

ИНДУКЦИЯ ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОНСЕРВАТИВНЫМИ ЛИНЕЙНЫМИ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЭПИТОПАМИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А

И.А. Сычев¹, П.М. Копейкин¹, Е.В. Цветкова^{1,2}, К.В. Чередова¹, Б.Л. Мильман¹,
О.В. Шамова¹, И.Н. Исакова-Сивак¹, Ю.А. Дешева^{1,2}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. Грипп входит в число широко распространенных инфекций, ежегодно наносящих значительный ущерб здоровью населения и экономике страны. Наиболее эффективным способом борьбы с гриппом и его осложнениями является вакцинопрофилактика. Существуют разнообразные вакцины против гриппа, однако все они имеют общие недостатки, к которым относятся узкая специфичность, необходимость ежегодного обновления штаммового состава, не всегда удовлетворительная иммуногенность, а следовательно, и эффективность. В связи с этим пристальное внимание уделяется проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Антитела против нейраминидазы (NA) способны обеспечивать гетеросубтипическую защиту, что важно ввиду потенциальной угрозы со стороны вирусов гриппа, имеющих иные гемагглютинин и нейраминидазу по сравнению с вирусами, циркулирующими в настоящее время. Данное исследование посвящено поиску новых и анализу ранее предсказанных линейных В-клеточных эпитопов NA, консервативных для всех подтипов вируса гриппа А. **Результаты.** Было обнаружено 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг активного центра нейраминидазы, три из которых (MNPNQKIIIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP) были синтезированы *de novo*, конъюгированы с бычьим сывороточным альбумином и далее использованы для иммунизации мышей. С помощью иммуноферментного анализа в сыворотках иммунизированных мышей выявлялись специфические IgG антитела к различным вирусам гриппа А, содержащим NA подтипов N1, N2, N3 и N9. Иммунизация NA-пептидами не защитила мышей от существенной потери веса после инфицирования летальным вирусом гриппа H1N1. Тем не менее все иммунизированные мыши выжили в течение периода наблюдения, тогда как в контрольной группе выживаемость составила только 28,6%. Анализ вирусной нагрузки в легких мышей, зараженных вирусом H1N1, не выявил различий в титрах ни на 4-е, ни на 8-е сутки после заражения. В то же время защитный эффект отсутствовал при заражении мышей летальным вирусом гриппа H7N9: уровень летальности, потеря веса и титры вируса в легких были сопоставимы у иммунизированных и контрольных мышей. **Заключение.** Полученные в настоящем исследовании данные показали наличие кросс-реактивности у анти-NA антител, индуцируемых при иммунизации NA-пептидами, а также защитной эффективности в отношении инфекции,

Адрес для переписки:

Сычев Иван Александрович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 904 638-04-18 (моб.).
E-mail: sychev.ia@iemspb.ru

Contacts:

Ivan A. Sychev
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12,
Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 904 638-04-18 (mobile).
E-mail: sychev.ia@iemspb.ru

Для цитирования:

Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Чередова К.В., Мильман Б.Л., Шамова О.В., Исакова-Сивак И.Н., Дешева Ю.А. Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 463–472.
doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1343

Citation:

Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Milman B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Y.A. Induction of cross-reactive antibodies in mice immunized with conserved influenza A virus neuraminidase-derived linear B-cell epitopes // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 463–472.
doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1343

вызванной вирусом H1N1, но не вирусом H7N9. Эти результаты указывают на перспективность использования линейных В-клеточных эпитопов NA для дизайна эпитоп-направленных гриппозных вакцин, но при этом требуется более глубокое и полное исследование специфичности консервативных эпитопов NA, а также оптимизация схем иммунизации для достижения более высоких показателей защитной эффективности.

Ключевые слова: вирус гриппа А, иммунный ответ, универсальная гриппозная вакцина, гетеросубтипический иммунный ответ, антинеураминидазные антитела, линейные В-клеточные эпитопы.

INDUCTION OF CROSS-REACTIVE ANTIBODIES IN MICE IMMUNIZED WITH CONSERVED INFLUENZA A VIRUS NEURAMINIDASE-DERIVED LINEAR B-CELL EPITOPES

Sychev I.A.^a, Kopeikin P.M.^a, Tsvetkova E.V.^{a,b}, Cheredova K.V.^a, Milman B.L.^a, Shamova O.V.^a, Isakova-Sivak I.N.^a, Desheva Y.A.^{a,b}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Influenza is a socially significant infection that causes profound damage to populational health and national economy annually. Preventive vaccination is the most effective means to manage influenza and its complications. Diverse influenza vaccines exist, but their common drawback is the narrow specificity, the need for annual renewal of the strain composition, not always satisfactory immunogenicity and effectiveness. In this regard, close attention is paid to developing universal influenza vaccines aimed to induce cross-reactive immune-related cues against most conserved parts of viral proteins. Antibodies against neuraminidase (NA) are able to provide heterosubtypic protection, which is important due to potential threat posed by influenza viruses differed in hemagglutinin and neuraminidase sequence in comparison to currently circulating viruses. The present study is aimed to search for new and analysis of earlier predicted NA linear B-cell epitopes conserved among all influenza A virus subtypes. *Results.* Eight conserved linear B-cell epitopes were identified around the active site of neuraminidase, three of which (MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC, and DNWKGSNRP) were synthesized *de novo*, conjugated with bovine serum albumin to be next used for mouse immunization. IgG antibodies were detected by ELISA in the sera of immunized mice. Antibodies were found to specifically bind to various influenza A viruses containing NA subtypes N1, N2, N3, and N9. Immunization with NA peptides did not protect mice from substantial body weight loss after infection with lethal H1N1 influenza virus. However, all immunized mice survived during the observation period, whereas in the control group the survival rate was as low as 28.6%. Analyzing lung viral load in the mice infected with the H1N1 virus revealed no differences in virus titers on either day 4 or 8 post-infection. Nevertheless, the protective effect lacked after the mice were challenged with lethal H7N9 influenza virus. Mortality rate, body weight loss, and lung virus titers were comparable in immunized and control mice. *Conclusions.* The data obtained evidenced about serum cross-reactive anti-NA antibodies induced by immunization with NA peptides, as well as protective efficacy against infection caused by H1N1 virus, but not H7N9 virus. Such results hold promise and indicate that NA linear B-cell epitopes can be used for designing epitope-directed influenza vaccines, but a deeper and more comprehensive study on the specificity of conserved NA epitopes, as well as optimization of immunization schemes for achieving higher protective efficacy are required.

Key words: influenza A virus, immune response, universal influenza vaccine, heterosubtypic immune response, antineuraminidase antibodies, linear B-cell epitopes.

