирированных цепей [Wang Y.F. et al., 2012]. Действительно, было показано, что замена Asn на Lys в позиции 202 повлияла на рецептор-связывающие свойства НА вируса гриппа В/Florida/04/06 Ямагатской линии, по-видимому, расширив репертуар рецепторов. Т.о., замена аспарагина в положении 202 может влиять как на антигенные, так и рецепторные свойства молекулы гемагглютинина.

Установлено, что ЭМ 3В12/1 вируса В/Massachusetts/2/12 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. Ранее замена 240Pro→Ser была обнаружена у эскейп-мутантов В/Виктория подобных штаммов [Nakagawa N. et al., 2001]. ЭМ 8НЗ вируса В/Флорида/04/ также имел аминокислотную замену в петле 240 в положении S242R. Переориентация боковых цепей в петле 240 может сильно изменять антигенные свойства этого региона [Ni F. et al., 2013]. Аналогичный феномен описан в литературе [Nakagawa N. et al., 2001]. Из 8 вариантов эскейп-мутантов (V1–V8) вируса В/Осака/983/97 викторианской линии, которые были отобраны с МКА 10В8, два, V3 и V8 (замена 203Lys→Thr в НА), потеряли способность взаимодействовать с гетерологичным МКА 8Е6. В то же время эскейп-мутанты M1 и M2 (замена 241Pro→Ser в НА), селектированные с МКА 8Е6, взаимодействовали с гетерологичным МКА 10В8. Авторы предположили, что аминокислотный остаток в позиции 203 входит в состав или находится вблизи эпитопа для моАТ 8Е6. Установлено, что остатки Pro-240 и Ser-242, находятся в эквивалентных положениях к остаткам 226 и 228 в НЗ НА, соответственно. Оба остатка 226 и 228 НЗ НА вовлечены в качестве основных детерминант рецепторной специфичности [Wiley D. and Skehel J., 1987; Skehel J. & Wiley D., 2000].

ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 имели две одинаковые замены в положениях 136 (136R→I) и 240P→S, то время как ЭМ 5B11/3 имел аналогичную замену 136R→I и вторую аминокислотную замену 141G→E, а ЭМ 5F11 имел две аминокислотные замены в положениях 136R→I и 196D→G. Ранее было показано, что левый край рецептор-связывающих сайта НА В/Hong Kong/8/73 содержит остатки Pro-238 и Ser-240, которые находятся в эквивалентных позициях остаткам 226 и 228 в НЗ НА, соответственно. Хотя боковая цепочка Pro-238 короче, чем у Leu-226 в НЗ НА, главные цепочки петли 240 в НА В/Hong Kong/8/73 сдвинуты в сторону петли-140 таким образом, чтобы боковые цепочки атомов, ответственные за взаимодействие с рецепторами, были расположены аналогичным образом [Wang Q. et al, 2007]. Видимо, замена пролина в положении 238, придающего жесткую структуру петле-240, на серин, меняет конформацию молекулы таким образом, что позволяет распознавать антителам аминокислотные остатки в петле-120. С другой стороны, можно предполагать, что замены в положениях 136I/240S являются компенсаторными. Большинство аминокислотных остатков петли-190 переменны. Ранее были описаны эскейп-мутанты с единичной заменой в положении 196, в частности, 194Asn→Asp или Lys, приводящие к потере потенциального сайта N-гликозилирования [Berton, M. et al., 1984; Berton M. and Webster R., 1985], а также варианты, адаптированные к росту в куриных эмбрионах [Saito T. et al., 2004]. В данном случае замена D196 →G не вызвала появления потенциального сайта N-гликозилирования. Однако, показано, что единичная замена Asp194→Tyr у вирусов гриппа В, адаптированных к росту в куриных эмбрионах, значительно изменяла антигенные свойства, что свидетельствует об антигенной значимости спирали-190, независимо от прикрепленных к ней гликанов [Lugovtsev V. et al., 2007]. Спираль-190 гемагглютиниона вируса гриппа В частично перекрывается с сайтом D в НЗ НА [Wiley D. et al., 1981] и сайтом Ca1 в Н1 НА [Caton A. et al., 1982; Gerhard W. et al., 1981]. Несомненно, все аминокислотные остатки в составе спирали-190 играют важную роль в

антигенных свойствах гемагглютиниона вируса гриппа В [Wang Q. et al., 2008].

Все разработанные МКА к вирусам гриппа В Викторианской линии также обладали выраженной вируснейтрализующей активностью. В результате клонирования вирусов дикого типа в присутствии МКА была получена панель из 30 ЭМ вируса гриппа В/Брисбен/46/15, резистентных к вируснейтрализующему действию каждого из МКА, в частности, по одному ЭМ для МКА 6A4, 7H8, 10F1 и 11G10, по два ЭМ для МКА 6E11, 7C8, 7D9, 8A8, 9B5, 9G5, 10B6, 10D3, 10D9 и 11G2, по три ЭМ для МКА 6A9 и 7G9. Дополнительно был получен ряд ЭМ вирусов В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия /2506/04.

В результате анализа НА ЭМ вируса гриппа В/Брисбен/46/15 в сравнении со штаммом дикого типа были выявлены аминокислотные замены в двенадцати положениях и у двух ЭМ вставки в положениях 168 и 169. Установлено, что большинство замен были расположены в областях, формирующих рецептор-связывающий сайт вируса гриппа В, а именно в петле–140, петле–240 и спирали–19. Кроме того, были идентифицированы АК замены в петле–160, а также в петле–120 и прилегающих областях. Кроме того, у двух ЭМ 6A4 и EM 9G5/1 были обнаружены вставки (инсерции) в положениях 168 и 169 (петля–160). Также идентифицированы замены АК в НА1 вирусов гриппа В/Шандонг/07/97 и В/Малайзия/2506/04 в петле – 120 и спирали – 190.

Ряд ЭМ имели АК замены в петле – 120 и прилегающих областях. В частности, ЭМ 7D9/1, 7D9/2 и 7C8/2 имели замену лизина на глутаминовую кислоту в положении 75 (K75→E), в то время как ЭМ 7C8/2 имел замену G74→E. ЭМ 8A8/1, 8A8/2 и 6A9/1, имели единичную аминокислотную замену треонина на изолейцин в положении 121 (T121→I). ЭМ 6A9/2 и 6A9/3 имели единичную замену T182→K (рис. 18). EM 10F1 также имел единичную замену T182→K. ЭМ 7G9/1, 7G9/2 и 7G9/3, полученные с использованием МКА 7G9, имели единичную АК замену H122→N. ЭМ 5B7

вируса гриппа В/Шандонг/07/97 и ЭМ 11F8 вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 также имели одну и ту же АК в положении 122 (H122N). Петля–120 расположена ближе мембранной оболочке и играет важную роль в стабилизации структуры белка НА. Антигенный сайт петля–120 эквивалентен антигенным сайтам Е в молекуле НА гриппа А(Н3) [Wiley D. et al., 1981] и сайтам Sa и Sb для НА вирусов гриппа А субтипа Н1 [Caton A. et al., 1982; Gerhard W. et al., 1981]. Разнообразие в петле–120 часто встречалось в недавних изолятах гриппа В в течение 2010-2015 годов в Италии, Малайзии, Китае и Таиланде [Fang Q. et al., 2015; Horthongkham N. et al., 2016; Tramuto F. et al., 2016; Oong X. et al., 2015]. Было показано, что петля–120 является структурно гибким регионом. Подобная структурная гибкость позволяет накапливать аминокислотные замены, что совместимо с важным антигенным эпитопом [Ni F. et al., 2013]. Высокая относительная энтропия на этом антигенном участке, как представляется, продолжается в течение последних двух десятилетий. В то время как остатки с высокой относительной энтропией распределены относительно равномерно в данном регионе для вирусов гриппа В Викторианской линии, для штаммов Ямагатской эволюционной линии больше аминокислотных остатков с высокой относительной энтропией было обнаружено за пределами петли–120, чем внутри самой петли [Suptawiwat O. et al., 2017]. Считается, что аминокислотные остатки в НА1 в положениях 75, 77, 116, 118 и 122 представляют собой эпитоп, который уникален для штаммов, подобных В/Виктория/2/87 [Nakagawa N. et al., 2006]. Кроме того, ранее было показано, что аминокислотные остатки в положениях 75 и 122 подвержены действию позитивного отбора [Nunes B. et al., 2008; Shen J. et al., 2009].

Установлено, что ряд ЭМ имели замены в петле – 160. Так анализ ЭМ 6E11/1, 6E11/2, 9B5/1, 9B5/, 10D3/1 и 10D3/2, показал, что эти варианты ЭМ имели единичную аминокислотную замену треонина на пролин в положении 168. Подобного рода замена может оказывать влияние на структуру белка, т.к., известно, что пролин не совместим с α -спиралью молекулы НА и, кроме того,

может формировать изгибы и придает конформационную жесткость. Во-вторых, замена T168→P приводит к удалению потенциального сайта N-гликозилирования (NKT→NKP) в положении 166-168. Известно, что вирусы гриппа В используют добавление или удаление гликозилирования в качестве механизма для изменения антигенности.

В ходе исследований было установлено, что ЭМ 6A4 и ЭМ 9G5/1 имели вставки N168 и K169 в петле-160. Такой вид антигенной изменчивости не характерен для вирусов гриппа В Викторианской линии. И более того, наличие инсерций в петле-160 гемагглютинаина В/Виктория подобных штаммов показан впервые.

Петля 160 частично перекрывается с антигенным участком В в Н3 НА [Wiley D. et al., 1981] и сайтом Sa в Н1 НА [Caton A. et al., 1982; Gerhard W. et al., 1981]. Петля-160 является единственной областью в гемагглютинине вируса гриппа В, где вставки и делеции неоднократно обнаруживались у изолятов вируса гриппа В разные эпидемические сезоны [Nerome R. et al., 1998; McCullers J. et al., 1999]. Выступающий характер петли-160 может облегчить размещение даже инсерций или делеций с несколькими остатками. Ранее были обнаружены ЭМ вируса В/Hong Kong/8/73 с инсерциями в положении 163 [Novanec D. and Air G., 1984]. Учитывая тот факт, что гемагглютинин вируса В/Hong Kong/8/73 имеет самую короткую петлю 160 среди всех известных НА вирусов гриппа В, дальнейшее расширение петли 160 у других вирусов гриппа В делает этот антигенный сайт особенно значимым [Wang Q. et al., 2008].

Таким образом, регулярные инсерции/делеции и аминокислотные замены в этой области, по-видимому, являются эффективными способами для изменения вируса гриппа В [McCullers J. et al., 1999], в частности, для того, чтобы выжить в течение длительного периода времени без антигенных сдвигов, как это наблюдается для вирусов гриппа А [Nerome R. et al., 1998]. Для современных вирусов гриппа В такой механизм эволюционной изменчивости как систематические инсерции/делеции в положениях 162-164 был характерен только для штаммов Ямагатской эволюционной линии.

Однако, в 2016 году в США и Норвегии были выделены штаммы Викторианской ЭЛ, которые имели две аминокислотные делеции в положениях 162 и 163 [Blanton L., et al., 2017a] в сочетании с аминокислотными заменами в положениях I180V в HA1 и R151K в HA2 [Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza the Francis Crick Institute. 2017. - https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/crick_sh2017_vcm_report_to_post.pdf]. Другой кластер вирусов Викторианской ЭЛ был выявлен в 2017 году в Гонконге [Blanton L., et al., 2017b]. Эти штаммы несли три аминокислотные делеции в положениях 162, 163 и 164 в сочетании с заменами в положениях I180T и K209N в HA1 [Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza the Francis Crick Institute. 2017. - https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/crick_sh2017_vcm_report_to_post.pdf].

Интересно отметить, что с использованием МКА 9G5 были получены два мутанта, один из которых имел вставки N168 и K169 в петле-160 (ЭМ 9G5/2), тогда как ЭМ 9G5/2 нес замену G206→R, расположенную в области спирали – 190. Ранее было показано, что МКА 10B8 распознают остатки в положениях 164, 165, 170 и 203, т.е. в петле-160 и спирали – 190 и эпитоп для МКА 10B8 расположен на вершине молекулы HA [Nakagawa et al., 2006].

Наибольшее антигенное разнообразие при анализе ЭМ вирусов гриппа В Викторианской линии было в спирали – 190 и прилегающих областях (петля – 240). Было установлено, что ЭМ вируса гриппа В/Брисбен/46/15 11G2/2 имел замену глутаминовой кислоты на лизин (E198→K), ЭМ 11G10 – аминокислотную замену в положении T199→I, ЭМ 10B6/1 и 10B6/2 имели единичную аминокислотную замену глутамина на аргинин в положении 200 (Q200→R), а ЭМ 9G5/2 и ЭМ 7H8 имели единичную замену G206→R. Кроме того, ЭМ вируса гриппа В/Шандонг/07/09 несли замены K203→T/I, а ЭМ вируса гриппа В/Малайзия/2506/04 – A202E и K203R/N.

Как известно, спираль-190 формирует верхнюю кромку рецептор-связывающего кармана гемагглютинина вируса гриппа В и частично

перекрывается с сайтом D в H3 HA [Wiley D. et al., 1981] и сайтом Ca1 в H1 HA [Caton A. et al., 1982; Gerhard W. et al., 1981].

Все аминокислотные остатки на наружной поверхности спирали – 190 имеют значимую антигенную роль. Отдельные мутации в этой области неоднократно встречались в вариантах ЭМ вирусов гриппа, полученных с использованием МКА: Glu195 → Lys, Gln197 → Lys, Val199 → Ala, Leu или Glu [Berton et al, 1984, 1985], Lys200 → Asn, Arg или Thr [Berton et al, 1984, 1985; Nakagawa et al., 2001; Webster R. and Berton M., 1981] и Ser205 → Leu или Pro [Berton et al, 1984, 1985]. Кроме того, исследование HA вируса гриппа В/Гонконг/73 с использованием сайт-направленного мутагенеза показало, что замены Thr196 → Pro и Gln197 → Ile полностью подавляет способность МКА связываться с данным вирусом [Rivera, K. et al., 1995]. «Горячей точкой» на спирали – 190 является последовательность HA 1 (194-196), представляющая собой потенциальный сайт N-гликозилирования. Было показано, что вирус с единичной мутацией Ala196 → Thr, которая создает новый потенциальный сайт гликозилирования в HA 1 (194-196), вызвал эпидемию в Японии [Nakagawa N. et al., 2004]. Кроме того, единственная замена в положении Asn194Ser, вызвала различия в антигенной реактивности между двумя социркулирующими В/Ямагата подобными штаммами [Muyanga, J. et al., 2001]. Т.о., наши данные подтверждают ранее полученные результаты о том, что вариабельность аминокислотных остатков в составе спирали-190 оказывают сильное влияние на антигенные свойства гемагглютиниона вируса гриппа В [Wang Q. et al., 2008].

Крайне интересным являются аминокислотные замены у ЭМ, полученных в присутствии МКА 10D9. ЭМ 10D9/1 и 10D9/2 имеют две аминокислотные замены G141 → R и P241 → T, при этом они находятся в двух антигенно различных областях – петле-140 и петле-240. Ранее замены в положении 241Pro → 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 замена 240Pro → Ser была

обнаружена у эскейп-мутантов В/Виктория подобных штаммов [Nakagawa N. et al., 2001]. Ранее было показано, что левый край рецептор-связывающих сайта НА В/Hong Kong/8/73 содержит остатки Pro-238 (241 у В/Брисбен/46/15) и Ser-240 (243 у В/Брисбен/46/15), которые находятся в эквивалентных позициях остаткам 226 и 228 в НЗ НА, соответственно. Хотя боковая цепочка Pro-238 короче, чем у Leu-226 в НЗ НА, главные цепочки петли 240 в НА В/Hong Kong/8/73 сдвинуты в сторону петли-140 таким образом, чтобы боковые цепочки атомов, ответственные за взаимодействие с рецепторами, были расположены аналогичным образом [Wang Q. et al., 2007]. При этом, изменение ориентации боковых цепей в НА1 235-240 может кардинально изменять антигенные свойства этого региона [Ni F. et al., 2013]. Видимо, замена пролина в положении 238, придающего жесткую структуру петле-240, изменяет конформацию молекулы таким образом, что позволяет распознавать антителам аминокислотные остатки в петле-140. С другой стороны показано, что ЭМ 11G2/1 и 11G2/2, полученные с использованием МКА 11G2, имели аминокислотные замены глицина на аргинин (141G→R) в петле – 140 и глутаминовой кислоты на лизин (E198→K) в спирали-190, соответственно. Т.о., можно предполагать, что эпитопы для МКА 10D9 и 11G2 частично перекрываются.

