

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

Сычев И.А.¹

Копейкин П.М.¹

Цветкова Е.В.^{1,2}

Чередова К.В.¹

Мильман Б.Л.¹

Шамова О.В.¹

Исакова-Сивак И.Н.¹

Дешева Ю.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины».

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

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

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

^a Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”.

^b Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”.

Резюме. Введение. Грипп является социально-значимой инфекцией, ежегодно наносящей значительный ущерб здоровью населения и экономике страны. Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным способом борьбы с гриппом и его осложнениями. Существуют разнообразные вакцины против гриппа, однако, их общим недостатком является узкая специфичность, необходимость ежегодного обновления штаммового состава, не всегда удовлетворительная иммуногенность, а, следовательно, и эффективность. В этой связи 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, с отличающимся гемагглютинином и нейраминидазой по сравнению с вирусами, которые циркулируют в настоящее время. Настоящее исследование посвящено поиску новых и анализу ранее предсказанных линейных В-клеточных эпитопов NA, консервативных среди 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 использовались 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, ни на 8 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, вызванной вирусом H1N1, но не вирусом H7N9. Эти результаты указывают на перспективность использования линейных B-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, антинейраминидазные антитела, линейные B-клеточные эпитопы.

Summary.

Introduction. Influenza is a socially considerable infection annually causing profound damage to the populational health and economy. Vaccination is the most effective way to manage influenza and its complications. There are various vaccines against influenza, but their common drawback is the narrow specificity, need for annual virus strain renewal, not always good immunogenicity and effectiveness. In this regard, a close attention is paid to developing universal influenza vaccines aimed to induce cross-reactive factors of the immune response to the most conserved parts of viral proteins. Antibodies against neuraminidase (NA) are able to provide

heterosubtypic protection, which is important due to potential threat from influenza viruses, with differed hemagglutinin and neuraminidase compared to the currently circulating viruses. The present study is aimed to search for new and analyze previously predicted linear NA B-cell epitopes, conserved among all subtypes of influenza A virus.

Results. there were found out eight conserved linear B-cell epitopes were located around the neuraminidase active site, three of which (MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC, and DNWKGSNRP) were synthesized *de novo*, conjugated with bovine serum albumin to be further used for mouse immunization. Serum IgG antibodies were detected by ELISA in immunized mice. Antibodies specifically bind to various influenza A viruses containing NA subtypes N1, N2, N3, and N9. Immunization with NA peptides provided no protection from profound weight loss after infection with lethal H1N1 influenza virus. However, all immunized mice survived during the observation period, while in control group survival rate was as low as 28.6%. Assessing the viral load in the lungs of mice infected with the H1N1 virus did not reveal differences in titers either on day 4 or 8 post-infection. Nevertheless, the protective effect lacked upon challenge with lethal H7N9 influenza virus: mortality, weight loss, and lung virus titers were comparable both in immunized and control mice.

Conclusions. The data obtained uncovered cross-reactivity in anti-NA antibodies induced by immunization with NA peptides as well as protective efficacy against infection caused by the H1N1, but not H7N9 virus. Thus, these data are promising and indicate that linear B-cell NA epitopes can be used for design of epitope-directed influenza vaccines, but a deeper and full examination of specificity for conserved NA epitopes as well as optimized immunization schemes are necessary to achieve higher protective efficacy.

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

1

Введение

2 Основными антигенами вируса гриппа являются поверхностные
3 гликопротеины гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA). Антитела против
4 гемагглютенина являются нейтрализующими, тогда как
5 антинейраминидазные антитела не обладают нейтрализующей активностью,
6 но при этом способны обеспечивать гомологичную и гетерологичную защиту,
7 как было показано ещё в 70-х гг. [24, 33]. Кроме того, антитела против
8 нейраминидазы способны обеспечивать гетеросубтипическую защиту [29],
9 что особенно важно ввиду потенциальной угрозы для людей со стороны
10 вирусов гриппа птиц H5N1 и H7N9, которые могут преодолевать межвидовой
11 барьер и считаются возможными возбудителями будущей пандемии гриппа
12 [8]. Вклад анти-NA антител в защиту против сезонных вирусов гриппа активно
13 обсуждается в последние годы в связи с острой необходимостью повышения
14 эффективности сезонных противогриппозных вакцин [16, 17, 22].