Введение

Основными антигенами вируса гриппа являются поверхностные гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). Антитела против гемагглютинина обладают нейтрализующей активностью, то есть препятствуют проникновению вируса в клетку и развитию инфекционного процесса. Антинеураминидазные антитела нейтрализующей активностью не обладают, но при этом способны обеспечивать гомологичную и гетерологичную защиту, как было показано еще в 70-х гг. [24, 33]. Кроме того, антитела против нейраминидазы обеспечивают гетеросубтипическую защиту [29], что особенно важно ввиду потенциальной угрозы для людей со стороны вирусов гриппа птиц H5N1 и H7N9, которые могут преодолеть межвидовой барьер и стать возбудителями пандемии гриппа [8]. Вклад анти-

NA-антител в защиту против сезонных вирусов гриппа активно обсуждается в последние годы в связи с острой необходимостью повышения эффективности сезонных противогриппозных вакцин [15, 16, 22].

В настоящее время активная иммунопрофилактика гриппозной инфекции осуществляется с помощью вакцинации населения [25]. Из-за высокой изменчивости вирусов гриппа штаммовый состав гриппозных вакцин необходимо обновлять практически ежегодно. В связи с этим актуальной задачей является усовершенствование существующих гриппозных вакцин с целью расширения их спектра действия. В 2013 г. Т. Дойл и соавт. [14] описали один из В-клеточных эпитопов в NA, консервативный для всех подтипов вируса гриппа А. Моноклональные антитела, полученные против данного эпитопа, эффективно ингибировали

ли *in vitro* активность вирусов гриппа А всех подтипов NA, а также защищали мышей от летальной инфекции. В данной работе мы расширили это исследование, предсказав новые консервативные эпитопы NA вирусов гриппа А и оценив иммуногенность и кросс-реактивность некоторых из них, с целью разработки противогриппозной вакцины широкого спектра действия.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали следующие эпидемические и реассортантные штаммы вирусов гриппа А, полученные либо из Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC, Атланта, США), либо из коллекции штаммов отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ»:

1. А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09);
2. А/17/кряква/Нидерланды/00/95 (H7N3) — реассортантный штамм, унаследовавший гены NA и NA от вируса А/кряква/Нидерланды/12/2000 (H7N3), а остальные 6 генов — от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) [4];

3. А/Гонконг/17гг 6:2 PR8 (H7N9) — реассортантный штамм, унаследовавший гены NA и NA от высокопатогенного вируса А/Гонконг/125/2017 (H7N9), а остальные 6 генов — от модельного штамма А/PR/8/34 (H1N1) (PR8). Ген NA был модифицирован путем удаления четырех основных аминокислот из кливд-сайта молекулы для обеспечения низкопатогенного фенотипа;

4. А/Индонезия/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1) — реассортантный штамм, унаследовавший модифицированный ген NA и интактный ген NA от высокопатогенного штамма А/Индонезия/05/05 (H5N1), а остальные 6 генов — от модельного штамма PR8;

5. RN1/09-свиной (H7N1) — реассортантный штамм, содержащий ген NA от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), ген NA от штамма А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm09, а остальные 6 генов — от донора аттенуации Лен/17 [2];

6. RN2/57-человек (H7N2) — реассортантный штамм, унаследовавший ген NA от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), а остальные 7 генов — от донора Лен/17 [3];

7. RN2/97-птичий (H7N2) — реассортантный штамм, унаследовавший ген NA от вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9), ген NA от штамма А/перепел/Гонконг/G1/97 (H9N2), а остальные 6 генов — от донора аттенуации Лен/17;

8. RN9/13-человек (H6N9) — реассортантный штамм, унаследовавший ген NA от вируса А/серебристая чайка/Сарма/51с/06 (H6N1), ген NA от штамма А/Ануи/1/2013 (H7N9), а остальные 6 генов — от донора аттенуации Лен/17 [5].

Вирусы накапливали в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (ЗАО «Птицефабрика

Синявинская», Ленинградская обл.) при температуре 37°C (для эпидемических вирусов и реассортантных штаммов на основе вируса PR8) или 33°C (для реассортантных штаммов на основе донора Лен/17). Инфекционный титр вирусов в РКЭ определяли методом предельных разведений, для чего эмбрионы заражали 10-кратными разведениями вирусов и инкубировали в течение 48 часов. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [30] и выражали в \log_{10} 50% эмбриональных инфекционных доз (ЭИД₅₀)/мл. Очистку и концентрирование вирусов проводили путем ультрацентрифугирования на 30%/60% градиенте сахарозы.

Поиск линейных В-клеточных эпитопов нейраминидазы вирусов гриппа А. Для поиска консервативных эпитопов NA из базы данных вирусов гриппа Национального центра биотехнологической информации (The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information) был отобран ряд аминокислотных последовательностей нейраминидаз различных вирусов гриппа А (в основном H1N1, H2N2, H3N2, H7N3 и H7N9) [6]. Выравнивание последовательностей производилось при помощи программы UGENE от UniPro (версия 1.31.0) [26]. Существующие на данный момент алгоритмы не способны с большой точностью и чувствительностью предсказывать линейные В-клеточные эпитопы. Поэтому для достижения большей точности в данном исследовании использовались шесть методов с последующим обобщением полученных результатов. Все они реализованы как веб-инструменты и находятся в свободном доступе. Мы применяли следующие методы: VeriPred [23], ElliPro [28], ABCPred [32], EpiTopia [31], AAPPred [9, 11], COVEpro [36].

Пептидный синтез и подготовка антигена для иммунизации. Пептиды, соответствующие линейным В-клеточным эпитопам NA, были химически синтезированы твердофазным методом (SPPS) [17]. Использовался твердый носитель — 2-хлортритильная смола (Iris Biotech, Германия). Последовательность пептидов наращивалась вручную. N-концевая α -аминогруппа была защищена временной Fmoc-группой (стратегия 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)/трет-бутил (tBu) [Iris Biotech, Германия]). Активация α -аминогруппы *in situ* происходила с использованием 1,3-диизопропилкарбодиимида (Iris Biotech, Германия) в N,N-диметилформамиде (Вектон, Россия). Временную защиту Fmoc удаляли с помощью основного 20%-ного 4-метилпиперидина (Вектон, Россия), растворенного в N,N-диметилформамиде, и постоянную защиту трет-бутила и боковой цепи трет-бутилоксикарбонила (Iris Biotech, Германия) с помощью трифторуксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США) и H₂O/триизопропилсилана