Большой интерес представляют эпитопы гемагглютиниона вирусов гриппа В сходные по первичной структуре (аминокислотной последовательности), но отличающиеся по антигенным характеристикам для вирусов Ямагатской и Викторианской эволюционных линий. Так, например, нами был выявлен эпитоп в положении 141G. Показано, что этот сайт является высококонсервативным и содержит остаток глицина в 98,3% случаев, аргинина – 1,08%, глутаминовой кислоты – 0,06% и аланина – 0,03% [Ni F. et al., 2013]. Эта область является эпитопом для связывания для МКА 1G4, 2B10 и 3C2, полученных к штамму В/Массачусетс/2/12 Ямагатской ЭЛ. Кроме того с данным сайтом взаимодействовали МКА 1G9 и 5B11, но при этом они дополнительно взаимодействовали с аминокислотными остатками 136R и

237G, а два ЭМ 5B11 взаимодействовали с 136R и 240P. С другой стороны, 141G является эпитопом для МКА 11G2 и 10D9, специфичных к вирусу В/Брисбен/46/15 Викторианской ЭЛ. Дополнительно, МКА 11G2 связывались с E198, а для МКА 10D9 эпитопом является совокупность 141G и P241 (аминокислотный остаток 240 в НА В/Массачусетс/2/12 Ямагатской ЭЛ). Показано, что в положении 136 остаток аргинина (R) присутствует в 98% случаев у вирусов Ямагатской ЭЛ и только 1% - у «Викторианских» штаммов, т.е., специфичен для В/Ямагата подобных штаммов [Ni F. et al., 2013]. Альтернативно, пролин в положении 240/241 является высококонсервативным и присутствует у 99,6% вирусов гриппа В обеих линий [Carbone V. et al., 2013]. При этом МКА, полученные к «Ямагатским» и «Викторианским» штаммам, и направленные к эпитопам в положениях 141 и 240/241, специфически взаимодействуют со штаммами вирусов гриппа В только той линии, к которой они были получены. Ранее было сказано, что точная роль аминокислотного остатка 238 (240/241 у В/Массачусетс/2/12 и В/Брисбен/46/15) в структуре НА1 в отношении антигенных свойств не ясна [Wang Q. et al., 2008]. На основании полученных данных можно сделать вывод, что эпитопы 141 и 240/241 могут быть специфичными каждой эволюционной линии вирусов гриппа В и являются конформационным.

Перспективы дальнейшей разработки темы. На основании результатов диссертационного исследования планируется провести анализ влияния выявленных мутаций в рецептор-связывающем кармане гемагглютинина вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий на рецепторные свойства этого белка 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 α 2,3 Gal рецепторами. Напротив, замены A202E и K203T/N в гемагглютинине Викторианских штаммов приводили к утрате взаимодействия с SA α 2,3 Gal рецепторами.

Список сокращений

АК – аминокислота

АТ – антитела

ВГА – вирус гриппа А

ВГВ – вирус гриппа В

КББ – карбонатно-бикарбонатный буфер

КЭ – куриные эмбрионы

М.м. – молекулярная масса

МКА – моноклональные антитела

НА – гемагглютинин

НА – нейраминидаза

НМ – нитроцеллюлозная мембрана

РГА – реакция гемагглютинации

РСС – рецептор-связывающий сайт

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭЛ – эволюционная линия

ЭМ – эскейп-мутант

wt – дикий тип

Список литературы

1. Лобова Т.Г., Прокопец А.В., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Паянкова В.Ф., Суховецкая В.Ф. и др. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г // Вопросы вирусологии - 2012. - Т. 54. - № 6. – С. 22-26.
2. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г. и др. // Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Методические рекомендации.- СПб, 2006
3. Abed Y., M.B. Coulthart, Y. Li, G. Boivin. Evolution of surface and nonstructural-1 genes of influenza B viruses isolated in the Province of Quebec, Canada, during the 1998–2001 period // Virus Genes -2003 - 27 (2) - P. 125-135
4. Adlhoch C, Snacken R, Melidou A, Ionescu S, Penttinen P, and the European Influenza Surveillance Network. Dominant influenza A(H3N2) and B/Yamagata virus circulation in EU/EEA, 2016/17 and 2017/18 seasons, respectively. // Euro Surveill. – 2018 - 23(13): 18-00146. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.13.18-00146
5. Air GM, Gibbs AJ, Laver WG, Webster RG. Evolutionary changes in influenza B are not primarily governed by antibody selection // Proc Natl Acad Sci USA – 1990 – 87 – P. 3884–3888.
6. Ambrose C.S., Levin M.J. The rationale for quadrivalent influenza vaccines // Human Vaccines and Immunotherapeutic. -2012.- Vol. 8. –P. 81-88.
7. Bae J-Y, Lee I, Kim JI, Park S, Yoo K, Park M, Kim G, Park MS, Lee J-Y, Kang C, Kim K, Park M-S.. A single amino acid in the polymerase acidic protein determines the pathogenicity of influenza B viruses // J Virol – 2018 - 92:e00259-18. [https:// doi.org/10.1128/JVI.00259-18](https://doi.org/10.1128/JVI.00259-18).
8. Bangaru S, Nieuwma T, Kose N, Thornburg NJ, Finn JA, Kaplan BS, King HG, Singh V, Lampley RM, Sapparapu G, Cisneros A , Edwards KM, Slaughter JC, Edupuganti S, Lai L, Richt JA, Webby RJ, Ward AB, Crowe

- JE Jr. Recognition of influenza H3N2 variant virus by human neutralizing antibodies // *JCI Insight*. -2016 - 1(10). pii: e86673.
9. Bedford T, Steven R, Barr IG, Shobha B, Mandeep C, Cox NJ, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift // *Nature* – 2015 - 523(7559) – P. 217–20. <https://doi.org/10.1038/nature14460> PMID: 26053121
 10. Bedford T, Suchard MA, Lemey P, Dudas G, Gregory V, Hay AJ, et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution // *Elife* – 2014 - 3:e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914> PMID: 24497547
 11. Beer K, Dai M, Howell S, Rijal P, Townsend AR, Lin Y, Wharton SA, Daniels RS, McCauley JW. Characterization of neutralizing epitopes in antigenic site B of recently circulating influenza A(H3N2) viruses // *J Gen Virol*. - 2018 - 99(8) – P. 1001-1011. doi: 10.1099/jgv.0.001101
 12. Benjamin E, Wang W, McAuliffe JM, Palmer-Hill FJ, Kallewaard NL, Chen Z, Suzich JA, Blair WS, Jin H, Zhu Q. A broadly neutralizing human monoclonal antibody directed against a novel conserved epitope on the influenza virus H3 hemagglutinin globular head // *J Virol*. - 2014 -88(12) – P. 6743-50. doi: 10.1128/JVI.03562-13
 13. Berton, M. T., Naeve C. W., Webster R. G. Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies // *J. Virol*. -1984. -Vol. 52. -P. 919– 927
 14. Berton, M. T., Webster R. G. The antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: operational and topological mapping with monoclonal antibodies // *Virology*. -1985. -Vol. 143. -P. 583–594.
 15. Betakova T, Nermut MV, Hay AJ. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus // *J. Gen. Virol*. – 1996 - 77(Pt 11) - P. 2689–2694.

16. Blanc A, Ruchansky D, Clara M, Achaval F, Le Bas A, Arbiza J. Serologic evidence of influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*) // *J Wildl Dis.* – 2009 – 45 – P. 519–21
17. Blanton L., Alabi N., Mustaquim D., Taylor C., Kniss K., Kramer N., Budd A., Garg S., Cummings C., Chung J., Flannery B., Fry A., Sessions W., Garten R., Xu X., Elal A., Gubareva L., Barnes J., Dugan V., Wentworth D., Burns E., Katz J., Jernigan D., Brammer L. Update: Influenza Activity in the United States During the 2016–17 Season and Composition of the 2017–18 Influenza Vaccine // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* -2017- Vol. 66(25). – P. 668-676. doi: 10.15585/mmwr.mm6625a3
18. Blanton L., Wentworth D., Alabi N., Azziz-Baumgartner E., Barnes J., Brammer L., Burns E., Davis C., Dugan V., Fry A., Garten R., Grohskopf L., Gubareva L., Kniss K., Lindstrom S., Mustaquim D., Olsen S., Roguski K., Taylor C., Trock S., Xu X., Katz J., Jernigan D. Update: Influenza Activity - United States and Worldwide, May 21-September 23, 2017 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* -2017- Vol. 66(39). –P. 1043-1-51. doi: 10.15585/mmwr.mm6639a3.
19. Bodewes R., Morick D., de Mutsert G., Osinga N., Bestebroer T., van der Vliet S., Smits S.L., Kuiken T., Rimmelzwaan G.F., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Recurring influenza B virus infections in seals // *Emerg Infect Dis.* -2013. -Vol 19(3). -P. 511-2.
20. Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S. The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid // *EMBO J.* – 1992 - 11(1) – P. 49–56.
21. Caini S, El-Guerche Séblain C, Ciblak MA, Paget J. Epidemiology of seasonal influenza in the Middle East and North Africa regions, 2010-2016: Circulating influenza A and B viruses and spatial timing of epidemics // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2018 - 12(3) – P. 344-352. doi: 10.1111/irv.12544. Epub 2018 Feb 19.

22. Cao S, Jiang J, Li J et al. Characterization of the nucleocytoplasmic shuttle of the matrix protein of influenza B virus // *J. Virol* – 2014 - 88(13) – P. 7464–7473.
23. Carbone V., Kim H., Huang J.X., Baker M.A., Ong C., Cooper M.A., Li J., Rockman S., Velkov T. Molecular characterization of the receptor binding structure-activity relationships of influenza B virus hemagglutinin // *Acta Virol.* -2013. -Vol. 57(3). -P. 313-32
24. Caton A.J., G.G. Brownlee, J.M. Yewdell, W. Gerhard. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H3 subtype) // *Cell* – 1982 - 31 - P. 417-427.
25. Cauldwell AV, Long JS, Moncorge O, Barclay WS. Viral determinants of influenza A virus host range // *J. Gen. Virol.* – 2014 - 95(Pt 6) – P.1193–1210.
26. Chen J.M., Guo Y.J., Wu K.Y., Guo J.F., Wang M., Dong J., Zhang Y., Li Z., Shu Y.L. Exploration of the emergence of the Victoria lineage of influenza B virus // *Arch. Virol.* -2007. -Vol 152. -P. 415–422
27. Chen R, Rubing C, Holmes EC. The Evolutionary Dynamics of Human Influenza B Virus // *J Mol Evol.* – 2008 - 66(6) – P. 655–63. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z> PMID: 18504518
28. Cortes-Alcala R, Dos Santos G, DeAntonio R, Devadiga R, Ruiz-Matus C, Jimenez-Corona ME, Diaz-Quinonez JA, Romano-Mazzotti L, Cervantes-Apolinar MY, Kuri-Morales P. The burden of influenza A and B in Mexico from the year 2010 to 2013: An observational, retrospective, database study, on records from the Directorate General of Epidemiology database // *Hum Vaccin Immunother.*- 2018 – 10 – P. 1-9. doi: 10.1080/21645515.2018.1456281
29. Daniels PS, Jeffries S, Yates P, Schild GC, Rogers GN, Paulson JC, et al. The receptor-binding and membrane-fusion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies // *EMBO J.* -1987 - 6(5) – P. 1459–65.

30. Dauber B, Heins G, Wolff T. The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction // *J. Virol.* – 2004 - 78(4) – P. 1865–1872.
31. Dauber B, Schneider J, Wolff T. Double stranded RNA binding of influenza B virus nonstructural NS1 protein inhibits protein kinase R but is not essential to antagonize production of alpha/beta interferon // *J. Virol.* – 2006 - 80(23) – P. 11667–11677.
32. Demers A, Ran Z, Deng Q et al. Palmitoylation is required for intracellular trafficking of influenza B virus NB protein and efficient influenza B virus growth in vitro // *J. Gen. Virol.* – 2014 - 95(Pt 6) – P. 1211–1220.
33. Deng Q, Wang D, Xiang X et al. Nuclear localization of influenza B polymerase proteins and their binary complexes // *Virus Res.* – 2011 - 156(1–2) – P. 49–53.
34. Donelan NR, Dauber B, Wang X, Basler CF, Wolff T, Garcia-Sastre A. The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation // *J. Virol.* – 2004 - 78(21) – P. 11574–11582.
35. Dreyfus C, Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., van der Vlugt R., Lamrani M., Korse H.J., Geelen E., Sahin Ö., Sieuwerts M., Brakenhoff J.P., Vogels R., Li O.T., Poon L.L., Peiris M., Koudstaal W., Ward A.B., Wilson I.A., Goudsmit J., Friesen R.H. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses // *Science.* – 2012 – 337(6100) – P.1343-8
36. Dudas G, Bedford T, Lycett S, Rambaut A. Reassortment between Influenza B Lineages and the Emergence of a Coadapted PB1–PB2–HA Gene Complex // *Mol Biol Evol.* – 2015 - 32(1) – P. 162–72. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu287>
37. Dunand CJ, Leon PE, et al. Both Neutralizing and Non-Neutralizing Human H7N9 Influenza Vaccine-Induced Monoclonal Antibodies Confer Protection // *Cell Host Microbe* – 2016 - 19(6) – P. 800– 813.

38. Dunand CJ, Leon PE, et al. Preexisting human antibodies neutralize recently emerged H7N9 influenza strains // *J Clin Invest.* – 2015 - 125(3) – P. 1255–1268.
39. Ekiert DC, Bhabha G, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope // *Science* – 2009 - 324(5924) – P. 246–251.
40. Ekiert DC, Friesen R., et al. A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses // *Science* – 2011 - 333(6044) – P. 843–850.
41. Fang Q., Gao Y., Chen M., Guo X., Yang X., Wei L. Molecular epidemiology and evolution of influenza A and B viruses during winter 2013-2014 in Beijing, China // *Arch Virol.* -2015.-Vol. 160(4). – P.1083-95. doi: 10.1007/s00705-015-2362-x.
42. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 2005;79(5):2814–22
43. Francis T Jr. A new type of virus from epidemic influenza // *Science* – 1940 - 92(2392) – P. 405–408.
44. Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses // *Virology* – 2006 - 344(2) – P. 432-8. PubMed PMID: 16226289.
45. Gambaryan AS, Lomakina NF, Boravleva EY, Kropotkina EA, Mashin VV, Krasilnikov IV, et al. Comparative safety, immunogenicity, and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models (Testing of killed and live H5 vaccine) // *Influenza Other Respir Viruses* – 2012 - 6(3) – P. 188-95. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00291.x. PubMed PMID: 21951678.
46. Gambaryan AS, Robertson JS, Matrosovich MN. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses // *Virology* – 1999 – 258 – P. 232–239.

47. Gambaryan AS, Tuzikov AB, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Bovin NV, Matrosovich MN. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyllactosamine) // *Virology* – 1997 – 232 – P. 345–350. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1997.8572>
48. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins // *J Biol Chem* – 2010 - 285(37) – P. 28403–9
49. Garg S, Moore Z, Lee N, McKenna J, Bishop A, Fleischauer A, et al. A cluster of patients infected with I221V influenza b virus variants with reduced oseltamivir susceptibility—North Carolina and South Carolina, 2010–2011 // *J Infect Dis* – 2013 - 207(6) – P. 966–73. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis776> PMID: 23242536
50. Gentile A, Lucion MF, del Valle Juarez M, Martinez AC, Romanin V, Bakir J, et al. Influenza virus: 16 years' experience of clinical epidemiologic patterns and associated infection factors in hospitalized children in Argentina // *PLoS ONE* – 2018 - 13(3): e0195135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195135>
51. Gerhard W., Yewdell J., Frankel M. E., Webster R. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies // *Nature*. - 1981. - Vol. 290 - P. 713–717
52. Govorkova E.A., Matrosovich M.N., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Gerdil C., Fanget B., Webster R.G. Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells // *Virology*. -1999 - Vol. 262. - P. 31–38
53. Guan R, Ma LC, Leonard PG et al. Structural basis for the sequence-specific recognition of human ISG15 by the NS1 protein of influenza B virus // *Proc. Natl Acad. Sci. USA* – 2011 - 108(33) – P. 13468–13473.