15 В настоящее время активная иммунопрофилактика гриппозной инфекции
16 осуществляется с помощью вакцинации населения [25]. Из-за высокой
17 изменчивости вирусов гриппа штаммовый состав гриппозных вакцин
18 необходимо обновлять практически ежегодно. В этой связи актуальной
19 задачей является усовершенствование существующих гриппозных вакцин с
20 целью расширения их спектра действия. В 2013 г.
21 Т. Дойл и соавт. [15] описали один из В-клеточных эпитопов в НА,
22 консервативный среди всех подтипов вируса гриппа А. Моноклональные
23 антитела, полученные против данного эпитопа, эффективно ингибировали *in*
24 *vitro* активность вирусов гриппа А всех подтипов NA, а также защищали
25 мышей против летальной инфекции. В данной работе мы расширили это
26 исследование, предсказав новые консервативные эпитопы NA вирусов гриппа
27 А и оценив иммуногенность и кросс-реактивность некоторых из них, в

28 качестве попытки разработать противогриппозную вакцину широкого спектра
29 действия.

30

31 **Материалы и методы**

32 *Вирусы.*

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

37 1) А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09);

38 2) А/17/кряква/Нидерланды/00/95 (H7N3) – реассортантный штамм,
39 унаследовавший гены НА и NA от вируса А/кряква/Нидерланды/12/2000
40 (H7N3), а остальные 6 генов – от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57
41 (H2N2) (Лен/17) [1];

42 3) А/Гонконг/17rg 6:2 PR8 (H7N9) – реассортантный штамм,
43 унаследовавший НА и NA гены от высокопатогенного вируса
44 А/Гонконг/125/2017 (H7N9), а остальные 6 генов – от модельного штамма
45 А/PR/8/34 (H1N1) (PR8). Ген НА был модифицирован путем удаления четырех
46 основных аминокислот из кливедж-сайта молекулы для обеспечения
47 низкопатогенного фенотипа;

48 4) А/Индонезия/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1) – реассортантный штамм,
49 унаследовавший модифицированный ген НА и интактный ген NA от
50 высокопатогенного штамма А/Индонезия/05/05 (H5N1), а остальные
51 6 генов – от модельного штамма PR8;

52 5) RN1/09-свиной (H7N1) – реассортантный штамм, содержащий НА ген
53 от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), NA ген от штамма
54 А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm09, а остальные 6 генов – от донора
55 аттенуации Лен/17 [3];

56 6) RN2/57-человек (H7N2) – реассортантный штамм, унаследовавший ген
57 NA от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), а остальные 7 генов – от донора
58 Лен/17 [2];

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

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

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

76

77 *Поиск линейных В-клеточных эпитопов нейраминидазы вирусов гриппа А.*

78 Для поиска консервативных эпитопов NA был отобран ряд аминокислотных
79 последовательностей нейраминидаз различных вирусов гриппа А (в основном
80 H1N1, H2N2, H3N2, H7N3 и H7N9), используя базу данных вирусов гриппа
81 Национального центра биотехнологической информации (The Influenza Virus
82 Resource at the National Center for Biotechnology Information) [6]. Выравнивание
83 последовательностей производилось при помощи программы UGENE от

84 UniPro (версия 1.31.0) [26]. Существующие на данный момент алгоритмы
 85 предсказания не способны с большой точностью и чувствительностью
 86 предсказывать линейные В-клеточные эпитопы. Поэтому для достижения
 87 большей точности в данном исследовании использовалось шесть методов с
 88 последующим обобщением полученных от каждого из них результатов. Все
 89 они реализованы как веб-инструменты и имеют свободный доступ. Мы
 90 использовали следующие методы: VeriPred [23], ElliPro [28], ABCPred [32],
 91 EpiToPIA [31], AAPPred [10, 12], COBEpro [36].