(Sigma-Aldrich, США)/1,2-этандитиола (Sigma-Aldrich, США) во время отделения от твердой подложки. Очистку пептидов осуществляли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), после чего образцы высушивали путем центрифугирования под вакуумом на установке SpeedVac (Savant, США). Чистота полученных пептидов составляла не менее 95%, что было подтверждено аналитическим электрофорезом, аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрическим анализом (МАЛДИ; кроме того, была подтверждена идентичность). Масс-спектры пеп-

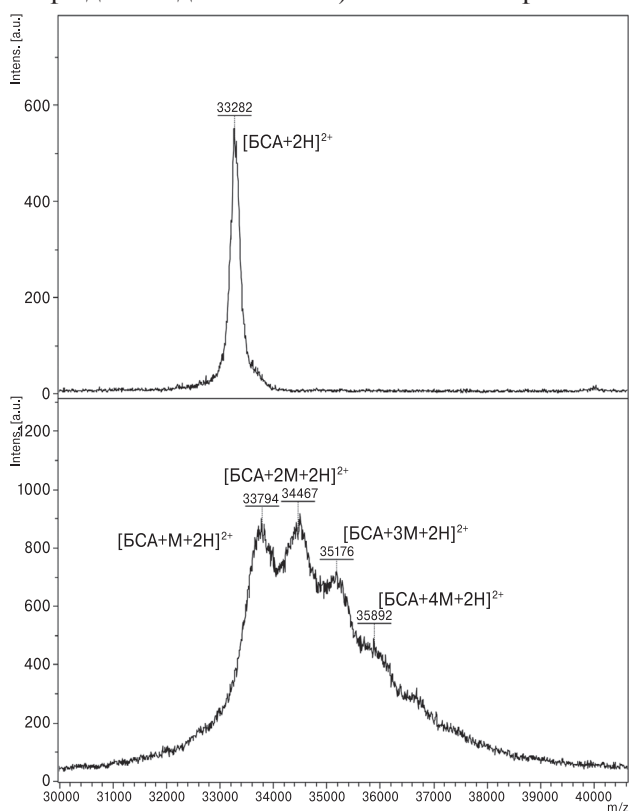


Рисунок 1. Масс-спектры БСА (молекулярная масса — 66 431 Da, верхний масс-спектр) и его конъюгатов с пептидом MNPNQIITIGS (M, моноизотопная молекулярная масса 1314,7 Da, нижний масс-спектр). Показан участок спектра, содержащий сигналы двухзарядных ионов, в том числе ионов конъюгатов БСА с одной или несколькими молекулами. Точность измерения масс в этой области спектра составляет $\pm 100\text{--}200$ Da

Figure 1. Mass spectrometry of BSA (molecular weight 66 431 Da, upper mass spectrum) and its conjugates with the peptide MNPNQIITIGS (M, monoisotopic molecular weight 1314.7 Da, lower mass spectrum). A spectral section containing signals of doubly charged ions, including ions of BSA conjugates with one or more molecules, is shown. The accuracy of mass measurements in this region of the spectrum is $\pm 100\text{--}200$ Da

тидов регистрировали на приборе Ultraflex extreme (Bruker, Германия) в стандартных условиях: положительные ионы, рефлекторный режим, матрица — 4-гидрокси- α -цианокоричная кислота. Концентрацию пептидов в полученных образцах определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность растворов при длине волны 280 нм (если в состав пептида входили остатки тирозина или триптофана) или при длине волны 214 нм (если в составе молекулы пептида отсутствовали остатки данных ароматических аминокислот), а затем рассчитывая их концентрацию с помощью вычисленных на основе аминокислотного состава пептидов коэффициентов молярной экстинкции [27].

Пептиды конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА) (Sigma-Aldrich, США) для дальнейшей иммунизации экспериментальных животных. В качестве конъюгирующего реагента был использован глутаровый альдегид (ООО «БИО», Россия). Чтобы конъюгация с применением данной методики была возможна, в состав аминокислотной последовательности каждого пептида включали остаток лизина на С-конце молекулы. Для получения конъюгата к 1 мг пептида добавляли 0,5 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (НФБ), pH 7,0. К полученному раствору добавляли 5 мг БСА, предварительно разведенного в 0,5 мл 0,1 М НФБ. К полученной смеси добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,02%-ного глутарового альдегида в 0,1 М НФБ. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем проводили диализ против деионизированной воды в течение 24 ч при 4°C. Концентрацию белка в конъюгате определяли по методу Брэдфорда [7]. Образование конъюгатов контролировали методом масс-спектрометрии МАЛДИ, используя линейный режим масс-анализа. Пример показан на рис. 1.

Оценка иммуногенности и защитной эффективности NA пептидов для мышей. Экспериментальная работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [1] и была одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ (протокол №3/17 от 30.11.2017). В работе использовались самки мышей линии СВА (питомник «Рапполово», Ленинградская область), по 14 животных в группе. Мышей иммунизировали интраперитонеально смесью из трех пептидов (MNPNQIITIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP), конъюгированных с БСА, в концентрации 15 мкг/мл трехкратно с интервалом 2 недели. Для усиления иммуногенности смеси применялся неполный адъювант Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 2:1. Мышам контрольной группы вводили стерильный фосфатно-солевой буфер (PBS, ООО «Биолот»). Забор крови у иммунизированных

мышей проводили через 2 недели после третьей иммунизации, после чего животных делили на 2 группы и заражали интраназально вирулентными вирусами А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) или А/Гонконг/17г 6:2 PR8 (H7N9), взятыми в дозе 1 LD₅₀ (50%-ная летальная доза) в объеме 50 мкл. Выживаемость и потерю веса у зараженных мышей оценивали ежедневно в течение 10 дней. Забор легких у мышей производили на 4-й и 8-й день после заражения и хранили замороженными при -70°C. Гомогенаты тканей легких готовили с использованием гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Германия) в 1 мл стерильного PBS, содержащего антибиотик-антимикотик (Invitrogen, Великобритания). Гомогенаты осветляли низкоскоростным центрифугированием при 6000 об/мин в течение 5 мин. Полученные супернатанты использовали для определения титров вирусов в РКЭ по описанной выше схеме.

Иммуногенность NA-пептидов оценивали по содержанию вирус-специфических IgG-антител в сыворотках крови иммунизированных мышей. Для разрушения термолабильных ингибиторов гемагглютинации сыворотки прогревались при 56°C в течение 30 мин. Для удаления NA-чувствительных ингибиторов гемагглютинации один объем цельной сыворотки инкубировался 18–20 ч при 37°C в присутствии 3 объемов экстракта нейраминидазы холерных вибрионов (RDE, Denka Seiken Co., Ltd, Япония), с последующей инактивацией фермента прогреванием проб при 56°C в течение 1 ч. После этого к пробам добавляли 6 объемов стерильного PBS (то есть разведение исходной сыворотки составляло 1:10).