54. Hai R, Martinez-Sobrido L, Fraser KA, Ayllon J, Garcia-Sastre A, Palese P. Influenza B virus NS1-truncated mutants: liveattenuated vaccine approach // *J. Virol* – 2008 - 82(21) – P. 10580–10590.
55. Hatta M, Goto H, Kawaoka Y. Influenza B virus requires BM2 protein for replication // *J. Virol* – 2004 - 78(11) –P. 5576–5583.
56. Heider A, Mochalova L, Harder T, Tuzikov A, Bovin N, Wolff T, Matrosovich M, Schweiger B. Alterations in hemagglutinin receptor-binding specificity accompany the emergence of highly pathogenic avian influenza viruses // *J Virol* - 2015 - 89(10) – P. 5395405. doi: 10.1128/JVI.03304-14.
57. Hiromoto Y., Saito T., Lindstrom S. et al. Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus // *J. of Gen. Virol.* –2000. – V.81. – P.929-937.
58. Hong KW, Cheong HJ, Song JY, Noh JY, Yang TU, Kim WJ. Clinical manifestations of influenza A and B in children and adults at a tertiary hospital in Korea during the 2011–2012 season // *Jpn J Infect Dis* – 2015 – 68 – P. 20-6; <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.JJID.2013.466>
59. Horthongkham N., Athipanyasilp N., Pattama A., Kaewnapan B., Sornprasert S., Srisurapanont S., et al. Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014 // *PLoS One*. -2016. –Vol.7; 11(7):e0158244. doi: 10.1371/journal.pone.0158244
60. Horvath CM, Williams MA, Lamb RA. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide // *EMBO J* – 1990 - 9(8) – P. 2639–2647.
61. Hovanec D., Air G. Antigenic structure of the hemagglutinin of influenza virus B/Hong Kong/8/73 as determined from gene sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies. // *Virology*.-1984.- Vol. 139.- P.384–392
62. Ikonen N, Pyhala R, Axelin T, Kleemola M, Korpela H. Reappearance of influenza B/Victoria/2/87-lineage viruses: Epidemic activity, genetic

- diversity and vaccination efficacy in the Finnish Defence Forces // *Epidemiol Infect.* – 2005 – 133 – P. 263–271.
63. Ilyushina N, Rudneva I, Gambaryan A, Bovin N, Kaverin N. Monoclonal antibodies differentially affect the interaction between the hemagglutinin of H9 influenza virus escape mutants and sialic receptors // *Virology* – 2004 - 329(1) – P. 33-9.
64. Imai M, Watanabe S, Ninomiya A, Obuchi M, Odagiri T. Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly. *J. Virol.* 78(20), 11007–11015 (2004).
65. Imai M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex // *Arch. Virol.* - 2003 - 148(10) – P. 1873–1884.
66. Impagliazzo A, Milder F, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen // *Science* – 2015 - 349(6254) – P. 1301–1306.
67. Irving SA, Patel DC, Kieke BA, Donahue JG, Vandermause MF, Shay DK, Belongia EA. Comparison of clinical features and outcomes of medically attended influenza A and influenza B in a defined population over four seasons: 2004–2005 through 2007–2008 // *Influenza Other Respir Viruses* - 2012 – 6 – P. 37-43; PMID:21668663; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00263.x>
68. Ito T, Suzuki Y, Mitnaul L, Vines A, Kida H, Kawaoka Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species // *Virology* – 1997 - 227(2) – P. 493-9. doi: 10.1006/viro.1996.8323
69. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014 - 14(5) – P. 315–328.
70. Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era // *J. Gen. Virol.* – 2011 - 92(Pt 1) – P. 1–17.

71. Jackson D, Zurcher T, Barclay W. Reduced incorporation of the influenza B virus BM2 protein in virus particles decreases infectivity // *Virology* – 2004 - 322(2) – P. 276–285.
72. Jackson DC, Murray JM, White DO, Gerhard WU. Enumeration of antigenic sites of influenza virus Hemagglutinin // *Infect Immun.* – 1982 - 37(3) – P. 912–918.
73. Kanegae Y., Sugita S., Endo A., Ishida M., Senya S., Osako K., Nerome K., Oya A. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season // *J Virol.* -1990. -Vol. 64(6) - P. 2860-5
74. Kaverin N., I.A. Rudneva, N.A. Ilyushina, A.S. Lipatov, S. Krauss, R.G. Webster. Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: analysis of H9 escape mutants // *J. Virol* – 2004- 78 - P. 290-299.
75. Kaverin N.V., Rudneva I., Govorkova E., Timofeeva T., Shilov A., Kochergin-Nikitsky K., Krylov PS, Webster RG. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies // *J.Virol.*- 2007.- Vol. 81.- P. 12911-12917
76. Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Varich NL, Lipatov AS, Smirnov YA, Govorkova EA, Gitelman AK, Lvov DK, Webster RG. Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants // *J Gen Virol.* – 2002 - 83(Pt 10) – P. 2497-505.
77. Kim JI, Lee I, Park S, Bae J-Y, Yoo K, Lemey P, et al. Reassortment compatibility between PB1, PB2, and HA genes of the two influenza B virus lineages in mammalian cells // *Sci Rep.* – 2016 - 6:27480. <https://doi.org/10.1038/srep27480> PMID: 27270757
78. Kohler G., and Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion // *Eur. J. Immunol.* -1976, -Vol. 6, -P. 511–519

79. Koutsakos M, Nguyen T., Barclay WS, Kedzierska K. Knowns and unknowns of influenza B viruses // *Future Microbiol.* – 2016 - 11(1) – P. 119–35. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120> PMID: 26684590
80. Krammer F, Pica N, Hai R, Margine I, Palese P. Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly protective stalk-specific antibodies // *J Virol.* - 2013 - 87(12) – P. 6542–6550.
81. Krause JC, Tsibane T, Tumpey TM, Huffman CJ, Albrecht R, Blum DL, Ramos I, Fernandez-Sesma A, Edwards KM, García-Sastre A, Basler CF, Crowe JE Jr. Human monoclonal antibodies to pandemic 1957 H2N2 and pandemic 1968 H3N2 influenza viruses // *J Virol.* - 2012 - 86(11) – P. 6334-40. doi: 10.1128/JVI.07158-11.
82. Krumbholz A, Philipps A, Oehring H et al. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2011 - 200(2) – P. 69–75.
83. Krystal M, Young JF, Palese P, Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC: Sequential mutations in hemagglutinins of influenza B virus isolates: definition of antigenic domains // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1983 - 80 (14) – P. 4527–4531.
84. Laemmli U.R. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature* – 1970 - Vol. 227.- P. 680-685.
85. Lauring AS, Andino R. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses // *PLoS Pathog.* – 2010 - 6(7):e1001005
86. Leon PE, Wohlbold TJ, He W, Bailey MJ, Henry CJ, Wilson PC, Krammer F, Tan GS. Generation of Escape Variants of Neutralizing Influenza Virus Monoclonal Antibodies // *J Vis Exp.* – 2017 - 29;(126). doi: 10.3791/56067.
87. Lin Y.P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses // *Virus Res.* - 2004 –Vol. 103(1-2) - P. 47-52
88. Lindstrom S., Hiromoto Y., Nishimura H., Saito T., Nerome R., Nerome K. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating

- lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes // *J. Virol.* - 1999 - 73(5) – P. 4413-4426.
89. Liu Y, Yang Y, Fan J, He R, Luo M, Zheng X. The crystal structure of the PB2 cap-binding domain of influenza B virus reveals a novel cap recognition mechanism // *J. Biol. Chem.* – 2015 - 290(14) – P. 9141–9149.
90. Lo Y-C, Chuang J-H, Kuo H-W, Huang W-T, Hsu Y-F, Liu M-T, et al. Surveillance and vaccine effectiveness of an influenza epidemic predominated by vaccine-mismatched influenza B/Yamagata-lineage viruses in Taiwan, 2011–12 season // *PLoS One* – 2013 - 8(3):e58222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058222> PMID: 23472161
91. Lugovtsev V. Y., Vodeiko G. M., Strupczewski C. M., Ye Z., Levandowski R. A. Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of hemagglutinin // *Virology* – 2007 - Vol. 365 - P. 315–323
92. Lugovtsev V. Y., Vodeiko G. M., Levandowski R. A. Mutational pattern of influenza B viruses adapted to high growth replication in embryonated eggs // *Virus Res.* -2005. -Vol. 109. -P. 149–157
93. Lugovtsev V.Y., Smith D.F., Weir J.P. Changes of the receptor-binding properties of influenza B virus B/Victoria/504/2000 during adaptation in chicken eggs // *Virology* - 2009 -Vol. 394 - P. 218–226
94. Luo C, Morishita T, Satou K, Tateno Y, Nakajima K, Nobusawa E. Evolutionary pattern of influenza B viruses based on the HA and NS genes during 1940 to 1999: origin of the NS genes after 1997 // *Arch Virol.* – 1999 - 144(10) – P. 1881-91.
95. Ma C, Soto CS, Ohigashi Y et al. Identification of the pore-lining residues of the BM2 ion channel protein of influenza B virus // *J. Biol. Chem.* – 2008 - 283(23) –P. 15921–15931.
96. Matias G, Taylor R, Haguinet F, Schuck-Paim C, Lustig R, Shinde V. Estimates of mortality attributable to influenza and RSV in the United States during 1997–2009 by influenza type or subtype, age, cause of death, and risk

- status // *Influenza Other Respir Viruses* – 2014 – 8 – P. 507-15; PMID:24975705; <http://dx.doi.org/10.1111/irv.12258>
97. Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site // *Virology* – 1997 - 233(1) – P. 224-34. doi: 10.1006/viro.1997.8580
98. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2004 - 101(13) – P. 4620-4. doi: 10.1073/pnas.0308001101
99. Matsuzaki Y, Sugawara K, Furuse Y, Shimotai Y, Hongo S, Mizuta K, Nishimura H. Neutralizing Epitopes and Residues Mediating the Potential Antigenic Drift of the Hemagglutinin-Esterase Protein of Influenza C Virus // *Viruses*. - 2018 - 10(8). pii: E417. doi: 10.3390/v10080417.
100. Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants // *J Virol*. – 2014 - 88(21) – P. 12364-73. doi: 10.1128/JVI.01381-14.
101. McCullers J., Wang G., He S., Webster R. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. // *J. Virol*. – 1999 - Vol. 73. – P. 7343–7348
102. McCullers JA, Hayden FG. Fatal influenza B infections: time to reexamine influenza research priorities // *J Infect Dis*. – 2012 - 205(6) - P. 870–2. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir865> PMID: 22291194
103. McCullers JA, Hoffmann E, Huber VC, Nickerson AD. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of

- influenza B virus confers mouse adaptation and virulence // *Virology* - 2005 336(2) – P. 318–326.
104. McCullers JA, Saito T, Iverson AR. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003 // *J. Virol.* – 2004 - 78(23) - P. 12817–12828.
105. Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011 - 9(8) – P. 590–603.
106. Mochalova L, Bright R, Xu X, Korchagina E, Chinarev A, Bovin N, Klimov A. Shift in oligosaccharide specificities of hemagglutinin and neuraminidase of influenza B viruses resistant to neuraminidase inhibitors // *Glycoconj J* - 2010 - 27(3) – P. 321-7. doi: 10.1007/s10719-010-9280-7.
107. Mochalova L, Gambaryan A, Romanova J, Tuzikov A, Chinarev A, Katinger D, Katinger H, Egorov A, Bovin N. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs // *Virology* – 2003 - 313(2) – P. 473-80.
108. Muyanga J, Matsuzaki Y, Sugawara K, Kimura K, Mizuta K, Ndumba I, Muraki Y, Tsuchiya E, Hongo S, Kasolo FC, Numazaki Y, Nakamura K. Antigenic and genetic analyses of influenza B viruses isolated in Lusaka, Zambia in 1999 // *Arch Virol.* – 2001 – 146 – P. 1667–1679.
109. Nakagawa N, Higashi N, Nakagawa T. Cocirculation of antigenic variants and the vaccine-type virus during the 2004–2005 influenza B virus epidemics in Japan // *J Clin Microbiol.* – 2009 - 47(2) – P. 352–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.01357-08> PMID: 19091818
110. Nakagawa N, Kubota R, Maeda A, Okuno Y. Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002–2003 season // *J Clin Microbiol.* – 2004 – 42 – P. 3295–3297.
111. Nakagawa N, Nukuzuma S, Haratome S, Go S, Nakagawa T, Hayashi K. Emergence of an Influenza B Virus with Antigenic Change // *J Clin Microbiol.* – 2002 – 40 – P. 3068–3070.

112. Nakagawa N., Kubota R., Nakagawa T., Okuno Y. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains // *J. Gen. Virol.* - 2001. - Vol. 82. - P. 2169–2172
113. Nakagawa N., Kubota R., Nakagawa T., Okuno Y. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the 'loop' // *J. Gen. Virol.* -2003 -Vol. 84 - P. 769–773
114. Nakagawa N., R. Kubota, Y. Okuno. Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus victoria group isolates in Japan // *J. Clin. Microbiol.* – 2005 - 43(8) - P. 4212-4214
115. Nakagawa, N., J. Suzuoki, R. Kubota, S. Kobatake, and Y. Okuno. Discovery of the neutralizing epitope common to influenza B virus Victoria group isolates in Japan // *J. Clin. Microbiol.* – 2006 – 44 – P. 1564–1566.
116. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza // *Nat Rev Genet.* – 2007 - 8(3) – P. 196–205.
117. Nerome R., Hiromoto Y., Sugita S., Tanabe N., Ishida M., Matsumoto M., Lindstrom S.E., Takahashi T., Nerome K. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism // *Arch. Virol.* - 1998 -Vol143(8) - P. 1569-83.
118. Ng AK, Lam MK, Zhang H et al. Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein // *J. Virol.*- 2012 - 86(12) – P. 6758–6767.
119. Nguenha N, Tivane A, Pale M, Machalele L, Nacoto A, Pires G, et al. Clinical and epidemiological characterization of influenza virus infections in children with severe acute respiratory infection in Maputo, Mozambique: Results from the implementation of sentinel surveillance, 2014 – 2016 // *PLoS ONE* – 2018 - 13(3): e0194138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194138>

120. Ni F., Kondrashkina E., Wang Q. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin // *Virology* – 2013 - Vol. 44. - P. 112–122
121. Ni F, Mbawuiké IN, Kondrashkina E, Wang Q. The roles of hemagglutinin Phe-95 in receptor binding and pathogenicity of influenza B virus // *Virology* – 2014 - 450-451 – P. 71-83. doi: 10.1016/j.virol.2013.11.038
122. Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses // *Respiratory Research*. – 2007 - 8:73. doi: 10.1186/1465-9921-8-73.
123. Nunes, B., Pechirra, P., Coelho, A., Ribeiro, C., Arraiolos, A., Rebelo-de-Andrade, H. Heterogeneous selective pressure acting on influenza B Victoria- and Yamagata-like hemagglutinins // *J. Mol. Evol.* – 2008 - 67 (4) –P. 427–435
124. Odagiri T, Hong J, Ohara Y. The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component // *J. Gen. Virol.* – 1999 - 80(Pt 10) – P. 2573–2581.
125. Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus Hemagglutinin // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012 - 418(1) – P. 38-43. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.108
126. Okamatsu M, Sakoda Y, Kishida N, Isoda N, Kida H. Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses // *Arch Virol.* - 2008 - 153(12) – P. 2189-95. doi: 10.1007/s00705-008-0243-2
127. Oong X.Y., Ng K.T., Lam T.T.-Y., Pang Y.K., Chan K.G., Hanafi N.S., Kamarulzaman A., Tee K. Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Influenza B Viruses in Malaysia, 2012-2014 // *PLoS ONE*. - 2015 - Vol. 10(8): e0136254. doi:10.1371/journal.pone.0136254

128. Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. Influenza B virus in seals // *Science* - 2000. - Vol. 288(5468) - P. 1051-3.
129. Oxford JS, Newman R, Corcoran T, Bootman J, Major D, Yates P, Robertson J, Schild GC. Direct isolation in eggs of influenza A (H1N1) and B viruses with haemagglutinins of different antigenic and amino acid composition // *J Gen Virol.* – 1991 – 72 – P. 185–189.
130. Oxford JS, Schild GC, Corcoran T, Newman R, Major D, Robertson J, Bootman J, Higgins P, al-Nakib W, Tyrrell DA. A host-cell-selected variant of influenza B virus with a single nucleotide substitution in HA affecting a potential glycosylation site was attenuated in virulence for volunteers // *Arch Virol.* – 1990 – 110 – P. 37–46.
131. Paiva T.M., Benega M.A., Silva D.B., Santos K.C., Cruz A.S., Hortenci M.F., Barbieri M.T., Monteiro M.M., Barbosa H.A., Carvalhanas T.R. Evolutionary pattern of reemerging influenza B/Victoria lineage viruses in São Paulo, Brazil, 1996-2012: Implications for vaccine composition strategy // *J Med Virol.* -2013 -Vol. 85(11). -P. 1983-9
132. Pappas C, Viswanathan K, Chandrasekaran A, Raman R, Katz JM, Sasisekharan R, Tumpey TM. Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957 // *PLoS One* – 2010 - 5(6):e11158
133. Paragas J, Talon J, O'Neill RE, Anderson DK, Garcia-Sastre A, Palese P. Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities // *J. Virol.* – 2001 - 75(16) – P. 7375–7383.
134. Paterson RG, Takeda M, Ohigashi Y, Pinto LH, Lamb RA. Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface // *Virology* – 2003 - 306(1) – P. 7–17.
135. Peacock T, Reddy K, James J, Adamiak B, Barclay W, Shelton H, Iqbal M. Antigenic mapping of an H9N2 avian influenza virus reveals two