92

93 *Пептидный синтез и подготовка антигена для иммунизации.*

94 Пептиды, соответствующие линейным В-клеточным эпитопам NA, были
 95 химически синтезированы твердофазным методом (SPPS) [9]. Вкратце,
 96 использовался твердый носитель – 2-хлортритильная смола («Iris Biotech»,
 97 Германия). Последовательность пептидов наращивалась вручную.
 98 N-концевая α-аминогруппа была защищена временной Fmoc-группой
 99 (стратегия 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)/ трет-бутил (tBu) («Iris
 100 Biotech», Германия)). Активация α-аминогруппы *in situ* происходила с
 101 использованием 1,3-диизопропилкарбодиимида («Iris Biotech», Германия) в
 102 N,N-диметилформамиде («Вектон», Россия). Временную защиту Fmoc
 103 удаляли с помощью основного 20% 4-метилпиперидина («Вектон», Россия),
 104 растворенного в N,N-диметилформамиде, и постоянную защиту трет-бутила и
 105 боковой цепи трет-бутилоксикарбонила («Iris Biotech», Германия) с помощью
 106 трифторуксусной кислоты («Sigma-Aldrich», США) и H₂O/триизопропилсилан
 107 («Sigma-Aldrich», США)/1,2-этандитиол («Sigma-Aldrich», США) во время
 108 отделения от твердой подложки. Очистку пептидов осуществляли с помощью
 109 обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ
 110 ВЭЖХ), после чего образцы высушивали путем центрифугирования под
 111 вакуумом на установке SpeedVac (Savant, США). Чистота полученных

112 пептидов составляла не менее 95%, что было подтверждено аналитическим
113 электрофорезом, аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрическим
114 анализом (МАЛДИ; кроме того, подтверждение идентичности). Масс-спектры
115 пептидов регистрировали на приборе Ultraflexreme (Bruker, Германия) в
116 стандартных условиях: положительные ионы, рефлексный режим, матрица
117 -
118 4-гидрокси- α -цианокоричная кислота. Концентрацию пептидов в полученных
119 образцах определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность
120 растворов при длине волны 280 нм (если в состав пептида входили остатки
121 тирозина или триптофана) или при длине волны 214 нм (если в составе
122 молекулы пептида отсутствовали остатки данных ароматических
123 аминокислот), а затем рассчитывая их концентрацию с помощью
124 вычисленных на основе аминокислотного состава пептидов коэффициентов
125 молярной экстинкции [27].

126 Пептиды конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА)
127 («Sigma-Aldrich», США) для дальнейшей иммунизации экспериментальных
128 животных. Был использован глутаровый альдегид (ООО «БИО», Россия) в
129 качестве конъюгирующего реагента. Чтобы конъюгация с применением
130 данной методики была возможна, в состав аминокислотной
131 последовательности каждого пептида включали остаток лизина на С-конце
132 молекулы. Для получения конъюгата к 1 мг пептида добавляли 0,5 мл 0,1 М
133 натрий-фосфатного буфера (НФБ), pH 7,0. К полученному раствору добавляли
134 5 мг БСА, предварительно разведенного в 0,5 мл 0,1 М НФБ. К полученной
135 смеси добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,02% глутарового альдегида в
136 0,1 М НФБ. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем проводили
137 диализ против деионизированной воды в течение 24 ч при 4°C. Концентрацию
138 белка в конъюгате определяли по методу Брэдфорда [7]. Образование

139 конъюгатов контролировали методом масс-спектрометрии МАЛДИ,
140 используя линейный режим масс-анализа. Пример показан на рисунке 1.

141

142 *Оценка иммуногенности и защитной эффективности НА пептидов для*
143 *мышей.*

144 Экспериментальная работа с животными проводилась в согласно «Правилам
145 проведения работ с использованием экспериментальных животных» [4] и была
146 одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол №3/17
147 от 30.11.2017). В работе использовались самки мышей линии СВА (питомник
148 «Рапполово», Ленинградская область), по
149 14 животных в группе. Мышей иммунизировали интраперитонеально смесью
150 из трех пептидов (MNPNQKIIIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP),
151 конъюгированных с БСА, в концентрации 15 мкг/мл трехкратно с интервалом
152 2 недели. Для усиления иммуногенности смеси применялся неполный
153 адъювант Фрейнда («Sigma-Aldrich», США) в соотношении 2:1. Контрольным
154 мышам вводили стерильный фосфатно-солевой буфер (PBS, ООО «Биолот»).