Постановка иммуноферментного анализа (ИФА) проводилась согласно опубликованной ранее методике [12], но с некоторыми изменениями. Планшеты (Sarstedt, Германия) покрывали различными вирусами гриппа А, разведенными в PBS до 20 агглютинирующих единиц (АЕ). В качестве блокирующего буфера использовали 1%-ный овальбумин. Использовались козы анти-мышиные IgG-антитела (Sigma-Aldrich, США), меченые пероксидазой хрена, в разведении 1/20 000. Проявление пероксидазной реакции проводилось с добавлением 100 мкл ТМВ-субстрата (BD Biosciences, США). Ферментативную реакцию останавливали 100 мкл 1 Н серной кислоты, после чего оптическую плотность считывали на спектрофотометре при длине волны 450 нм. За титр сыворотки принимали наивысшее разведение образца, дающее оптическую плотность при длине волны 450 нм, превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных образцах более чем на 3 стандартных отклонения.

Статистическая обработка результатов. Анализ данных проводили с использовани-

ем программ Statistica 10 и GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., США). Статистическую значимость различий между группами иммунизированных и контрольных мышей определяли либо при помощи непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (титры антител в сыворотках крови и титры вирусов в легких мышей), либо при помощи критерия Мантела–Кокса (выживаемость мышей после заражения). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Консервативные линейные В-клеточные эпитопы. Используя методы по предсказанию В-клеточных эпитопов и проанализировав последовательности нейраминидаз различных вирусов гриппа А, мы обнаружили 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг активного центра нейраминидазы (рис. 2, II обложка):

1. MNPNQKI (1–7);
2. MNPNQKIITIGS (1–12);
3. ILRTQESEC (222–230);
4. DNWKGSNRP (293–301);
5. SGYSG (404–408);
6. SWPDG (457–461);
7. EECSCYP (276–282);
8. VELIRGR (424–430).

В скобках указан порядковый номер аминокислот по нумерации N2.

Для последующей работы были выбраны 3 эпитопа — MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP. Они были синтезированы *de novo*, конъюгированы с БСА и далее использовались для иммунизации мышей.

Иммуногенность NA-пептидов. Титр сывороточных IgG-антител определяли для ряда различных цельных вирусов гриппа, представляющих разные подтипы NA (N1, N2, N3 и N9). Было показано, что антитела из сывороток крови СВА-мышей, иммунизированных смесью трех пептидов, были способны реагировать с различными антигенами (рис. 3). Так, среднегеометрические титры антител (СГТ) ко всем исследованным вирусам гриппа были достоверно выше у вакцинированных мышей, чем у животных контрольной группы.

Защитная эффективность NA-пептидов. Для определения способности NA-специфичных антител обеспечивать защиту против различных подтипов вируса гриппа А, иммунизированных мышей заражали двумя вирулентными вирусами гриппа: H1N1 и H7N9. Несмотря на то что иммунизация NA-пептидами не защитила мышей от существенной потери веса после инфицирования вирусом H1N1, все иммунизированные мыши выжили в течение периода наблюдения, тогда как в контрольной группе выживаемость составила только 28,6% ($p = 0,013$)

(рис. 4А, Б). Анализ вирусной нагрузки в легких мышей, зараженных вирусом H1N1, не выявил различий в титрах ни на 4-е, ни на 8-е сутки после заражения ($p > 0,05$), однако в группе иммунизированных мышей у трех из пяти животных вирус полностью элиминировался к 8-м суткам, тогда как в контрольной группе вирус продолжал размножаться у 100% мышей на 8-й день после заражения (рис. 4В).

Иммунизация смесью NA-пептидов, которая обеспечивала защиту от вируса H1N1, не оказывала

протективного эффекта при заражении летальным вирусом H7N9: уровень летальности, потеря веса и титры вируса в легких были сопоставимы у иммунизированных мышей и мышей контрольной группы ($p > 0,05$) (рис. 4А–В). Эти данные указывают на то, что уровни анти-N9-антител, индуцированные иммунизацией смесью исследуемых NA-пептидов, являются недостаточными для защиты мышей от клинических проявлений инфекции, вызванной вирусом H7N9.