- discrete antigenic sites and a novel mechanism of immune escape // *Sci Rep.* - 2016 - 6:18745. doi: 10.1038/srep18745.
136. Pechirra P., B. Nunes, A. Coelho, C. Ribeiro, P. Goncalves, S. Pedro, L.C. Castro, H. Rebelo-de-Andrade. Molecular characterization of the HA gene of influenza type B viruses // *J. Med. Virol.* – 2005 - 77 (4) – P. 541-549.
137. Piralla A., Lunghi G., Ruggiero L., Girello A., Bianchini S., Rovida F., Caimmi S., Marseglia G., Principi N., Baldanti F., Esposito S. Molecular epidemiology of influenza B virus among hospitalized pediatric patients in Northern Italy during the 2015-16 season // *PLoS ONE.*- 2017.- Vol. 12(10): e0185893.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185893>
138. Powell ML, Napthine S, Jackson RJ, Brierley I, Brown TD. Characterization of the termination–reinitiation strategy employed in the expression of influenza B virus BM2 protein // *RNA* – 2008 - 14(11) – P. 2394–2406.
139. Ran Z., Shen H., Lang Y., Kolb E.A., Turan N., Zhu L., Ma J., Bawa B., Liu Q., Liu H., Quast M., Sexton G., Krammer F., Hause B.M., Christopher-Hennings J., Nelson E.A., Richt J., Li F., Ma W. Domestic pigs are susceptible to infection with influenza B viruses // *J. Virol.* - 2015.- Vol. 89(9). - P. 4818-26.
140. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season // *Wkly Epidemiol Rec.* - 2014 - 89(10) - P. 93-104.
141. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016–2017 northern hemisphere influenza season // *Wkly Epidemiol Rec.* - 2016 - 91(10) - P. 121-32.
142. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017–2018 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec.* - 2017 - 92(11) – P. 117-28

143. Reich S, Guilligay D, Pflug A et al. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase // *Nature* – 2014 - 516(7531) – P. 361–366.
144. Retamal M, Abed Y, Corbeil J, Boivin G. Epitope mapping of the 2009 pandemic and the A/Brisbane/59/2007 seasonal (H1N1) influenza virus haemagglutinins using mAbs and escape mutants // *J Gen Virol.* – 2014 - 95(Pt 11) – P. 2377-89. doi: 10.1099/vir.0.067819-0.
145. Retamal M, Abed Y, Rhéaume C, Baz M, Boivin G. In vitro and in vivo evidence of a potential A(H1N1)pdm09 antigenic drift mediated by escape mutations in the haemagglutinin Sa antigenic site // *J Gen Virol.* - 2017 - 98(6) – P. 1224-1231. doi: 10.1099/jgv.0.000800.
146. Rivera, K., H. Thomas, H. Zhang, P. Bossart-Whitaker, X. Wei, and G. M. Air. Probing the structure of influenza B hemagglutinin using sitedirected mutagenesis // *Virology* – 1995 - 206 – P. 787–795.
147. Robertson JS, Bootman JS, Nicolson C, Major D, Robertson EW, Wood JM. The hemagglutinin of influenza B virus present in clinical material is a single species identical to that of mammalian cell-grown virus // *Virology* - 1990 – 179 – P. 35–40.
148. Robertson JS, Naeve CW, Webster RG, Bootman JS, Newman R, Schild GC. Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs // *Virology* - 1985 – 143 – P. 166–174.
149. Rockman S, Camuglia S, Vandenberg K, Ong C, Baker MA, Nation RL, Li J, Velkov T. Reverse engineering the antigenic architecture of the haemagglutinin from influenza H5N1 clade 1 and 2.2 viruses with fine epitope mapping using monoclonal antibodies // *Mol Immunol.* – 2013 -53(4) – P. 435-42. doi: 10.1016/j.molimm.2012.10.001
150. Rota PA, Hemphill ML, Whistler T, Regnery HL, Kendal AP. Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent cocirculating strains of influenza B virus // *J Gen Virol.* – 1992 – 73 – P. 2737–2742.

151. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 // *Virology* – 1990 - 175(1) – P. 59–68. PMID: 2309452
152. Roy T, Agrawal AS, Mukherjee A, Mishra AC, Chadha MS, Kaur H, et al. Surveillance and molecular characterization of human influenza B viruses during 2006–2010 revealed co-circulation of Yamagatalike and Victoria-like strains in eastern India // *Infect Genet Evol.* - 2011 - 11(7) – P. 1595–601. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.022> PMID: 21708292
153. Rudneva I, Ignatieva A, Timofeeva T, Shilov A, Kushch A, Masalova O, Klimova R, Bovin N, Mochalova L, Kaverin N. Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: variations in antigenic specificity and receptor affinity of the Hemagglutinin // *Virus Res.* – 2012 - 166(1-2) – P. 61-7. doi: 10.1016/j.virusres.2012.03.003.
154. Saito T., Nakaya Y., Suzuki T., Ito R., Saito H., Takao S., Sahara K., Odagiri T., Murata T., Usui T., Suzuki Y., and Tashiro M. Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation // *J. Med. Virol.* -2004. -Vol. 74.- P. 336–343
155. Sam I-C, I-Ching S, Su YCF, Chan YF, Nor'E SS, Ardalinah H, et al. Evolution of Influenza B Virus in Kuala Lumpur, Malaysia, between 1995 and 2008 // *J Virol.* – 2015 - 89(18) – P. 9689–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00708-15> PMID: 26136576
156. Schmeisser F, Friedman R, Besho J, Lugovtsev V, Soto J, Wang W, Weiss C, Williams O, Xie H, Ye Z, Weir JP. Neutralizing and protective epitopes of the 2009 pandemic influenza H1N1 hemagglutinin // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2013 - 7(3) – P.480-90. doi: 10.1111/irv.12029
157. Schmeisser F, Vasudevan A, Verma S, Wang W, Alvarado E, Weiss C, Atukorale V, Meseda C, Weir JP. Antibodies to antigenic site A of influenza H7 hemagglutinin provide protection against H7N9 challenge // *PLoS One.* – 2015 - 10(1):e0117108. doi: 10.1371/journal.pone.0117108. eCollection 2015.

158. Seleka M, TreurnichtFK, Tempia S, Hellferscee O, Mtshali S, Cohen AL, et al. Epidemiology of influenza B/Yamagata and B/Victoria lineages in South Africa, 2005-2014 // PLoS ONE – 2017 - 12(5):e0177655.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177655>
159. Sharabi S, Bassal R, Friedman N, Drori Y, Alter H, Glatman-Freedman A, Hindiyeh M, Cohen D, Mendelson E, Shohat T, Mandelboim M. Forty five percent of the Israeli population were infected with the influenza B Victoria virus during the winter season 2015–16 // *Oncotarget* – 2018 - Vol. 9, (No. 5) – P. 6623-6629
160. Shaw MW, Xu X, Li Y, Normand S, Ueki RT, Kunimoto GY, Hall H, Klimov A, Cox NJ, Subbarao K. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons // *Virology* – 2002 – 303- P. 1–8.
161. Shen J., Kirk B.D., Ma J., Wang Q. Diversifying Selective Pressure on Influenza B virus HA // *J. of Med. Virol.* – 2009. – V.81.№1. – P.114-124
162. Sherry L, Smith M, Davidson S, Jackson D. The N terminus of the influenza B virus nucleoprotein is essential for virus viability, nuclear localization, and optimal transcription and replication of the viral genome // *J. Virol.* – 2014 - 88(21) – P. 12326–12338.
163. Shi M, Jagger BW, Wise HM, Digard P, Holmes EC, Taubenberger JK. Evolutionary conservation of the PA-X open reading frame in segment 3 of influenza A virus // *J. Virol.* – 2012 - 86(22) – P. 12411–12413.
164. Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza HA. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000 – 69- P. 531-569. DOI:10.1146/annurev.biochem.69.1.531
165. Sočan M, Prosenc K, Učakar V, Berginc N. A comparison of the demographic and clinical characteristics of laboratory-confirmed influenza B Yamagata and Victoria lineage infection // *Journal of Clinical Virology* - 2014 – 61 – P. 156–160. doi: 10.1016/j.jcv.2014.06.018

166. Sridharan H, Zhao C, Krug RM. Species specificity of the NS1 protein of influenza B virus: NS1 binds only human and non-human primate ubiquitin-like ISG15 proteins // *J. Biol. Chem.* – 2010 - 285(11) – P. 7852–7856.
167. Stevens J, Blixt O, Chen LM, Donis RO, Paulson JC, Wilson IA. Recent avian H5N1 viruses exhibit increased propensity for acquiring human receptor specificity // *J. Mol. Biol.* - 2008. – 381 – P. 1382–1394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.016>
168. Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, Wilson IA. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities // *J. Mol. Biol.* - 2006. – 355 – P. 1143–1155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.002>
169. Stray S., Pittman L. Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin // *Virology*. - 2012 - 9:91. doi:10.1186/1743-422X-9-91
170. Sun X, Shi Y, Lu X, He J, Gao F, Yan J, Qi J, Gao GF. Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism // *Cell Rep.* -2013 - 3(3) – P. 769–78
171. Suptawiwat O., Ninpan K., Boonarkart C., Ruangrung K., Auewarakul P. Evolutionary dynamic of antigenic residues on influenza B Hemagglutinin // *Virology.* - 2017.- Vol. 502. – P. 84–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.015>
172. Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses // *Biol. Pharm. Bull.* – 2005 - 28 – P. 399–408. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.28.399>
173. Tan GS, Lee PS, et al. Characterization of a Broadly Neutralizing Monoclonal Antibody That Targets the Fusion Domain of Group 2 Influenza A Virus Hemagglutinin // *J Virol.* – 2014 - 88(23) – P. 13580–13592.

174. Tan GS, Leon PE, et al. Broadly-Reactive Neutralizing and Non-neutralizing Antibodies Directed against the H7 Influenza Virus Hemagglutinin Reveal Divergent Mechanisms of Protection // *PLoS Pathog.* – 2016 - 12(4):e1005578.
175. Tan Y, Guan W, Lam TT-Y, Pan S, Wu S, Zhan Y, Viboud C, Holmes EC, Yang Z. Differing epidemiological dynamics of influenza B virus lineages in Guangzhou, southern China, 2009–2010 // *J Virol.* - 2013 - 87(22) – P. 12447–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.01039-13> PMID: 24027322
176. Tewawong N, Suwannakarn K, Prachayangprecha S, Korkong S, Vichiwattana P, Vongpunsawad S, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analyses of influenza B virus in Thailand during 2010 to 2014 // *PLoS One* – 2015 - 10(1):e0116302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116302> PMID: 25602617
177. Tewawong N., Suntronwong N., Korkong S., Theamboonlers A., Vongpunsawad S., Poovorawan Y. Evidence for influenza B virus lineage shifts and reassortants circulating in Thailand in 2014-2016 // *Infect Genet Evol.* - 2016. - Vol. 47 – P. 35-40. doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.010
178. Thornburg NJ., Zhang H., Bangaru S. et al. H7N9 influenza virus neutralizing antibodies that possess few somatic mutations // *J Clin Invest.* - 2016 - 126(4) – P. 1482–1494. doi:10.1172/JCI85317
179. Todd S, Huong N., Thanh N., Vy N., Hung N, Thao T, Phuong H, van Doorn R, Hang V, Chau N, Read J, Lalloo D, Boni M. Primary care influenza-like illness surveillance in Ho Chi Minh City, Vietnam 2013-2015 // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2018 - doi: 10.1111/irv.12574.
180. Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. A distinct

- lineage of influenza A virus from bats // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2012 - 109(11) – P. 4269–74.
181. Tramuto F., Orsi A., Maida C.M., Costantino C., Trucchi C., Alicino C., Vitale F., Ansaldi F. The Molecular Epidemiology and Evolutionary Dynamics of Influenza B Virus in Two Italian Regions during 2010–2015: The Experience of Sicily and Liguria // *Int J Mol Sci.* - 2016. -Vol. 17(4): 549. doi: 10.3390/ijms17040549
182. Tran E., Podolsky KA, et al. Cryo-electron Microscopy Structures of Chimeric Hemagglutinin Displayed on a Universal Influenza Vaccine Candidate // *mBio.*- 2016 - 7(2):e00257
183. Tsai C.P., Tsai H.J. Influenza B Viruses in Pigs, Taiwan // *Influenza Other Respir Viruses* - 2018 - doi: 10.1111/irv.12588.
184. Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, Matsuzaki Y, Muraki Y, Li ZN, Nakamura K. Antigenic structure of the haemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus // *J Gen Virol.* – 2001 - 82(Pt 10) – P. 2475-84.
185. Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, Glaser L, Solorzano A, Pappas C, Cox NJ, Swayne DE, Palese P, Katz JM, Garcia-Sastre A. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission // *Science.* - 2007. – 315 – P. 655–659
186. Varghese B, Dent E, Chilver M, Cameron S, Stocks N. Epidemiology of viral respiratory infections in Australian working-age adults (20-64 years): 2010-2013 // *Epidemiol Infect.* – 2018 - 146(5) – P. 619-626. doi: 10.1017/S0950268818000286. Epub 2018 Feb 21.
187. Velkov T, Ong C, Baker MA, Kim H, Li J, Nation RL, Huang JX, Cooper MA, Rockman S. The antigenic architecture of the hemagglutinin of influenza H5N1 viruses // *Mol Immunol.* – 2013 - 56(4) – P. 705-19. doi: 10.1016/j.molimm.2013.07.010.
188. Verhoeyen M., Rompuy L., Jou W., Huylebroeck D. Fiers W. Complete nucleotide sequence of the influenza B/Singapore/222/79 virus

- hemagglutinin gene and comparison with the B/Lee/40 hemagglutinin // *Nucleic Acids Research*. -1983.- Vol. 11.№.14. - P. 4703-4712.
189. Verma S, Soto J, Vasudevan A, Schmeisser F, Alvarado-Facundo E, Wang W, et al. Determination of influenza B identity and potency in quadrivalent inactivated influenza vaccines using lineage-specific monoclonal antibodies // *PLoS ONE* – 2017 - 12(4): e0175733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175733>
190. Vijaykrishna D, Holmes EC, Joseph U, Fourment M, Su YCF, Halpin R, et al. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses // *Elife* – 2015 - 4:e05055. <https://doi.org/10.7554/eLife.05055> PMID: 25594904
191. Viswanathan K, Koh X, Chandrasekaran A, Pappas C, Raman R, Srinivasan A, Shriver Z, Tumpey TM, Sasisekharan R. Determinants of glycan receptor specificity of H2N2 influenza A virus Hemagglutinin // *PLoS One* – 2010 - 5(10), e13768. doi: 10.1371/journal.pone.0013768.
192. Wakai C, Iwama M, Mizumoto K, Nagata K. Recognition of cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than recognition by influenza A virus polymerase // *J. Virol.* - 2011 - 85(15) – P. 7504–7512.
193. Walther T, Karamanska R, Chan RW, Chan MC, Jia N, Air G, Hopton C, Wong MP, Dell A, Malik Peiris JS, Haslam SM, Nicholls JM. Glycomic analysis of human respiratory tract tissues and correlation with influenza virus infection // *PLOS Pathogens*. – 2013 - 9:e1003223. doi: 10.1371/journal.ppat.1003223.
194. Wan Z, Ye J, Xu L, Shao H, Jin W, Qian K, Wan H, Qin A. Antigenic mapping of the hemagglutinin of an H9N2 avian influenza virus reveals novel critical amino acid positions in antigenic sites // *J Virol.* - 2014 -88(7) – P. 3898-901. doi: 10.1128/JVI.03440-13
195. Wang Q, Tian X, Chen X, Ma J. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2007. - Vol. 104. - P. 16874–16879

196. Wang Q., Cheng F., Lu M., Tian X., Ma J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin // *J. Virol.* -2008. -Vol. 82. - P.3011–3020.
197. Wang TT, Tan GS, et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2010 - 107(44) – P. 18979–18984.
198. Wang Y.F., Chang C.F., Chi C.Y., Wang H.C., Wang J.R., Su I.J. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features // *J. Med. Virol.* -2012. -Vol. 84(4). -P. 679-85. doi: 10.1002/jmv.23219
199. Wanitchang A, Narkpuk J, Jongkaewwattana A. Nuclear import of influenza B virus nucleoprotein: involvement of an N-terminal nuclear localization signal and a cleavage-protection motif // *Virology* – 2013 - 443(1) – P. 59–68.
200. Watanabe S, Imai M, Ohara Y, Odagiri T. Influenza B virus BM2 protein is transported through the trans-Golgi Network as an integral membrane protein // *J. Virol.* – 2003 - 77(19) – P. 10630–10637.
201. Webster, R. G., and Berton M. T. Analysis of antigenic drift in the haemagglutinin molecule of influenza B virus with monoclonal antibodies // *J. Gen. Virol.* -1981. -Vol. 54. - P. 243–251
202. Wiley D. C., Wilson I. A, Skehel J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation // *Nature.* -1981. -Vol. 289. - P. 373–378
203. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. // *Annu Rev Biochem.* – 1987 – 56 – P. 365-94.DOI:10.1146/annurev.bi.56.070187.002053
204. Williams MA, Lamb RA. Effect of mutations and deletions in a bicistronic mRNA on the synthesis of influenza B virus NB and NA glycoproteins // *J. Virol.* – 1989 - 63(1) – P. 28–35.