155 Забор крови у иммунизированных мышей проводили через 2 недели после
156 третьей иммунизации, после чего животных делили на
157 2 группы и заражали интраназально вирулентными вирусами А/Южная
158 Африка/3626/13 (H1N1pdm09) или А/Гонконг/17гг 6:2 PR8 (H7N9), взятыми в
159 дозе 1 LD₅₀ (50%-ная летальная доза), в объеме 50 мкл. Выживаемость и
160 потерю веса у зараженных мышей оценивали ежедневно в течение 10 дней. У
161 части животных собирали легкие на 4-й и 8-й день после заражения и хранили
162 замороженными при -70°C. Гомогенаты тканей легких готовили с
163 использованием гомогенизатора TissueLyser LT («QIAGEN», Германия) в
164 1 мл стерильного PBS, содержащего антибиотик-антимикотик («Invitrogen»,
165 Великобритания). Затем гомогенаты откручивали при 6000 об/мин в течение 5

166 мин, а осветленные супернатанты использовали для определения титров
167 вирусов в РКЭ по описанной выше схеме.

168 Иммуногенность NA пептидов оценивали по содержанию вирус-
169 специфических IgG антител в сыворотках крови иммунизированных мышей.
170 Для разрушения термолабильных ингибиторов гемагглютинации сыворотки
171 прогревались при 56°C в течение 30 мин. Для удаления
172 NA-чувствительных ингибиторов гемагглютинации один объем цельной
173 сыворотки инкубировался 18-20 ч при 37°C в присутствии 3 объемов экстракта
174 нейраминидазы холерных вибрионов (RDE, Denka Seiken CO., LTD, Япония),
175 с последующей инактивацией фермента прогреванием проб при 56°C в
176 течение 1 ч. После этого к пробам добавляли 6 объемов стерильного PBS (т.е.
177 разведение исходной сыворотки 1:10).

178 Постановка иммуноферментного анализа (ИФА) проводилась согласно
179 опубликованной ранее методике [13], с некоторыми изменениями. Планшеты
180 («Sarstedt», Германия) покрывали различными вирусами
181 гриппа А, разведенными в PBS до 20 агглютинирующих единиц (АЕ). В
182 качестве блокирующего буфера использовали 1% овальбумин.
183 Использовались козьи анти-мышинные IgG антитела («Sigma-Aldrich», США),
184 меченые пероксидазой хрена, в разведении 1/20000. Проявление
185 пероксидазной реакции проводилось с добавлением 100 мкл ТМВ субстрата
186 («BD Biosciences», США). Ферментативную реакцию останавливали 100 мкл
187 1 Н серной кислоты, после чего оптическую плотность считывали на
188 спектрофотометре при длине волны 450 нм. За титр сыворотки принимали
189 наивысшее разведение образца, дающее оптическую плотность при длине
190 волны 450 нм, превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных
191 образцах более чем на 3 стандартных отклонения.

192

193 *Статистическая обработка результатов.*

194 Анализ данных проводили с использованием программ Statistica 10 и GraphPad
 195 Prism 6.0 (GraphPad Software Inc). Статистическую значимость различий
 196 между группами иммунизированных и контрольных мышей определяли либо
 197 при помощи непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (титры антител
 198 в сыворотках крови и титры вирусов в легких мышей), либо при помощи
 199 критерия Мантела-Кокса (выживаемость мышей после заражения). Различия
 200 считали достоверными при $p < 0,05$.