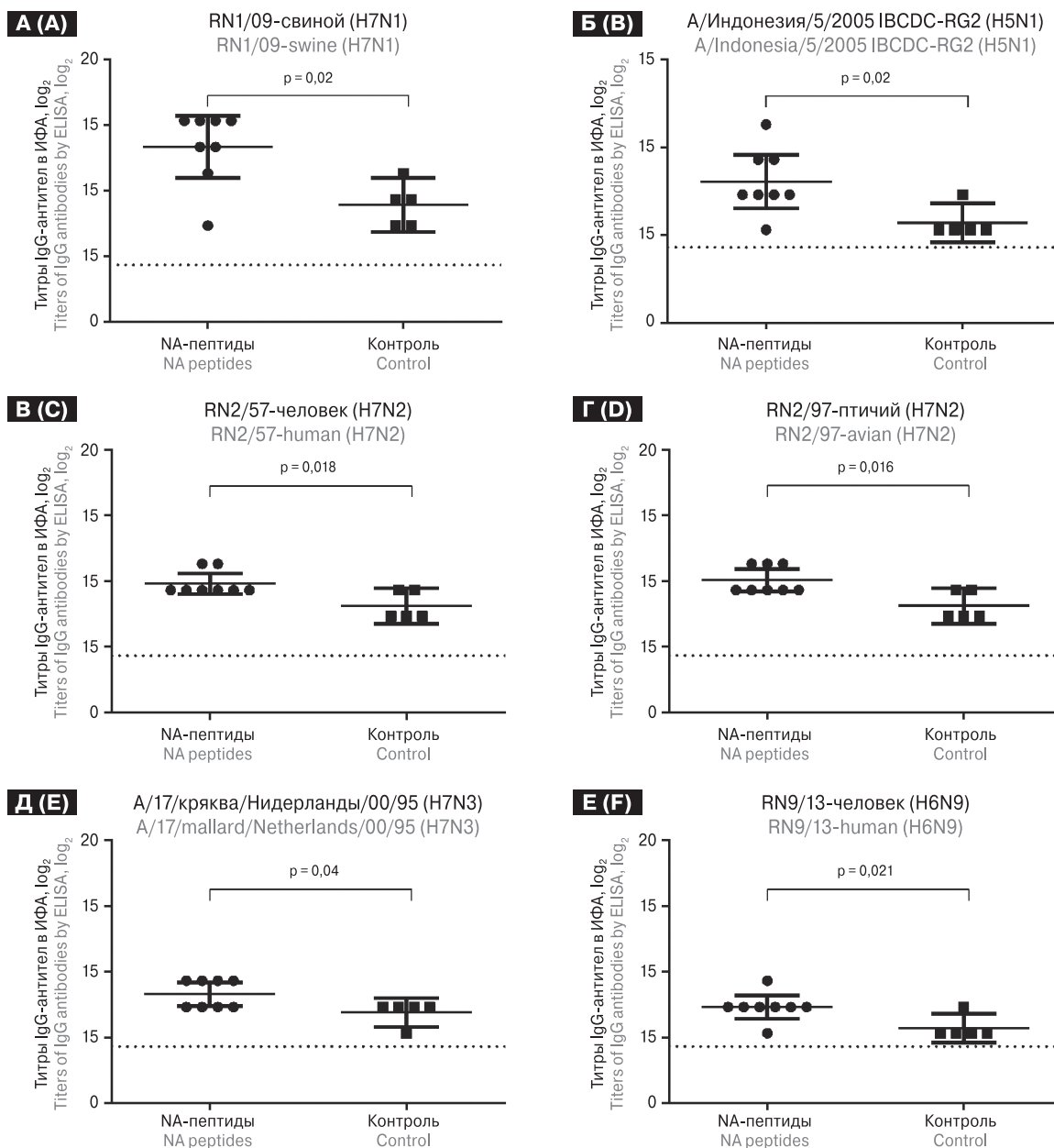


Рисунок 3. Иммуногенность смеси из трех NA-пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Указаны цельновирионные антигены, использованные в ИФА и содержащие подтипы нейраминидазы N1 (А, Б), N2 (В, Г), N3 (Д) и N9 (Е). Указаны индивидуальные значения титров сывороток иммунизированных и контрольных мышей, а также среднегеометрические титры с 95%-ным интервалом

Figure 3. Immunogenicity of a mixture of three NA peptides in CBA mice. A whole virus antigens N1 (A, B), N2 (C, D), N3 (E) and N9 (F) neuraminidase subtypes used in ELISA are indicated. The individual serum titers from immunized and control mice are indicated, as well as the geometric mean titers with a 95% interval

Обсуждение

На сегодняшний день основным способом борьбы с гриппом является активная иммунопрофилактика населения с помощью специфических вакцин. Необходимость того, что все гриппозные вакцины, как живые, так и инактивированные, должны оцениваться на соответствие и эффективность по двум антигенам — гемагглюнину и нейраминидазе, обсуждалась еще в 1970-х гг. [13]. Несмотря на это, до сих

пор все инактивированные вакцины стандартизируются по содержанию НА, а количество НА в вакцине различается у разных производителей [10, 19]. Однако основным недостатком современных вакцин против гриппа является высокая степень антигенной изменчивости НА, что приводит к необходимости актуализировать вакцинный штамм практически ежегодно. В отличие от НА, NA подвергается гораздо более медленному антигенному дрейфу, а некоторые консервативные участки NA почти не изменя-

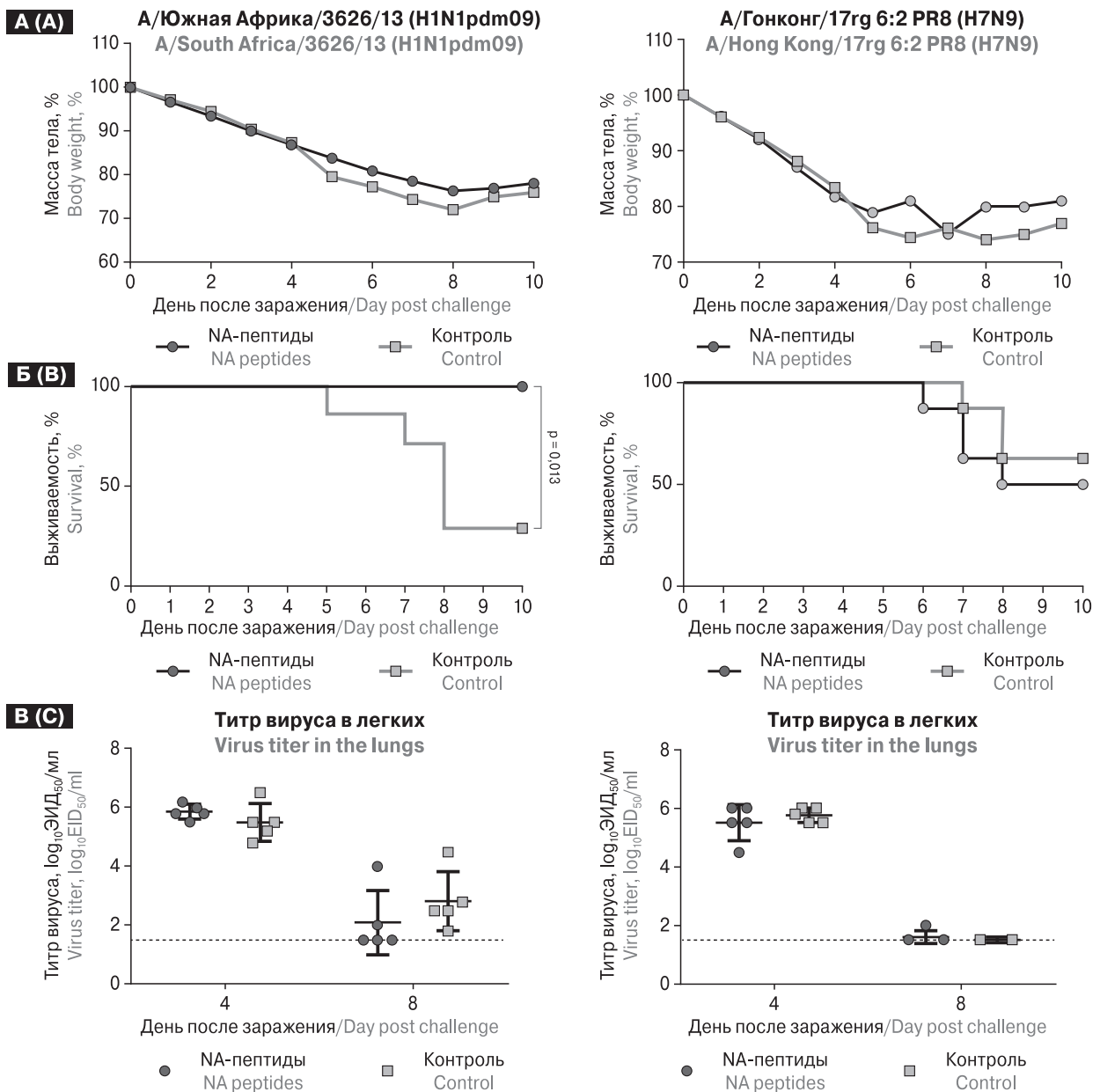


Рисунок 4. Защитная эффективность смеси из трех NA-пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Оценку защитного эффекта вакцинации проводили по анализу потери веса животных (А), выживаемости (Б) и титрам вирусов в легких мышей на 4-е и 8-е сутки после заражения (В). Пунктирная линия указывает на уровень детекции вируса в гомогенатах тканей легких мышей