205. Williams MA, Lamb RA. Polylactosaminoglycan modification of a small integral membrane glycoprotein, influenza B virus NB // *Mol. Cell. Biol.* – 1988 - 8(3) – P. 1186–1196.
206. Wohlbold TJ, Nachbagauer R, Margine I, Tan GS, Hirsh A, Krammer F. Vaccination with soluble headless hemagglutinin protects mice from challenge with divergent influenza viruses // *Vaccine* – 2015 - 33(29) – P. 3314–3321.
207. Worldwide influenza centre WHO CC for Reference & Research on Influenza the Francis Crick Institute. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2018. -2017. Available at: www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/crick_sh2017_vcm_report_to_post.pdf
208. Xu G, Horiike G, Suzuki T, Miyamoto D, Kumihashi H, Suzuki Y. A novel strain, B/Gifu/2/73, differs from other influenza B viruses in the receptor binding specificities toward sialo-sugar chain linkage // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1996 – 224 – P. 815–818.
209. Xu G, Suzuki T, Tahara H, Kiso M, Hasegawa A, Suzuki Y. Specificity of sialyl-sugar chain mediated recognition by the hemagglutinin of human influenza B virus isolates // *J Biochem (Tokyo)* – 1994 – 115 – P. 202–207
210. Yang J, Lau YC, Wu P, Feng L, Wang X, Chen T, Ali ST, Peng Z, Fang VJ, Zhang J, He Y, Lau E., Qin Y, Yang J, Zheng J, Jiang H, Yu H, Cowling BJ. Variation in Influenza B Virus Epidemiology by Lineage, China // *Emerg Infect Dis.* – 2018 - 24(8) – P. 1536-1540. doi: 10.3201/eid2408.180063.
211. Yang J-R, Huang Y-P, Chang F-Y, Hsu L-C, Lin Y-C, Huang H-Y, et al. Phylogenetic and evolutionary history of influenza B viruses, which caused a large epidemic in 2011–2012, Taiwan // *PLoS One.* – 2012 -

- 7(10):e47179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047179> PMID: 23071751
212. Yasuhara A, Yamayoshi S, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sakai-Tagawa Y, Uraki R, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Sasaki T, Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y. Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies // *Sci Rep.* – 2017 - 7(1) – P. 17735. doi: 10.1038/s41598-017-17986-8.
213. Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein // *EMBO J.* – 2001 - 20(3) - P. 362–371.
214. Zhang H, Yu H, Wang J et al. The BM2 protein of influenza B virus interacts with p53 and inhibits its transcriptional and apoptotic activities // *Mol. Cell. Biochem.* – 2015 - 403(1–2) – P. 187–197.
215. Zhu X, Yu W, McBride R, Li Y, Chen LM, Donis RO, Tong S, Paulson JC, Wilson IA. Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013 - 110(4) – P. 1458–63.
216. Zhu Y, Yang D, Ren Q, Yang Y, Liu X, Xu X, Liu W, Chen S, Peng D, Liu X. Identification and characterization of a novel antigenic epitope in the hemagglutinin of the escape mutants of H9N2 avian influenza viruses // *Vet Microbiol.* – 2015 - 178(1-2) – P. 144-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.04.012.
217. Zou S., Home J., Weber J.M. Evolution of the Hemagglutinin Gene of Influenza B Virus was Driven by Both Positive and Negative Selection Pressure // *Virus Genes.* – 1997. –14(3) – P.181-185.

Приложение А

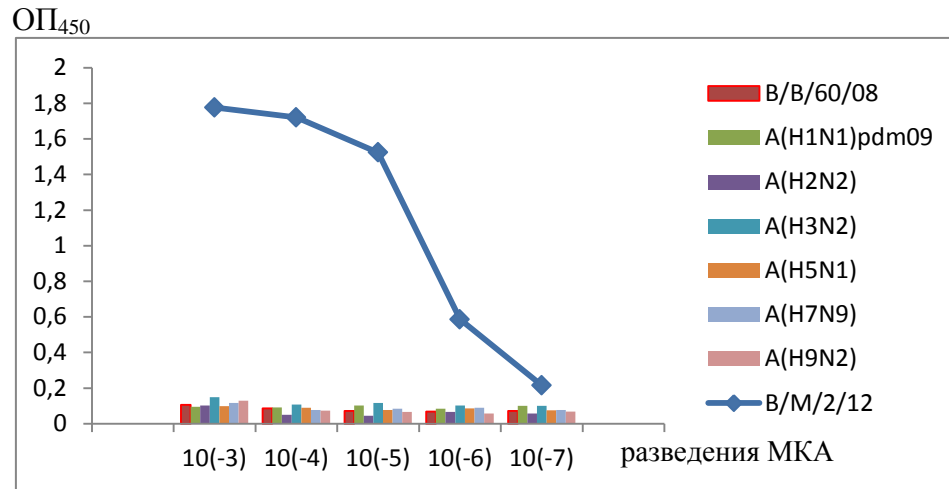


Рисунок 5 - Активность МКА 1G4 в ИФА

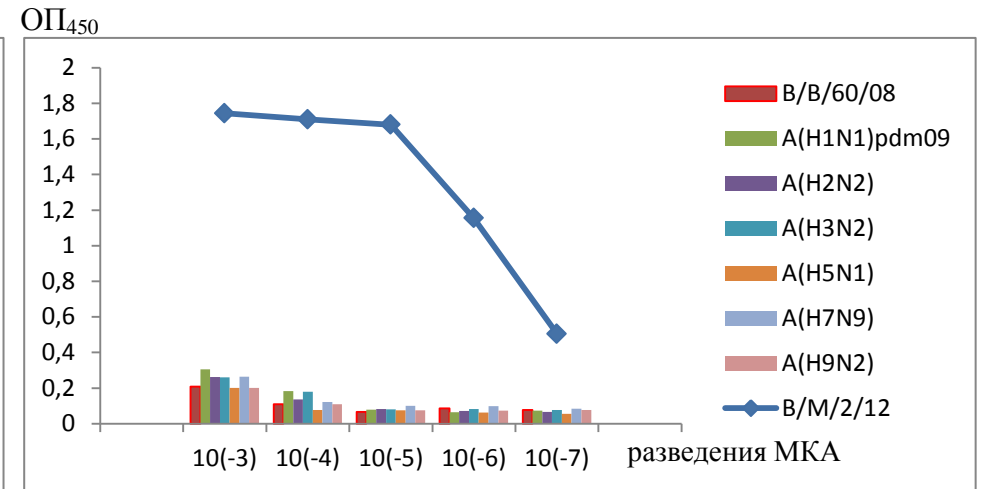


Рисунок 6 - Активность МКА 1G9 в ИФА

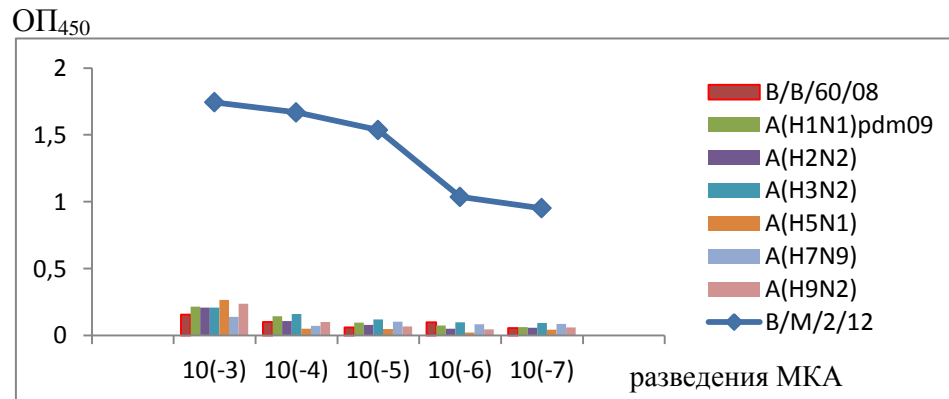


Рисунок 7 - Активность МКА 2B10 в ИФА

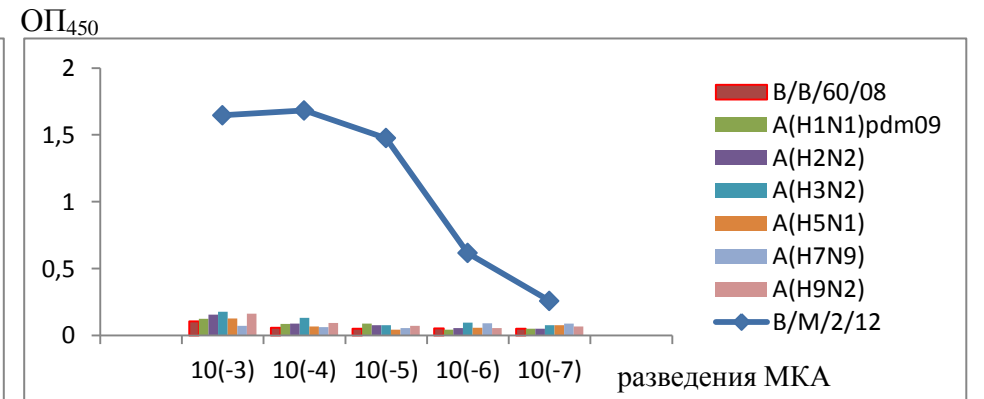


Рисунок 8 - Активность МКА 3B12 в ИФА

Приложение А (продолжение)

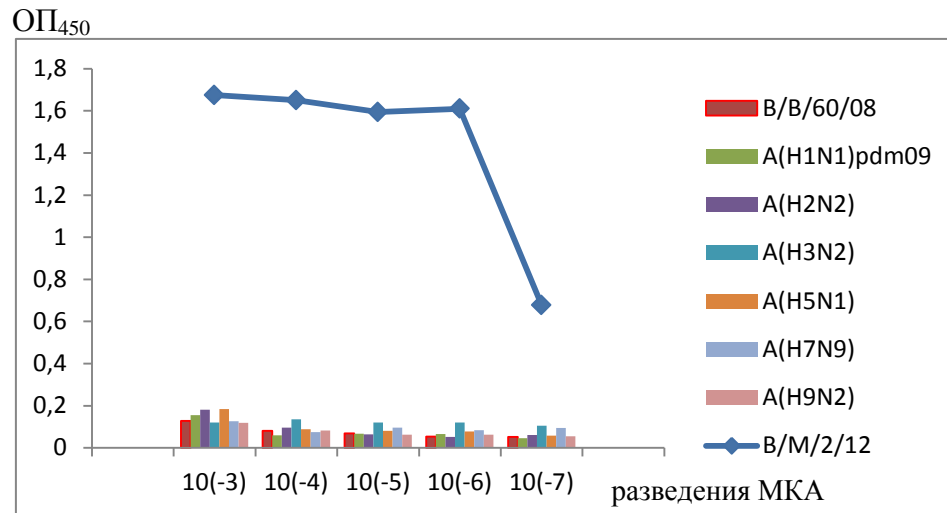


Рисунок 9 - Активность МКА 3С2 в ИФА

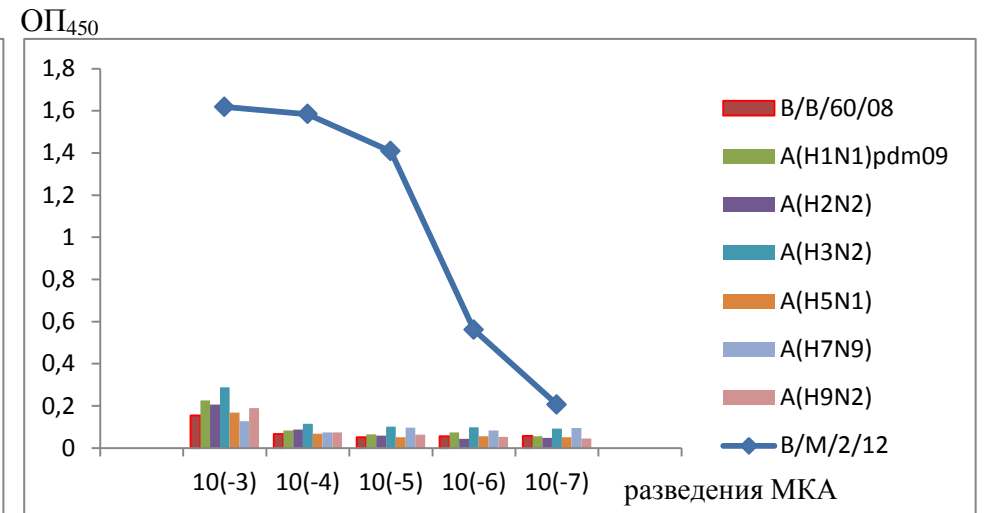


Рисунок 10 - Активность МКА 4Е11 в ИФА

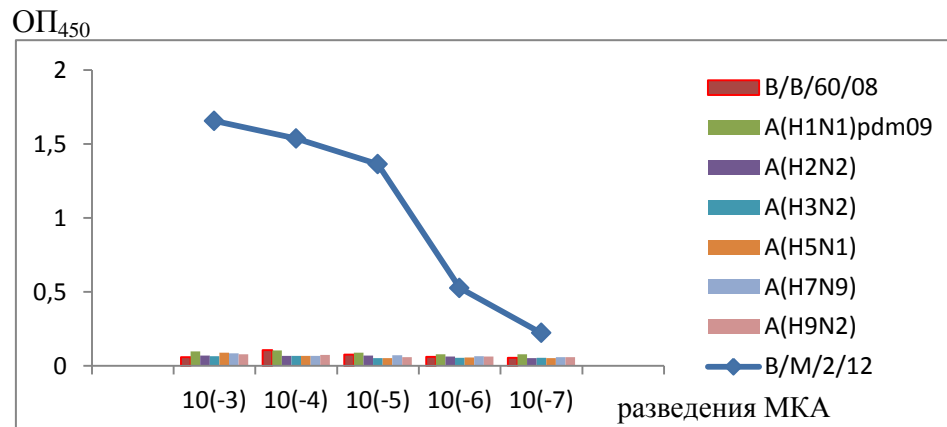


Рисунок 11 - Активность МКА 5В11 в ИФА

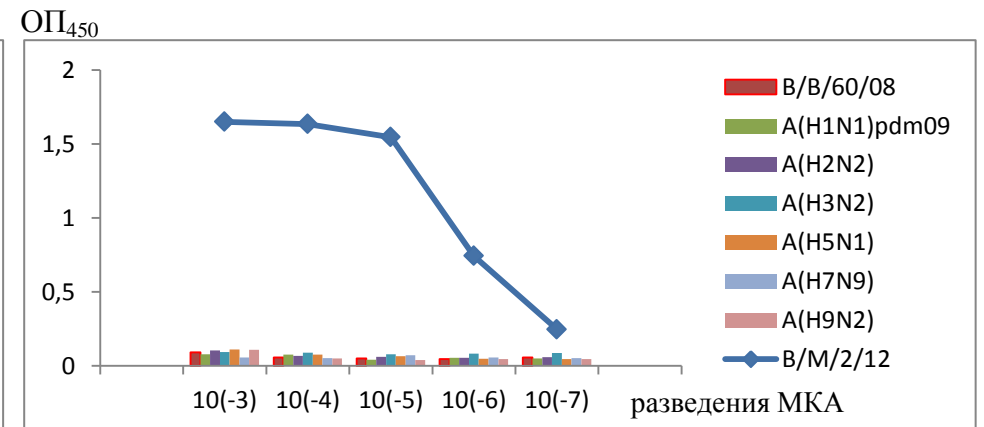


Рисунок 12 - Активность МКА 5F11 в ИФА

Приложение Б

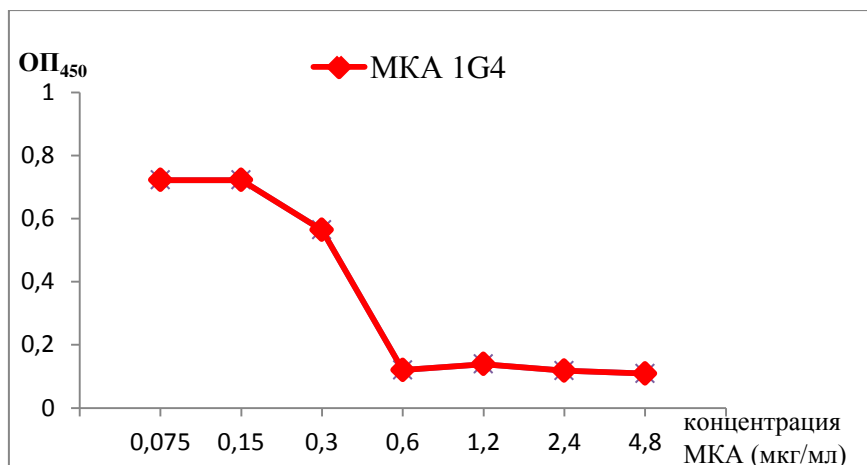


Рисунок 13 - Вируснейтрализующая активность МКА 1G4 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