201

202 **Результаты**

203 *Консервативные линейные В-клеточные эпитопы.*

204 Используя методы по предсказанию В-клеточных эпитопов и
 205 проанализировав последовательности нейраминидаз различных вирусов
 206 гриппа А, мы обнаружили 8 консервативных линейных В-клеточных
 207 эпитопов, расположенных вокруг активного центра нейраминидазы (рис.2):

- 208 1) MNPNQKI (1-7)
- 209 2) MNPNQKIITIGS (1-12)
- 210 3) ILRTQESEC (222-230)
- 211 4) DNWKGSNRP (293-301)
- 212 5) SGYSG (404-408)
- 213 6) SWPDG (457-461)
- 214 7) EECSCYP (276-282)
- 215 8) VELIRGR (424-430)

216 В скобках указан порядковый номер аминокислот по нумерации N2.

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

220

221 *Иммуногенность NA пептидов.*

222 Титр сывороточных IgG антител определяли против ряда различных цельных
223 вирусов гриппа, представляющих различные подтипы NA (N1, N2, N3 и N9).
224 Было показано, что антитела из сывороток крови СВА мышей,
225 иммунизированных смесью трех пептидов, были способны реагировать с
226 различными антигенами (рис. 3). Так, среднегеометрические титры антител
227 (СГТ) были достоверно выше у вакцинированных мышей по сравнению с
228 животными контрольной группы для всех исследованных вирусов гриппа.

229

230 *Защитная эффективность NA пептидов.*

231 Для определения способности NA-специфичных антител обеспечивать защиту
232 против различных подтипов вируса гриппа А, иммунизированные мыши были
233 заражены двумя вирулентными вирусами гриппа: H1N1 и H7N9. Несмотря на
234 то, что иммунизация NA пептидами не защитила мышей от существенной
235 потери веса после инфицирования вирусом H1N1, все иммунизированные
236 мыши выжили в течение периода наблюдения, тогда как в контрольной группе
237 выживаемость составила только 28,6% (рис. 4А, В). Анализ вирусной нагрузки
238 в легких мышей, зараженных вирусом H1N1,
239 не выявил различий в титрах ни на 4, ни на 8 сутки после заражения, однако в
240 группе иммунизированных мышей у трех из пяти животных вирус полностью
241 элиминировался к 8 суткам, тогда как в контрольной группе вирус продолжал
242 размножаться у 100% мышей на 8 день после заражения (рис. 4С).

243 В отличие от инфекции, вызванной вирусом H1N1, иммунизация смесью NA
244 пептидов не защитила мышей от заражения летальным вирусом H7N9:
245 уровень летальности, потеря веса и титры вируса в легких были сопоставимы
246 у иммунизированных и контрольных мышей (рис. 4А-С). Эти данные
247 указывают на то, уровни анти-N9 антител, индуцированные иммунизацией
248 смесью исследуемых NA пептидов, являются недостаточными для защиты
249 мышей от клинических проявлений инфекции, вызванной вирусом H7N9.

250

251

Обсуждение

252 На сегодняшний день основным способом борьбы с гриппом является
253 активная иммунопрофилактика населения с помощью специфических вакцин.
254 Необходимость того, что все гриппозные вакцины, как живые, так и
255 инактивированные, должны оцениваться на соответствие и эффективность по
256 двум антигенам – гемагглютнину и нейраминидазе, обсуждалась ещё в 1970-
257 х гг. [14]. Несмотря на это, до сих пор все инактивированные вакцины
258 стандартизируются по содержанию НА, а количество НА в вакцине
259 различается у разных производителей [11, 19]. Однако основной проблемой
260 современных вакцин против гриппа является высокая степень антигенной
261 изменчивости НА, что приводит к необходимости актуализировать вакцинный
262 штамм практически ежегодно. В отличие от НА, NA подвергается гораздо
263 более медленному антигенному дрейфу, а некоторые консервативные участки
264 NA почти не изменяются в процессе эволюции [37]. В этой связи NA
265 рассматривается как перспективный антиген для разработки гриппозных
266 вакцин широкого спектра действия [22]. С одной стороны, улучшить
267 эффективность вакцинации можно за счет регламентирования минимального
268 содержания NA в противогриппозных вакцинах [17, 11]. С другой стороны,
269 консервативные эпитопы NA можно использовать при конструировании
270 универсальной гриппозной вакцины [18, 20], а также как дополнительный
271 компонент к уже имеющимся вакцинам [34, 38]. В последние годы ведется
272 активная работа по поиску моноклональных антител к ферментативному сайту
273 NA, обладающих широкой кросс-реактивностью в отношении вирусов гриппа
274 А различных подтипов, а также вирусов гриппа типа В [35]. Однако в
275 подавляющем большинстве случаев эпитопы для таких антител являются
276 пространственными и не могут быть использованы для конструирования
277 универсальных гриппозных вакцин на имеющихся вакцинных платформах. В