Figure 4. Protective efficacy of a mixture of three NA peptides in CBA mice. The protective vaccination-related effect was assessed by monitoring animal body weight loss (A), survival rate (B), and lung virus titer from mice on day 4 and 8 after challenge (C). Dashed line denotes the limit of virus detection in the lung homogenates

ются в процессе эволюции [37]. В связи с этим NA рассматривается как перспективный антиген для разработки гриппозных вакцин широкого спектра действия [22]. С одной стороны, улучшить эффективность вакцинации можно за счет регламентирования минимального содержания NA в противогриппозных вакцинах [10, 16]. С другой стороны, консервативные эпитопы NA можно использовать при конструировании универсальной гриппозной вакцины [18, 20], а также в качестве дополнительного компонента к уже имеющимся вакцинам [34, 38]. В последние годы ведется активная работа по поиску моноклональных антител к ферментативному сайту NA, обладающих широкой кросс-реактивностью в отношении вирусов гриппа А различных подтипов, а также вирусов гриппа типа В [35]. Однако в подавляющем большинстве случаев эпитопы для таких антител являются пространственными, то есть составляющие их аминокислоты расположены в различных участках белка и только в результате его фолдинга оказываются сближены. Очевидно, что такие эпитопы не могут быть использованы для конструирования универсальных гриппозных вакцин на имеющихся вакцинных платформах. Именно поэтому в настоящем исследовании мы сконцентрировались на поиске линейных В-клеточных эпитопов NA, консервативных для различных вирусов гриппа А.

В 2013 г. Т. Дойл с соавт. [14] определили один консервативный для всех подтипов вируса гриппа А линейный В-клеточный эпитоп NA, иммунизация которым давала защиту от вирусов гриппа со всеми подтипами NA *in vitro* и частичную защиту *in vivo*. В нашем исследовании с помощью методов биоинформатики было выявлено наличие 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг активного центра NA. Локализация выявленных эпитопов вблизи активного центра NA виру-

сов гриппа различных подтипов говорит о том, что эти участки NA являются функционально значимыми и могут рассматриваться как перспективные мишени для создания гриппозных вакцин широкого спектра действия. На начальном этапе для пептидного синтеза и последующей иммунизации мышей были выбраны три выявленных эпитопа NA: MNPNQKIITIGS [19], ILRTQESEC [14] и DNWKGSNRP [21]. Мы использовали их в качестве смеси для иммунизации экспериментальных животных, чего до настоящего времени никто не делал. Смесь трех пептидов, соответствующих отобранным эпитопам NA, при внутрибрюшинном введении вызывала образование у мышей сывороточных антител, связывающихся с цельными вирусами гриппа различных подтипов NA (N1, N2, N3 и N9), что указывает на иммуногенность и кросс-реактивность NA-пептидов. Полученные в настоящем исследовании данные показали способность индуцированных анти-NA-антител защищать мышей от летального исхода, вызванного вирусом H1N1, но при этом животные не были защищены от гибели, обусловленной вирусом H7N9. Эти результаты, с одной стороны, показали перспективность использования линейных В-клеточных эпитопов NA для дизайна эпитоп-направленных гриппозных вакцин нового поколения: так, в частности, можно использовать живую гриппозную вакцину в качестве вектора, где линейные эпитопы NA могут быть встроены в молекулу гемагглютинаина, что существенно повысит их содержание в вирионе и, как следствие, их иммуногенность. С другой стороны, полученные данные указывают на необходимость более глубокого и полного исследования специфичности консервативных эпитопов NA, а также оптимизации схем иммунизации для достижения более высоких показателей защитной эффективности, что будет сделано в будущем.

Список литературы/References

1. О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных: Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г. [Measures to further improve organizational forms of work using experimental animals: Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 08/12/1977 (In Russ.)] URL: <https://docplayer.ru/31723947-Ministerstvo-zdravoohraneniya-sssr-prikaz-12-avgusta-1977-g-n-755.html> (20.11.2020)
2. Патент № 2428476С Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01). Реассортантный штамм вируса гриппа RN 1/09-Swine A(H7N1) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации: № 2010125452/10; заявлено 2010.06.21; опубликовано 2011.09.10 / Дешева Ю.А., Смологодина Т.С., Руденко Л.Г., Киселева И.В., Ларионова Н.В. Патентообладатель: НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН. 8 с. [Patent No. 2428476C Russian Federation, Int. Cl C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01). Reassortant strain of influenza virus RN1/09-Swine A(H7N1) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. No. 2010125452/10; application: 2010.06.21; date of publication 2011.09.10 / Desheva Y.A., Smolodogina T.S., Rudenko L.G., Kiseleva I.V., Larionova N.V. Proprietors: Nauchno-issledovatel'skij institut ehksperimental'noj meditsiny Severo-Zapadnogo otdelenija Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk. 8 p.]
3. Патент № 2464312С1 Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), C12R 1/93 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01). Реассортантный штамм вируса гриппа RN2/57-Human A(H7N2) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации: № 2011124663/10; заявлено 2011.06.16; опубликовано 2012.10.20 / Дешева Ю.А., Смологодина Т.С., Руденко Л.Г. Патентообладатель: ФГБУ НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного