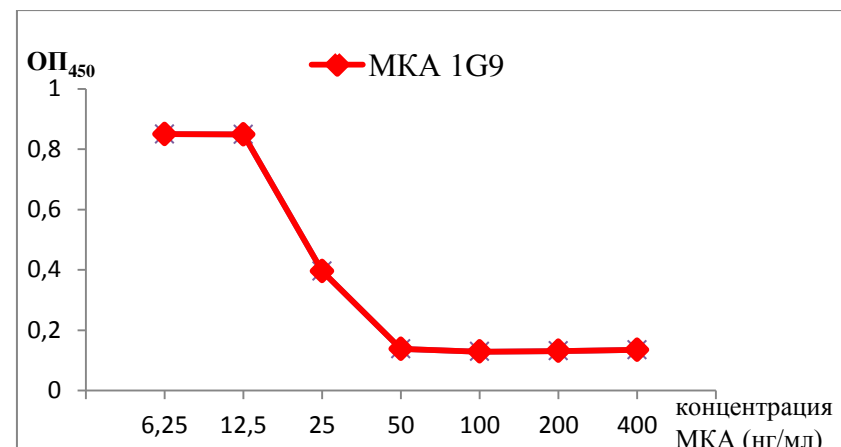


Рисунок 14 - Вируснейтрализующая активность МКА 1G9 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

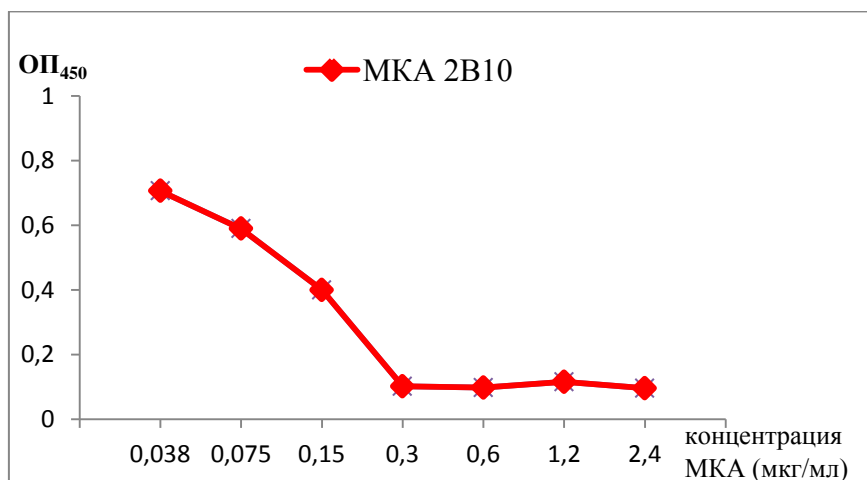


Рисунок 15 - Вируснейтрализующая активность МКА 2B10 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

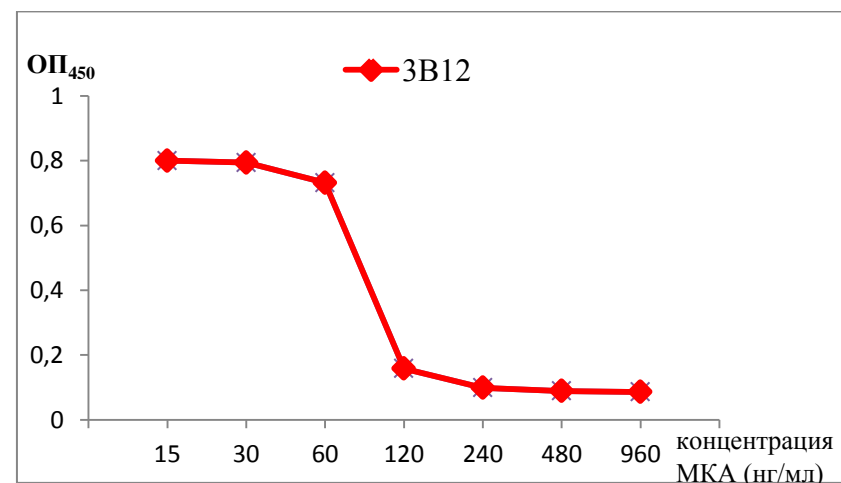


Рисунок 16 - Вируснейтрализующая активность МКА 3B12 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

Приложение Б (продолжение)

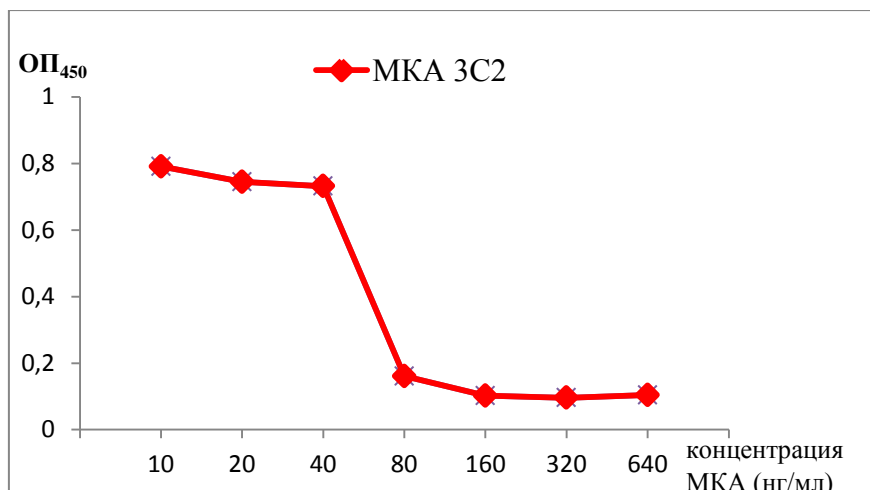


Рисунок 17 - Вируснейтрализующая активность МКА 3С2 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

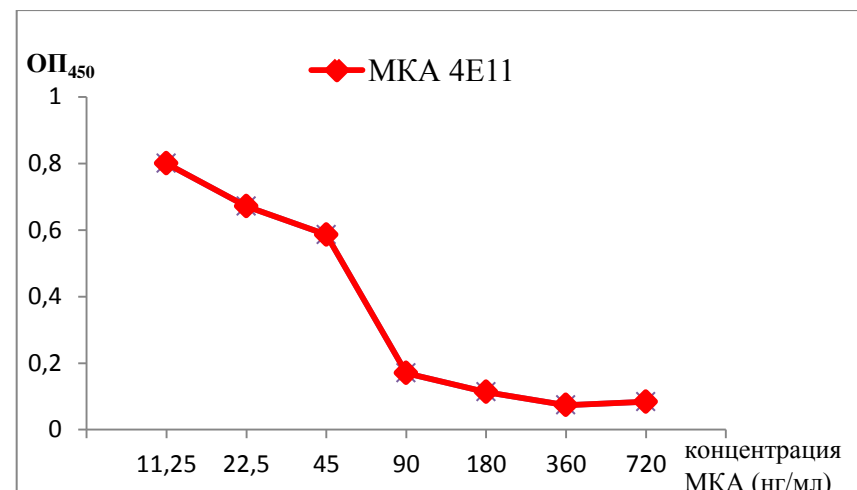


Рисунок 18 - Вируснейтрализующая активность МКА 4Е11 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

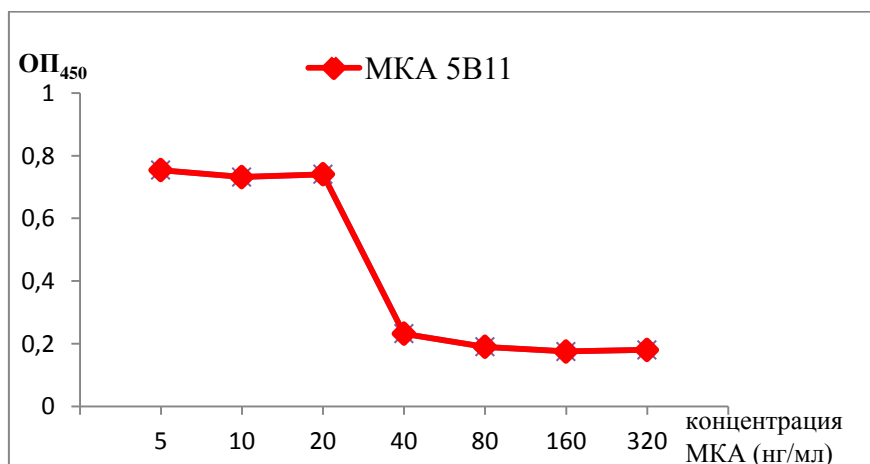


Рисунок 19 - Вируснейтрализующая активность МКА 5В11 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

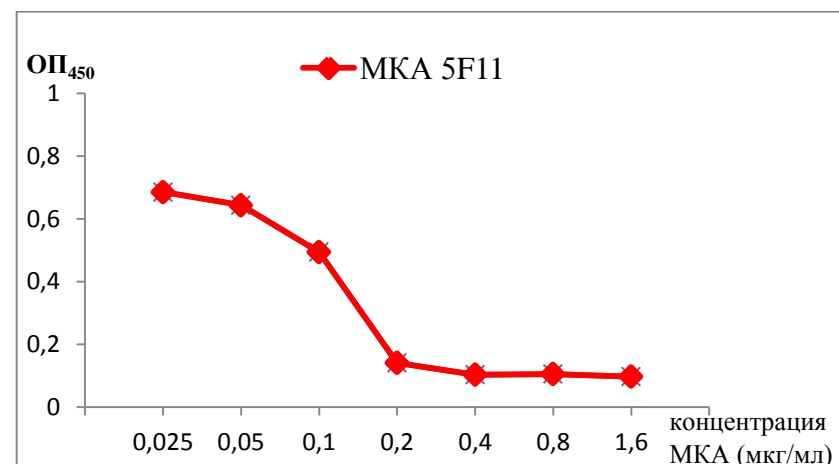


Рисунок 20- Вируснейтрализующая активность МКА 5F11 при взаимодействии с вирусом гриппа В/Массачусетс/2/12