278 этой связи в настоящем исследовании мы сконцентрировались на поиске
 279 линейных В-клеточных эпитопов NA, консервативных среди различных
 280 вирусов гриппа А.

281 В 2013 г. Т. Дойл с соавт. [15] определил один из линейных В-клеточных
 282 эпитопов NA, консервативный для всех подтипов вируса
 283 гриппа А, иммунизация которым давала защиту от вирусов гриппа со всеми
 284 подтипами NA *in vitro* и частичную защиту *in vivo*. В нашем исследовании,
 285 используя методы биоинформатики, было выявлено наличие
 286 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг
 287 активного центра NA, которые могут рассматриваться как перспективные
 288 мишени для создания гриппозных вакцин широкого спектра действия. На
 289 начальном этапе для пептидного синтеза и последующей иммунизации мышей
 290 были выбраны три выявленных эпитопа NA: MNPNQKIITIGS [19],
 291 ILRTQESEC [15] и DNWKGSNRP [21]. Мы использовали их в качестве смеси
 292 для иммунизации экспериментальных животных, чего до настоящего времени
 293 никто не делал ранее. Смесь трех пептидов, соответствующих отобраным
 294 эпитопам NA, при внутрибрюшинном введении вызывала образование у
 295 мышей сывороточных антител, связывающихся с цельными вирусами гриппа
 296 различных подтипов NA (N1, N2, N3 и N9), что указывает на иммуногенность
 297 и кросс-реактивность NA пептидов. Полученные в настоящем исследовании
 298 данные показали способность индуцированных анти-NA антител защищать
 299 мышей от летальности, вызванной вирусом H1N1, но при этом животные не
 300 были защищены от смертности, вызванной вирусом H7N9. Эти результаты, с
 301 одной стороны, показали перспективность использования линейных В-
 302 клеточных эпитопов NA для дизайна эпитоп-направленных гриппозных
 303 вакцин нового поколения, так, в частности, можно использовать живую
 304 гриппозную вакцину в качестве вектора, где линейные эпитопы NA могут
 305 быть встроены в молекулу гемагглютинина, что существенно повысит их

306 содержание в вирионе и, как следствие, повысит их иммуногенность. С другой
307 стороны, полученные данные указывают на необходимость более глубокого и
308 полного исследования специфичности консервативных эпитопов NA, а также
309 оптимизации схем иммунизации для достижения более высоких показателей
310 защитной эффективности, что будет сделано в будущем.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Масс-спектры БСА (молекулярная масса - 66431 Да, верхний масс-спектр) и его конъюгатов с пептидом MNPNQKIITIGS (M, моноизотопная молекулярная масса 1314,7 Да, 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 $\pm 100-200$ Да.

Figure 1. Mass spectrometry of BSA (molecular weight 66431 Da, upper mass spectrum) and its conjugates with the peptide MNPNQKIITIGS (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 $\pm 100-200$ Da.