- отделения РАМН. 8 с. [Patent No. 2464312C1 Russian Federation, Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01), C12R 1/93 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01). Reassortant strain of influenza virus RN2/57-Human A(H7N2) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. No. 2011124663/10; application: 2011.06.16: date of publication 2012.10.20 / Desheva Y.A., Smolonogina T.S., Rudenko L.G. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie Nauchno-issledovatel'skij institut eksperimental'noj meditsiny Severo-Zapadnogo otdelenija Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk. 8 p.]
4. Патент № 2507256C2 Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01), A61P 31/00 (2006.01). Штамм вируса гриппа A/17/mallard/Нидерланды/00/95(H7N3) для производства живой и производства инактивированной гриппозных вакцин: № 2012108866/10; заявлено 2012.03.07: опубликовано 2013.09.20 / Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Патентообладатель: ФГБУ НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН. 8 с. [Patent No. 2507256C2 Russian Federation, Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01), A61K 39/145 (2006.01), A61P 31/00 (2006.01). The strain of influenza virus A/17 /mallard/Netherlands/00/95 (H7N3) for the production of live and production of inactivated influenza vaccines. No. 2012108866/10; application: 2012.03.07: date of publication 2013.09.20 / Desheva Y.A., Rudenko L.G., Alexandrova G.I. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie Nauchno-issledovatel'skij institute eksperimentalnoj meditsiny Severo-Zapadnogo otdelenija Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk. 8 p.]
 5. Патент № 2587629C1 Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01), C12Q 1/00 (2006.01). Реассортантный штамм вируса гриппа RN9/13-Human A(H6N9) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации: № 2014154110/10; заявлено 2014.12.29: опубликовано 2016.06.20 / Смолоногоина Т.С., Дешева Ю.А. Патентообладатель: ФГБНУ Институт экспериментальной медицины. 11 с. [Patent No. 2587629C1 Russian Federation, Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01), C12Q 1/00 (2006.01). Reassortant strain of influenza virus RN9/13-Human A(H6N9) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. No. 2014154110/10; application: 2014.12.29: date of publication 2016.06.20 / Smolonogina T.S., Desheva Y.A. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe nauchnoe uchrezhdenie Institut eksperimentalnoj meditsiny. 11 p.]
 6. Bao Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., Ostell J., Lipman D. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 2, pp. 596–601. doi: 10.1128/JVI.02005-07
 7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
 8. Bui C., Bethmont A., Chughtai A.A., Gardner L., Sarkar S., Hassan S., Seale H., MacIntyre C.R. A systematic review of the comparative epidemiology of avian and human influenza A H5N1 and H7N9 — lessons and unanswered questions. *Transbound Emerg. Dis.*, 2016, vol. 63, no. 6, pp. 602–620. doi: 10.1111/tbed.12327
 9. Chen J., Liu H., Yang J., Chou K.C. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*, 2007, vol. 33, no. 3, pp. 423–428. doi: 10.1007/s00726-006-0485-9
 10. Chen Y.Q., Wohlbold T.J., Zheng N.Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., Lee J., Wan H., Rojas K.T., Kirkpatrick E., Henry C., Palm A.E., Stamper C.T., Lan L.Y., Topham D.J., Treanor J., Wrammert J., Ahmed R., Eichelberger M.C., Georgiou G., Krammer F., Wilson P.C. Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies. *Cell*, 2018, vol. 173, no. 2, pp. 417–429. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.030
 11. Davydov Y.I., Tonevitsky A. Prediction of linear B-cell epitopes. *Mol. Biol.*, 2009, vol. 43, no. 1, pp. 150–158. doi: 10.1134/S0026893309010208
 12. Desheva J.A., Lu X.H., Rekestin A.R., Rudenko L.G., Swayne D.E., Cox N.J., Katz J.M., Klimov A.I. Characterization of an influenza A H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential. *Vaccine*, 2006, vol. 24, no. 47–48, pp. 6859–6866. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.023
 13. Dowdle W.R. Influenza anti-neuraminidase: the second best antibody. *N. Engl. J. Med.*, 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1360–1361. doi: 10.1056/NEJM197206222862511
 14. Doyle T.M., Hashem A.M., Li C., Van Domselaar G., Larocque L., Wang J., Smith D., Cyr T., Farnsworth A., He R., Hurt A.C., Brown E.G., Li X. Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 100, no. 2, pp. 567–574. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.018
 15. Eichelberger M.C., Monto A.S. Neuraminidase, the forgotten surface antigen, emerges as an influenza vaccine target for broadened protection. *J. Infect. Dis.*, 2019, vol. 219, suppl. 1, pp. 75–80. doi: 10.1093/infdis/jiz017
 16. Eichelberger M.C., Morens D.M., Taubenberger J.K. Neuraminidase as an influenza vaccine antigen: a low hanging fruit, ready for picking to improve vaccine effectiveness. *Curr. Opin. Immunol.*, 2018, vol. 53, pp. 38–44. doi: 10.1016/j.coi.2018.03.025
 17. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Ed. by W.C. Chan, P.D. White. *Oxford: Oxford University Press*, 2000. 346 p.
 18. Gottlieb T., Ben-Yedidia T. Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine. *J. Autoimmun.*, 2014, vol. 54, pp. 15–20. doi: 10.1016/j.jaut.2014.07.005
 19. Gravel C., Li C., Wang J., Hashem A.M., Jaentschke B., Xu K.W., Lorbetskie B., Gingras G., Aubin Y., Domselaar G.V., Girard M., He R., Li X. Qualitative and quantitative analyses of virtually all subtypes of influenza A and B viral neuraminidases using antibodies targeting the universally conserved sequences. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 36, pp. 5774–5784. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.075
 20. Herrera-Rodriguez J., Meijerhof T., Niesters H.G., Stjernholm G., Hovden A.O., Sørensen B., Ökvist M., Sommerfelt M.A., Huckriede A. A novel peptide-based vaccine candidate with protective efficacy against influenza A in a mouse model. *Virology*, 2018, vol. 515, pp. 21–28. doi: 10.1016/j.virol.2017.11.018
 21. Huang P., Xu Y., Ni H., Zhong J., Zhang X., Tan S., Wu D., Qiu B., Guan D., Wen M., Yan J., Zhang Y. Linear B-cell epitope mapping of neuraminidases of the 2009 A H1N1 viruses based on immunoinformatics. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 6, pp. 1278–1282. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.11.080
 22. Krammer F., Fouchier R.A.M., Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw-Saliba K., Wan H., Wilson P.C., Compans R.W., Skountzou I., Monto A.S. NAction! How can neuraminidase-based immunity contribute to better influenza virus vaccines? *mBio*, 2018, vol. 9, no. 2: e02332-17. doi: 10.1128/mBio.02332-17
 23. Larsen J.E., Lund O., Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.*, 2006, vol. 2: 2. doi: 10.1186/1745-7580-2-2