Приложение В

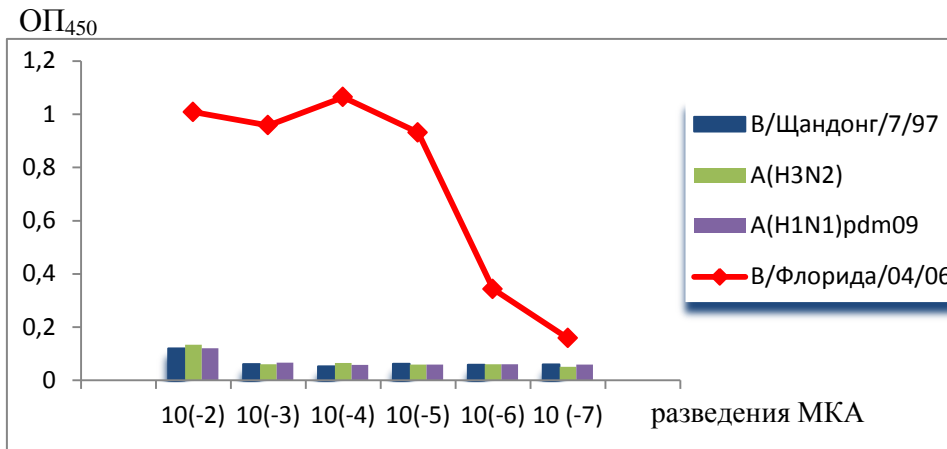


Рис. 21 - Активность МКА 8Н3 в ИФА

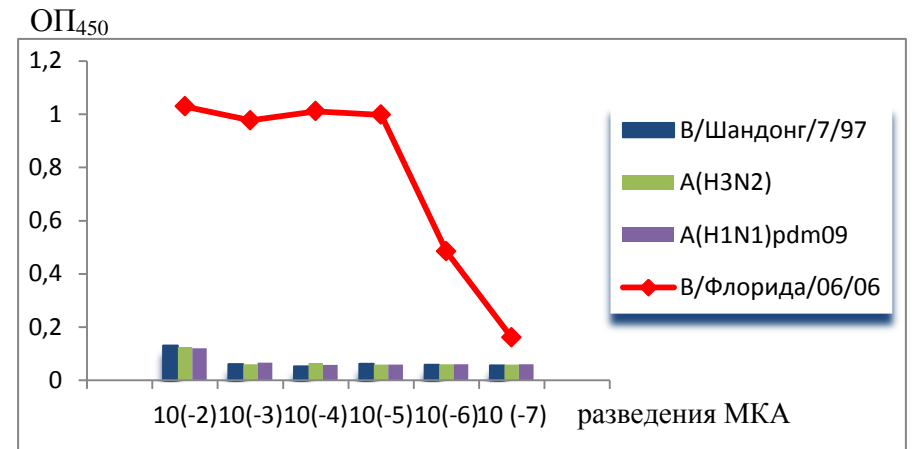


Рис. 22 - Активность МКА 8Н11 в ИФА

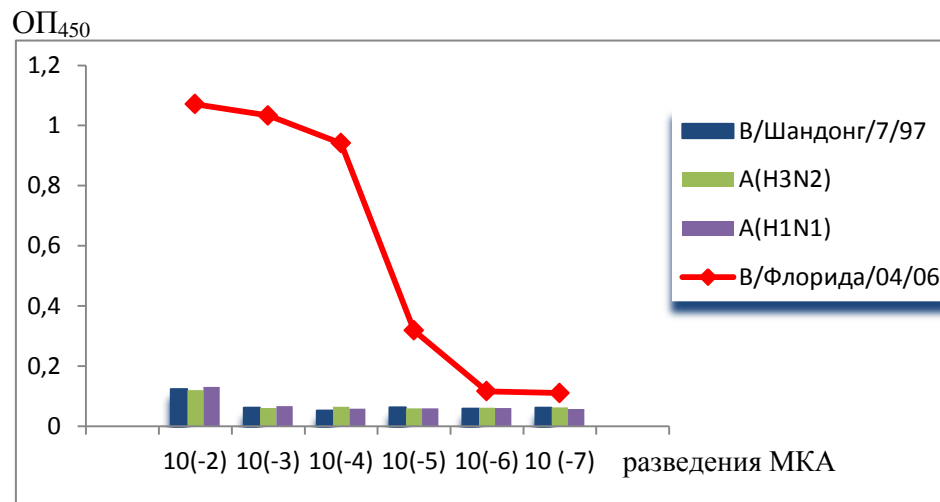


Рис. 23- Активность МКА 9А3 в ИФА

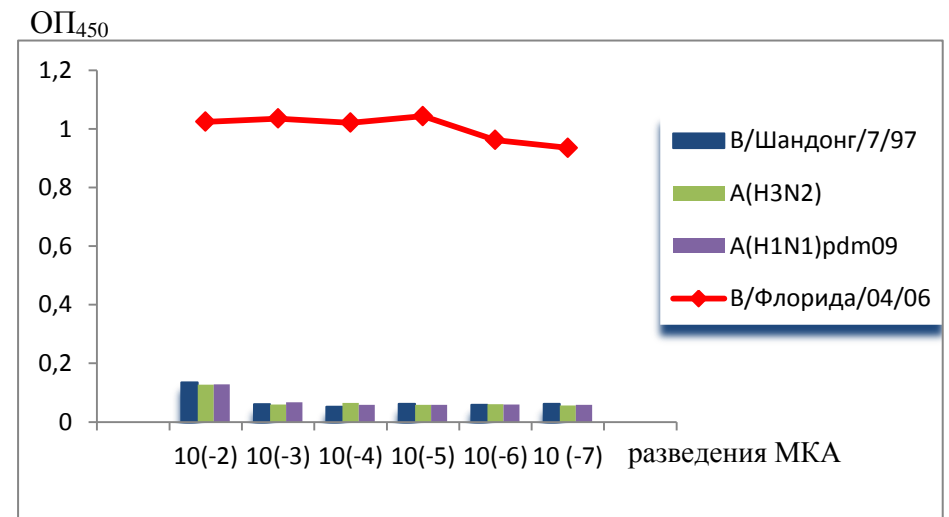


Рис. 24- Активность МКА 10F4 в ИФА

Приложение Г

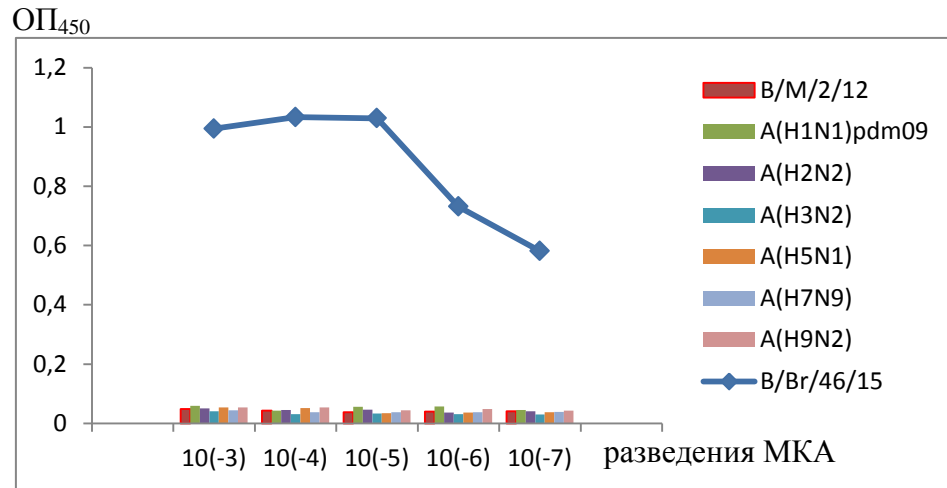


Рисунок 34 – Активность МКА 6А4 в ИФА

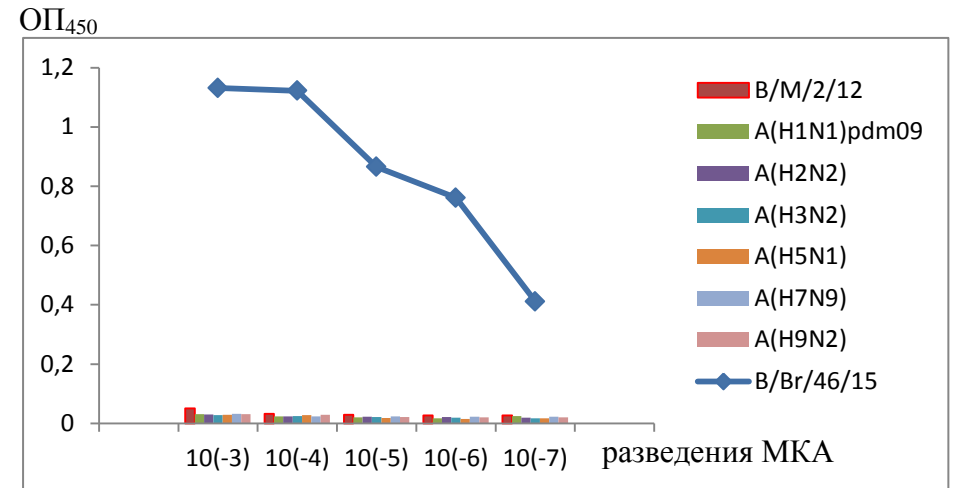


Рисунок 35 – Активность МКА 6А9 в ИФА

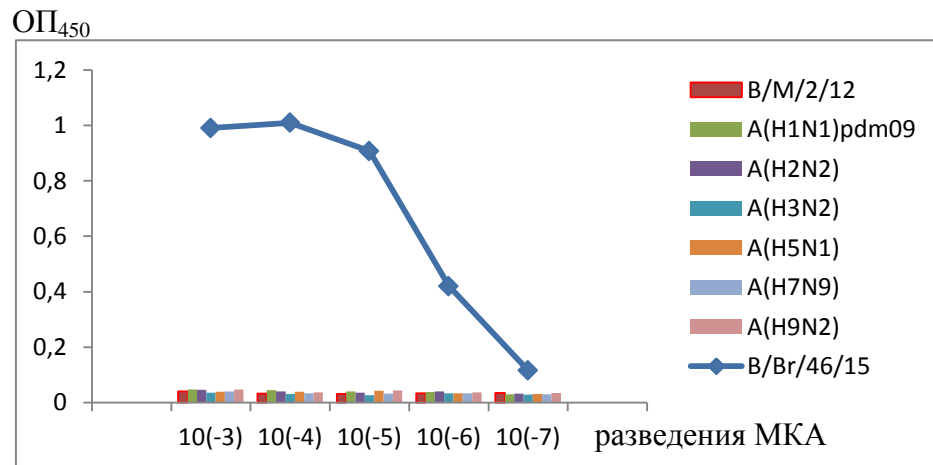


Рисунок 36 – Активность МКА 6Е11 в ИФА

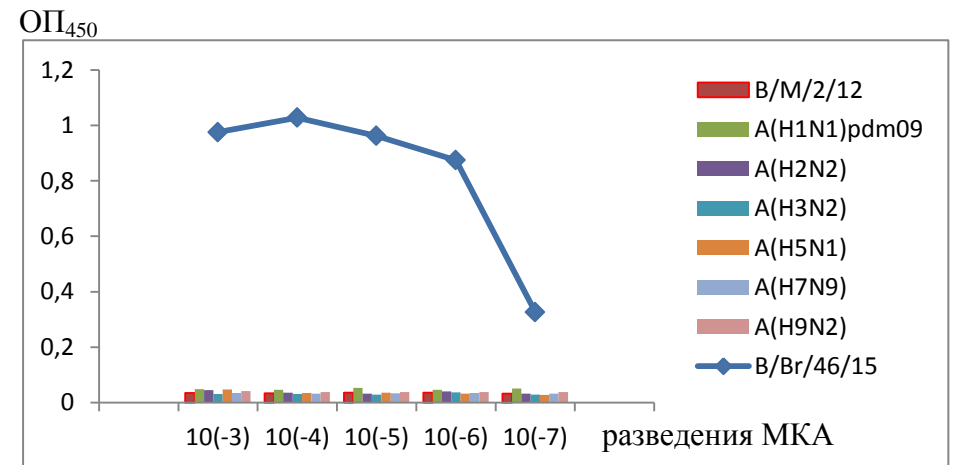


Рисунок 37 – Активность МКА 7С8 в ИФА

Приложение Г (продолжение)

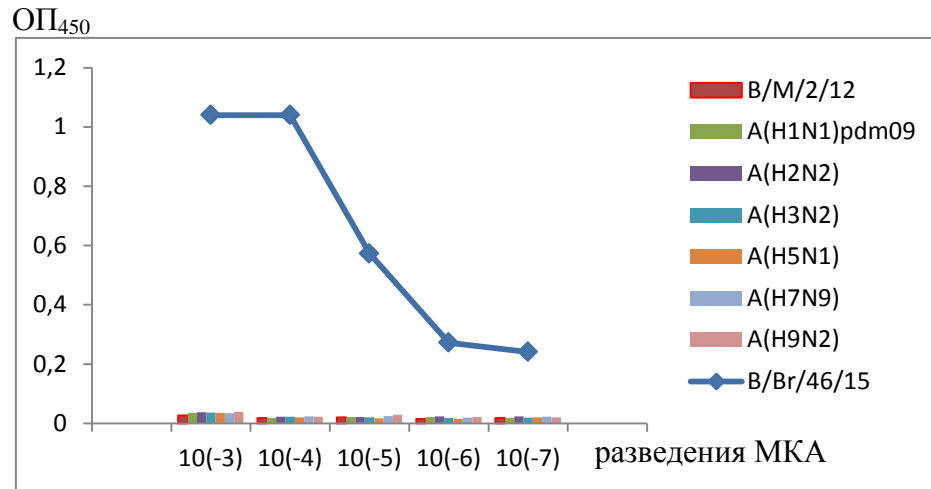


Рисунок 38 – Активность МКА 7D9 в ИФА

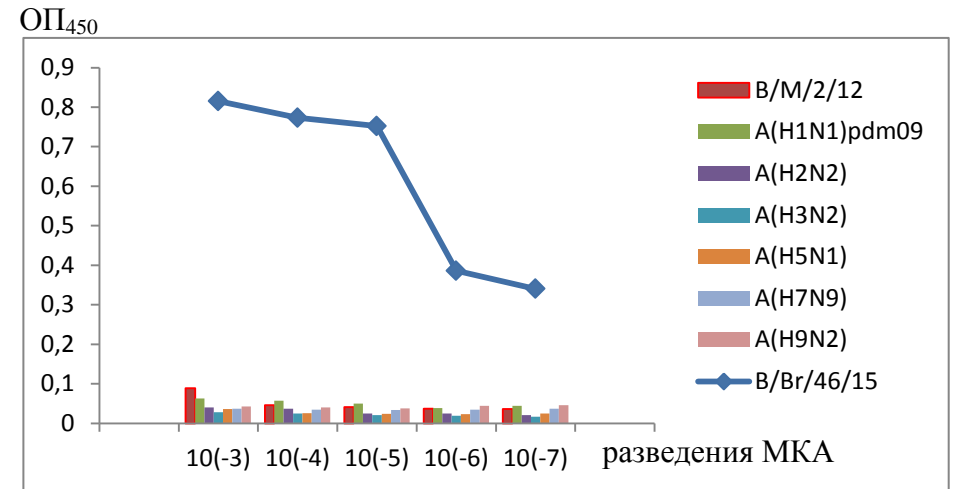


Рисунок 39 – Активность МКА 7G9 в ИФА

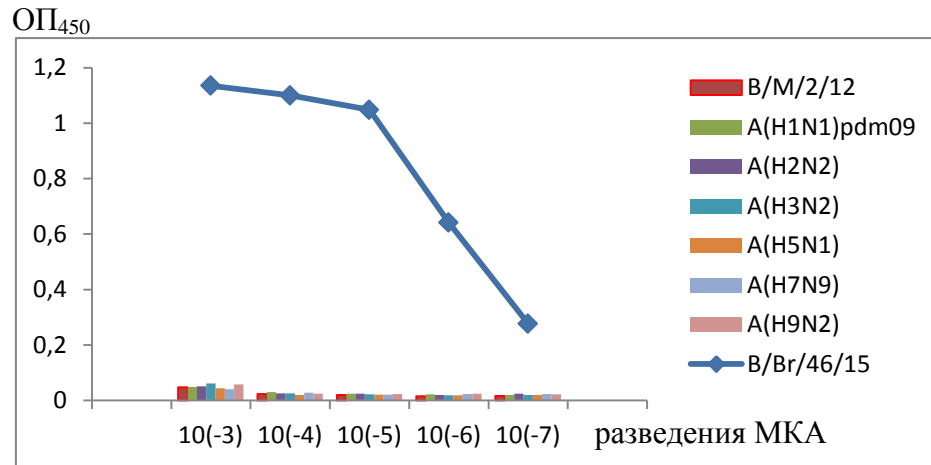


Рисунок 40 – Активность МКА 7H8 в ИФА

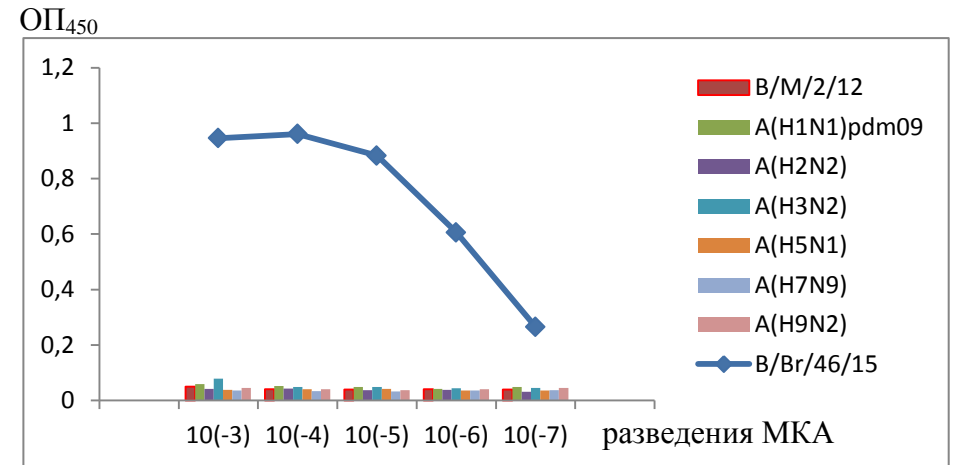


Рисунок 41 – Активность МКА 8A8 в ИФА

Приложение Г (продолжение)

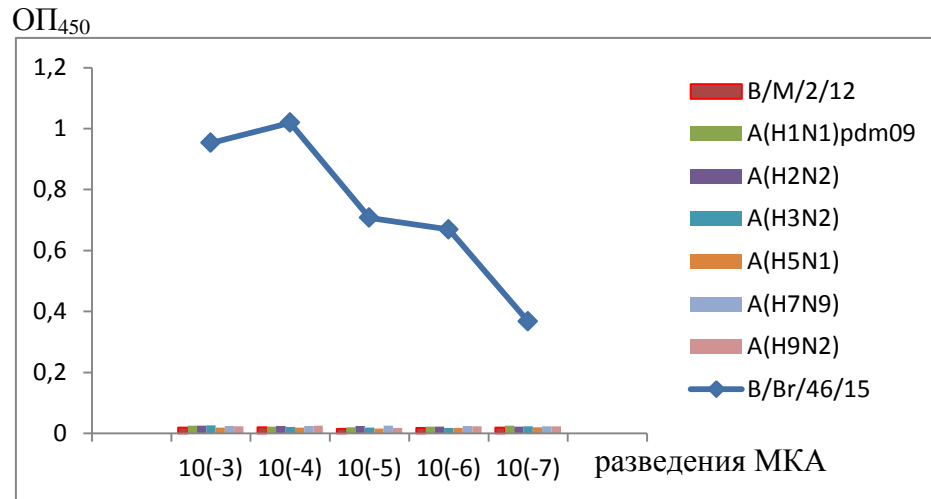


Рисунок 42 – Активность МКА 9В5 в ИФА

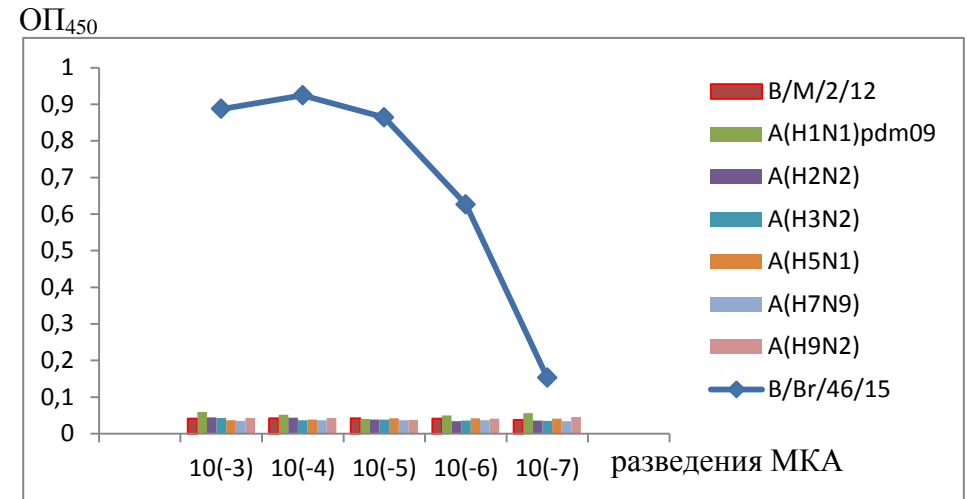


Рисунок 43 – Активность МКА 9G5 в ИФА

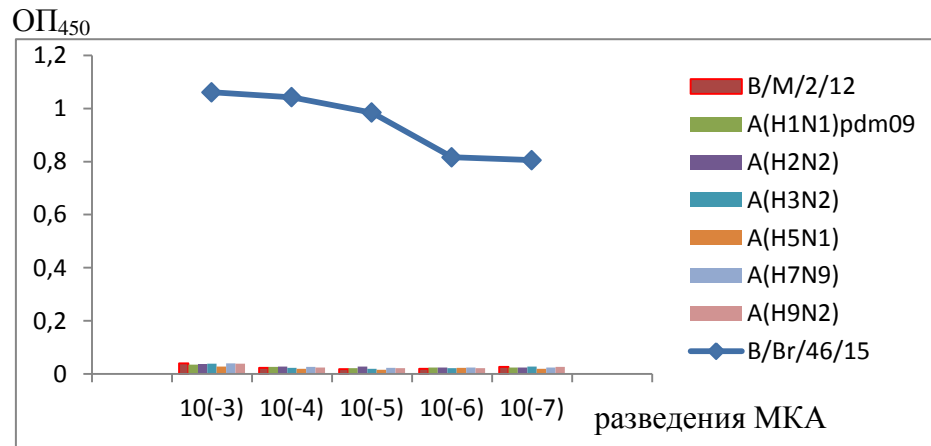


Рисунок 44 – Активность МКА 10В6 в ИФА

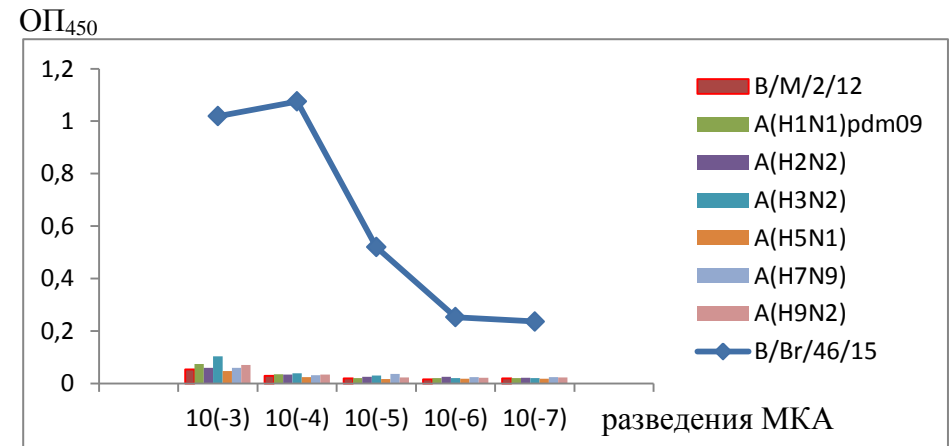


Рисунок 45 – Активность МКА 10D3 в ИФА

Приложение Г (продолжение)