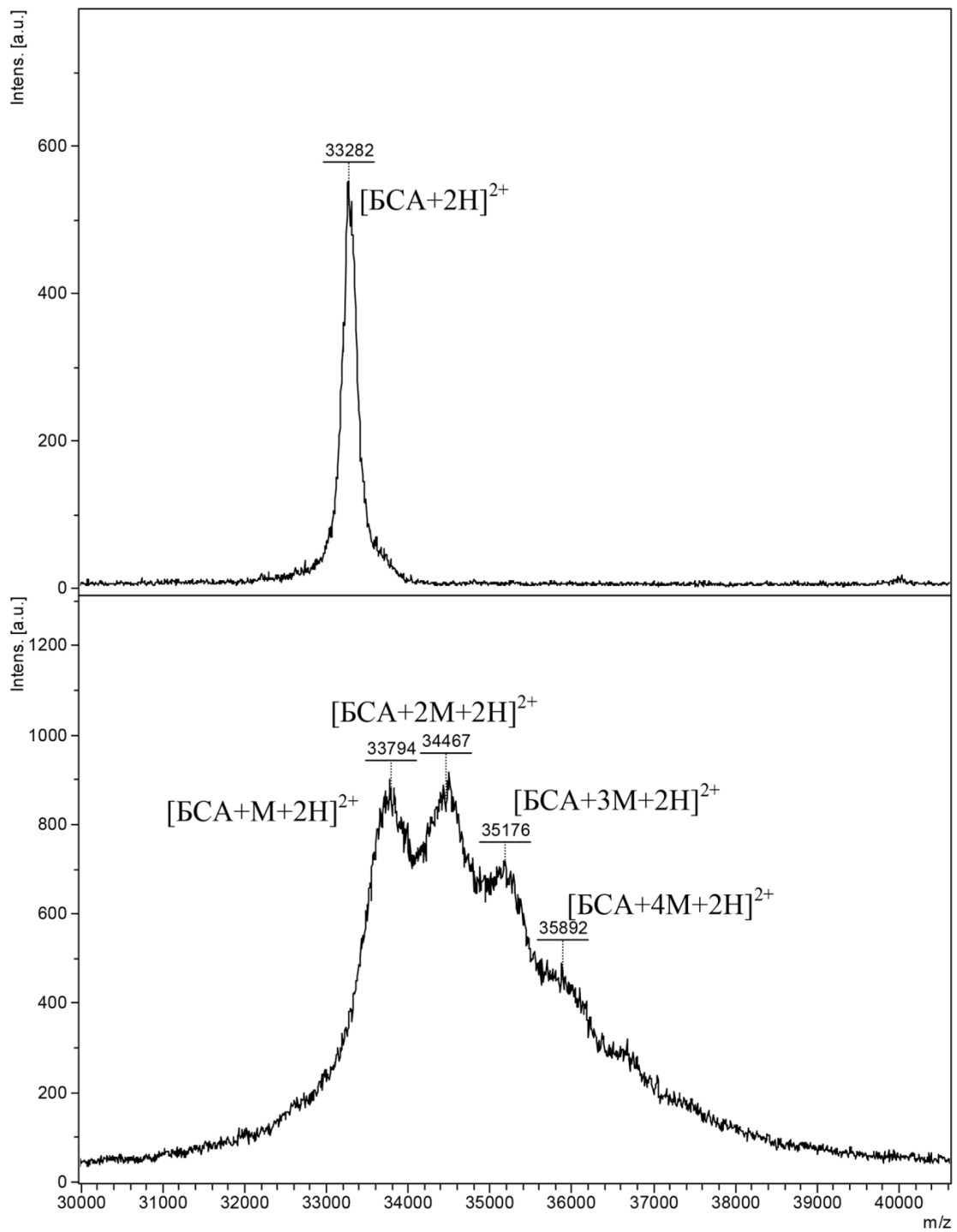


Рисунок 2. Визуализация пространственного расположения обнаруженных консервативных линейных В-клеточных эпитопов на мономере молекулы НА. Эпитопы расположены вокруг активного центра.

Figure 2. Localization of discovered conservative linear B-cell epitopes on the monomer of the NA molecule. Epitopes are located around the active site.