24. Murphy B.R., Kasel J.A., Chanock R.M. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N. Engl. J. Med.*, 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1329–1332. doi: 10.1056/NEJM197206222862502
25. Nichol K.L. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. *Vaccine*, 2008, vol. 26, suppl. 4, pp. 17–22. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.048
26. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
27. Pace C.N. Evaluating contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding. *Methods Enzymol.*, 1995, vol. 259, pp. 538–554. doi: 10.1016/0076-6879(95)59060-9
28. Ponomarenko J., Bui H.H., Li W., Füsseder N., Bourne P.E., Sette A., Peters B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9: 514. doi: 10.1186/1471-2105-9-514
29. Quan F.S., Kim M.C., Lee B.J., Song J.M., Compans R.W., Kang S.M. Influenza M1 VLPs containing neuraminidase induce heterosubtypic cross-protection. *Virology*, 2012, vol. 430, no. 2, pp. 127–135. doi: 10.1016/j.virol.2012.05.006
30. Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, vol. 27, no.3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
31. Rubinstein N.D., Mayrose I., Martz E., Pupko T. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. *BMC Bioinformatics*, 2009, vol. 10: 287. doi: 10.1186/1471-2105-10-287
32. Saha S., Raghava G.P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 2006, vol. 65, no. 1, pp. 40–48. doi: 10.1002/prot.21078
33. Schulman J.L., Khakpour M., Kilbourne E.D. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. *J. Virol.*, 1968, vol. 2, no. 8, pp. 778–786. doi: 10.1128/JVI.2.8.778-786.1968
34. Soema P.C., Rosendahl Huber S.K., Willems G.J., Jacobi R., Hendriks M., Soethout E., Jiskoot W., de Jonge J., van Beek J., Kersten G.F.A., Amorij J.P. Whole-inactivated influenza virus is a potent adjuvant for influenza peptides containing CD8(+) T cell epitopes. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 525. doi: 10.3389/fimmu.2018.00525
35. Stadlbauer D., Zhu X., McMahon M., Turner J.S., Wohlbold T.J., Schmitz A.J., Strohmeier S., Yu W., Nachbagauer R., Mudd P.A., Wilson I.A., Ellebedy A.H., Krammer F. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase. *Science*, 2019, vol. 366, no. 6464, pp. 499–504. doi: 10.1126/science.aay0678
36. Sweredoski M.J., Baldi P. COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2009, vol. 22, no. 3, pp. 113–120. doi: 10.1093/protein/gzn075
37. Wohlbold T.J., Krammer F. In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses*, 2014, vol. 6, no. 6, pp. 2465–2494. doi: 10.3390/v6062465
38. Xiao J., Zhang L., Wang Z., Xiang W., Lu P., Zhao Y., Han M., Ma A., Qi P., Wang M., Gao G.F., Liu W.J. Conserved peptides enhance immune efficiency of inactive vaccines against emerging avian influenza viruses in chicken. *Science China Life Sciences*, 2017, vol. 60, no. 12, pp. 1340–1347. doi: 10.1007/s11427-017-9153-2

Авторы:

Сычев И.А., младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Копейкин П.М., младший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Цветкова Е.В., к.б.н., доцент кафедры биохимии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Чередова К.В., лаборант-исследователь отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Мильман Б.Л., д.х.н., зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Шамова О.В., д.б.н., доцент, зав. отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Исакова-Сивак И.Н., д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Дешева Ю.А., д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sychev I.A., Junior Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Kopeikin P.M., Junior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Tsvetkova E.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation
Cheredova K.V., Investigator (Biologist), Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Milman B.L., PhD, MD (Chemistry), Head of the Laboratory for Mass Spectrometry, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Shamova O.V., PhD, MD (Biology), Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Isakova-Sivak I.N., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Diseases, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Desheva Y.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.12.2019
 Отправлена на доработку 13.02.2020
 Принята к печати 11.03.2020

Received 12.12.2019
 Revision received 13.02.2020
 Accepted 11.03.2020

Иллюстрация к статье «Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А» (авторы: И.А. Сычев, П.М. Копейкин, Е.В. Цветкова, К.В. Чередова, Б.Л. Мильман, О.В. Шамова, И.Н. Исакова-Сивак, Ю.А. Дешева) (с. 463–472)

Illustration for the article "Induction of cross-reactive antibodies in mice immunized with conserved influenza A virus neuraminidase-derived linear B-cell epitopes" (authors: Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Milman B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Y.A.) (pp. 463–472)

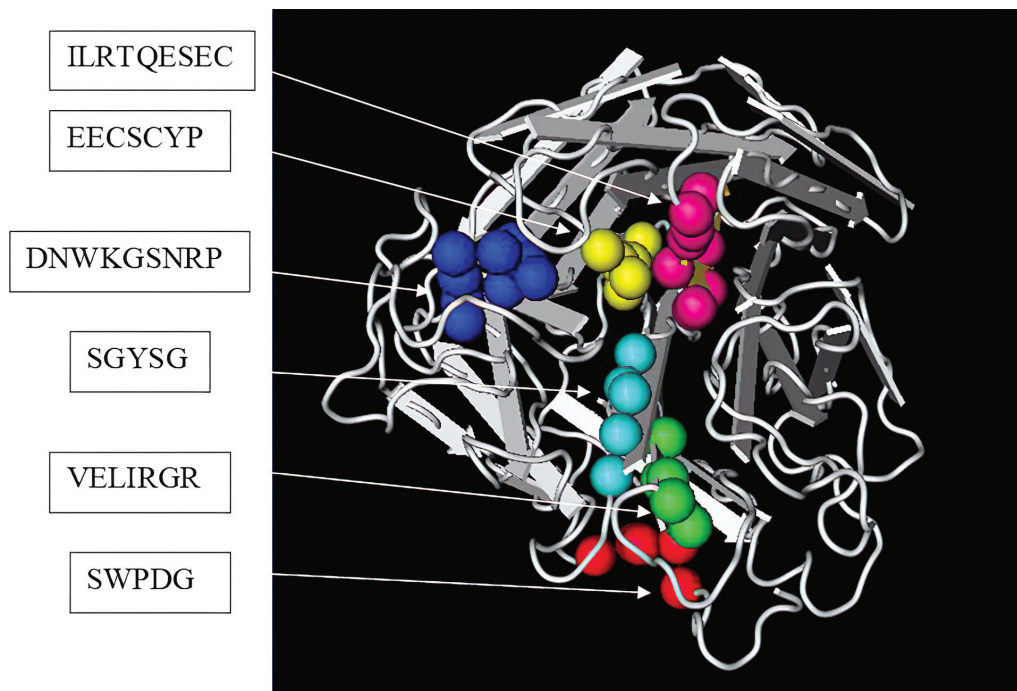


Рисунок 2. Визуализация пространственного расположения обнаруженных консервативных линейных В-клеточных эпитопов на мономере молекулы NA. Эпитопы расположены вокруг активного центра

Figure 2. Visualized spatial position of identified conservative linear B-cell epitopes on the monomer of the NA molecule. Epitopes are located around the active site