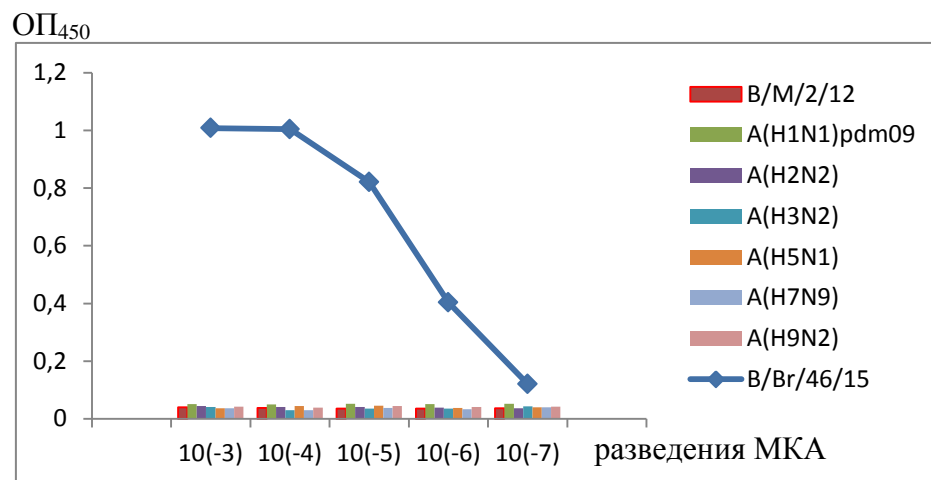


Рисунок 46 – Активность МКА 10D9 в ИФА

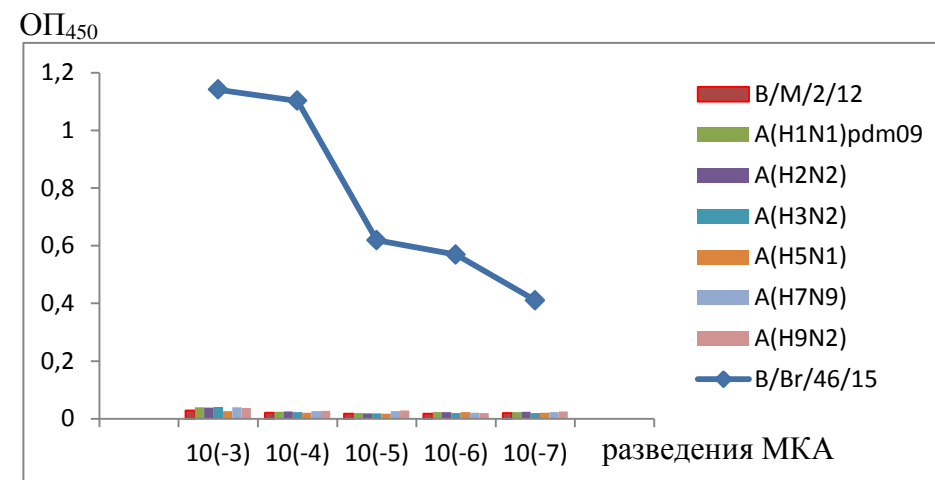


Рисунок 47 – Активность МКА 10F1 в ИФА

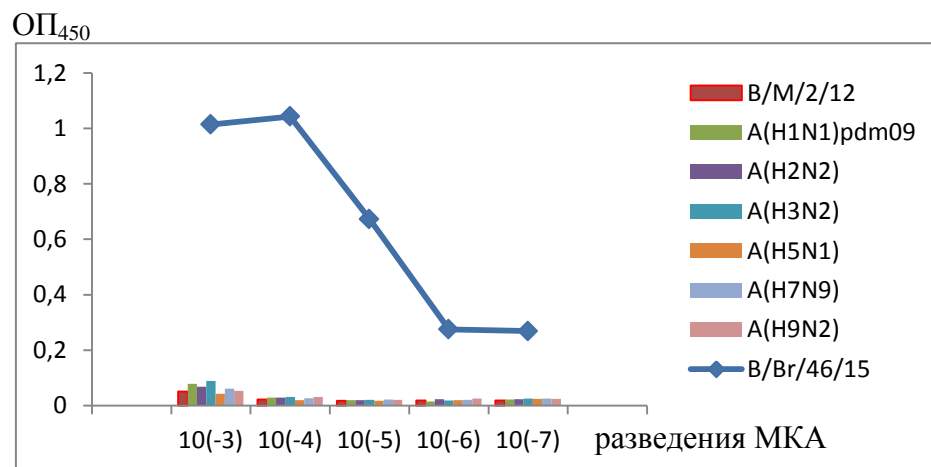


Рисунок 48 – Активность МКА 11G2 в ИФА

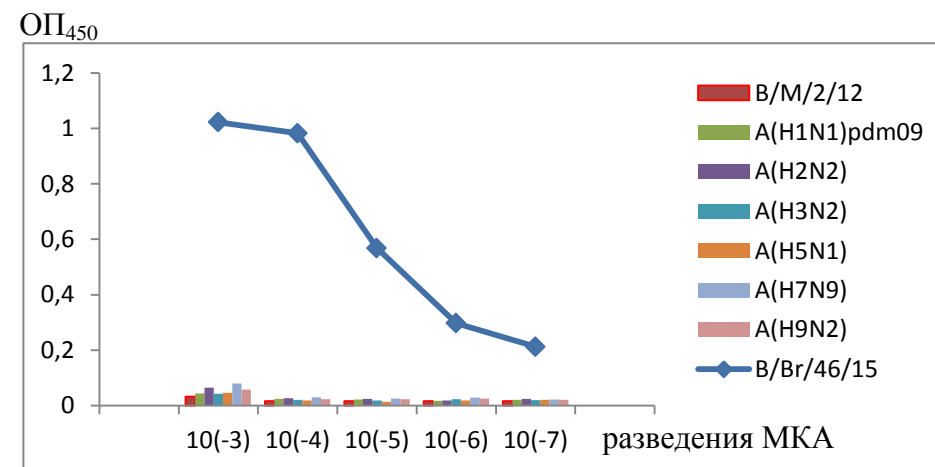


Рисунок 49 – Активность МКА 11G10 в ИФА

Приложение Д

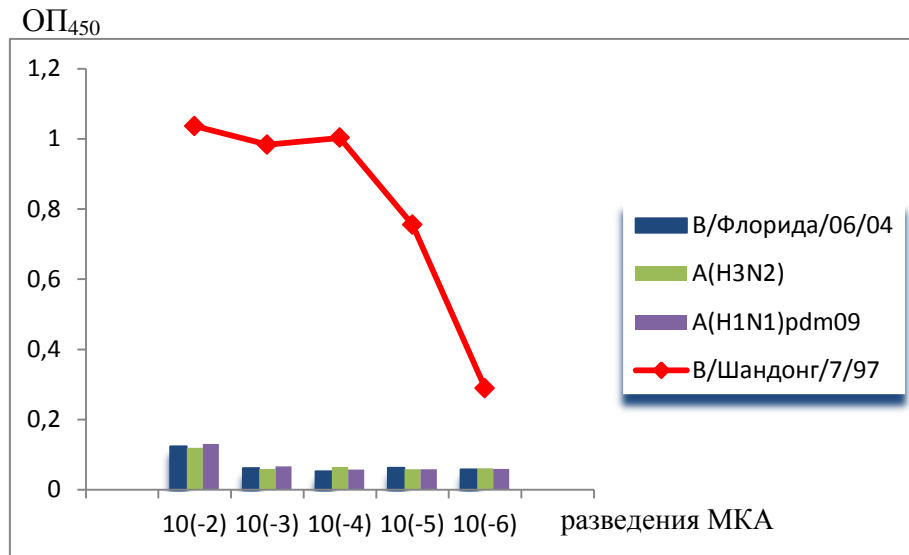


Рис. 50- Активность МКА В/4Н1 в ИФА

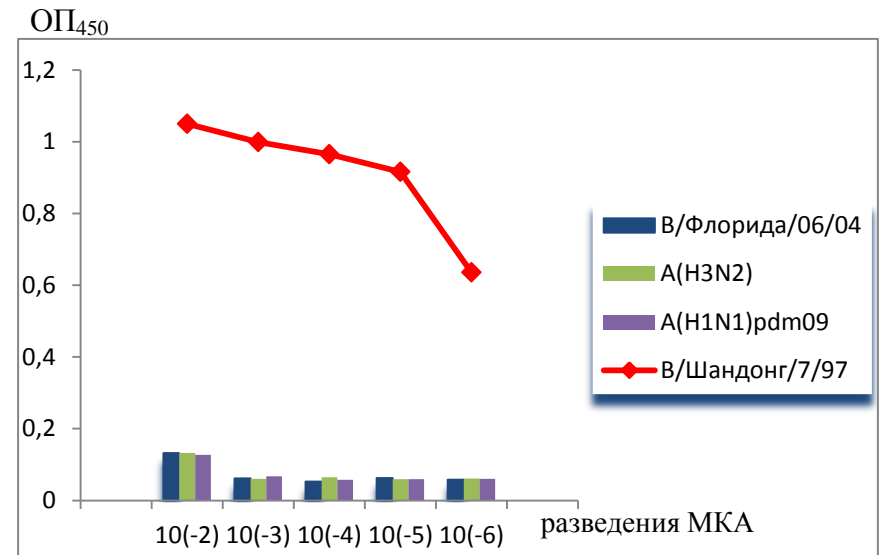


Рис. 51- Активность МКА 5В7 в ИФА

Приложение Д (продолжение)

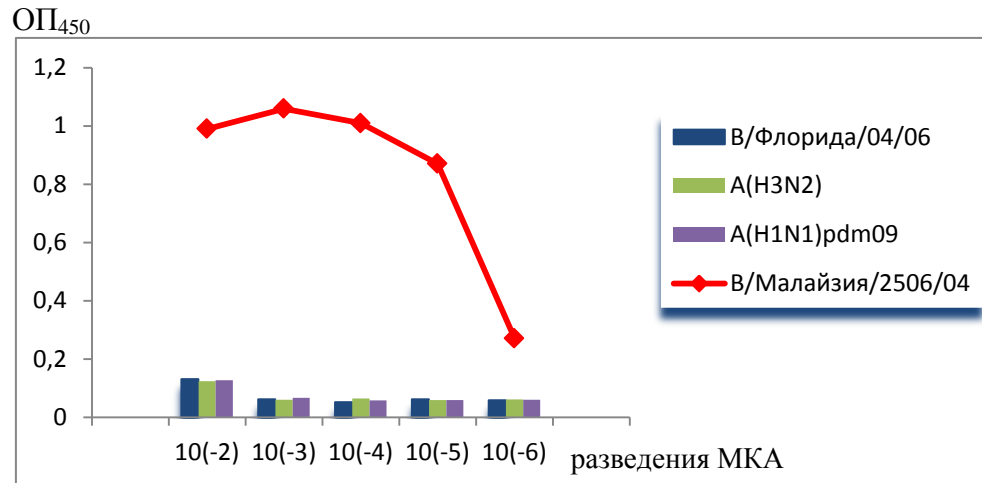


Рис. 52- Активность МКА 9С1 в ИФА

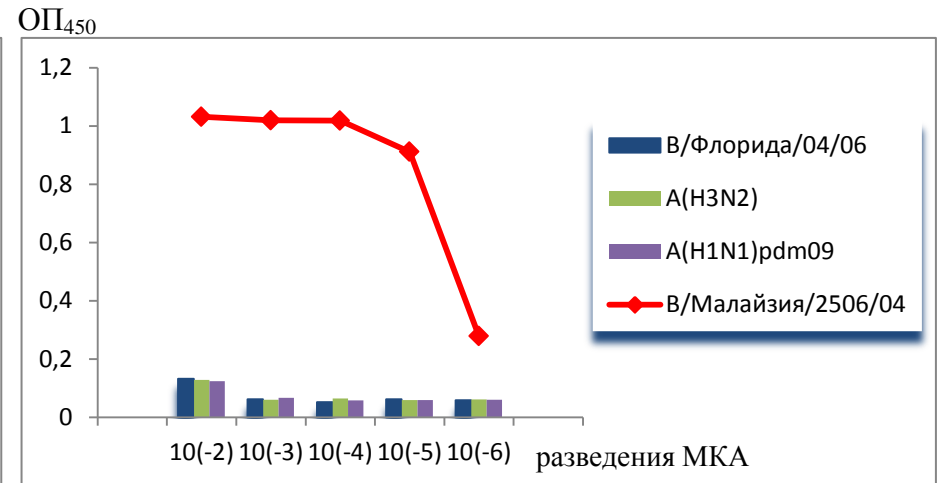


Рис. 53-Активность МКА 9F1 в ИФА

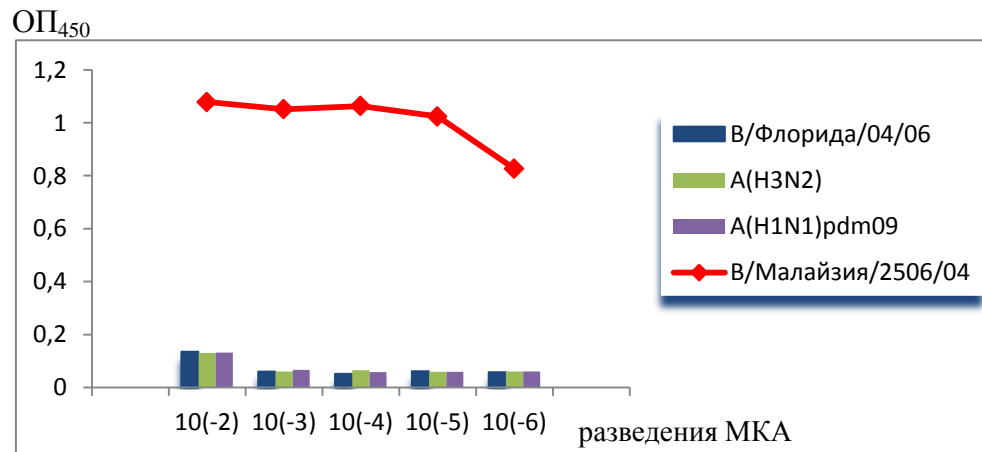


Рис. 54-Активность МКА 11F8 в ИФА