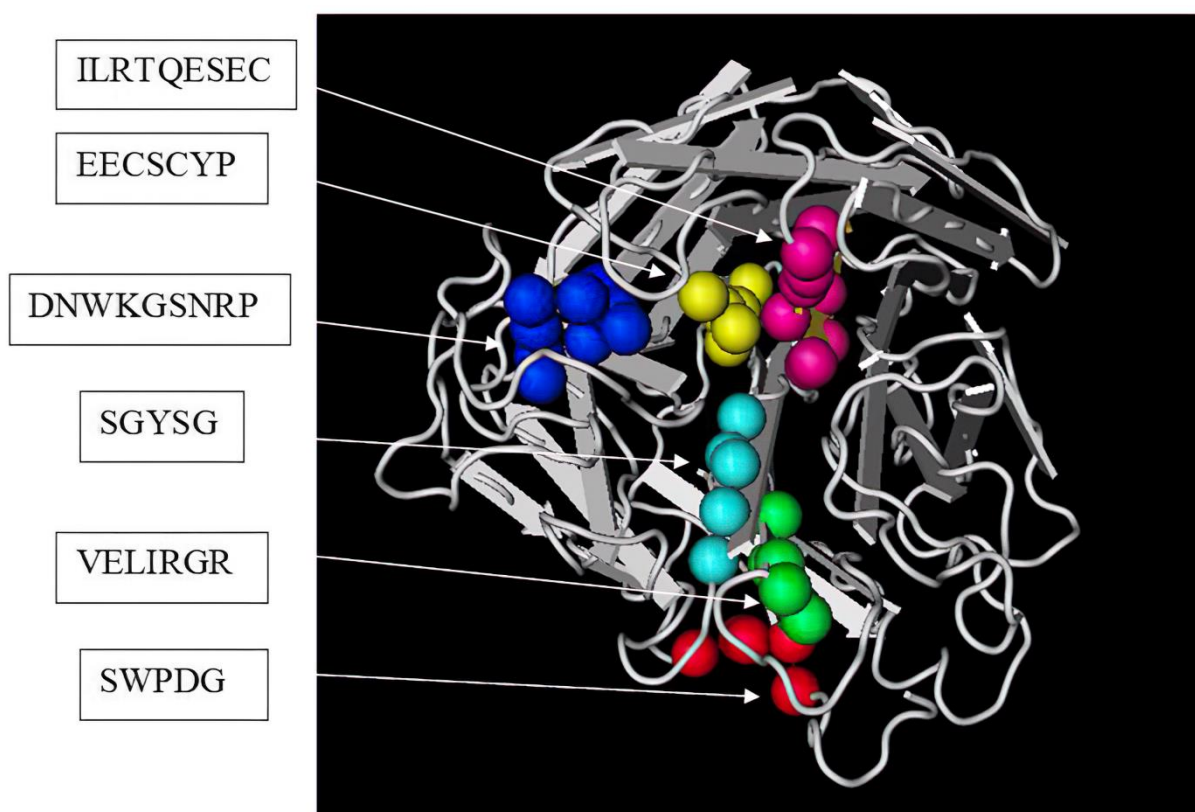


Рисунок 3. Иммуногенность смеси из трех NA пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Указаны цельновирионные антигены, использованные в ИФА, и содержащие N1 (А, В), N2 (С, D), N3 (Е) и N9 (F) подтипы нейраминидазы. Указаны индивидуальные значения титров сывороток иммунизированных и контрольных мышей,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

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

RN1/09-свиной (H7N1)

RN1/09-swine (H7N1)

Титры IgG антител в ИФА, \log_2

Titers of IgG antibodies by ELISA, \log_2

NA пептиды

NA peptides

Контроль

Mock

A/Индонезия/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1)

A/Indonesia/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1)

RN2/57-человек (H7N2)

RN2/57-human (H7N2)

RN2/97-птичий (H7N2)

RN2/97-avian (H7N2)

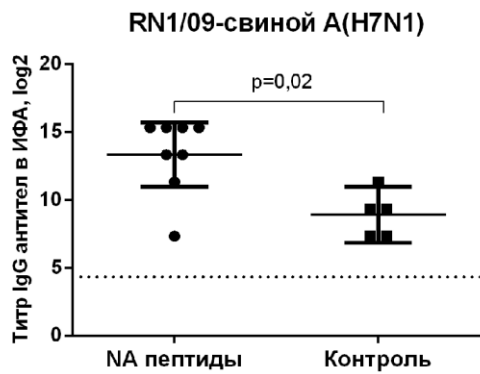
A/17/кряква/Нидерланды/00/95 (H7N3)

A/17/mallard/Netherlands/00/95 (H7N3)

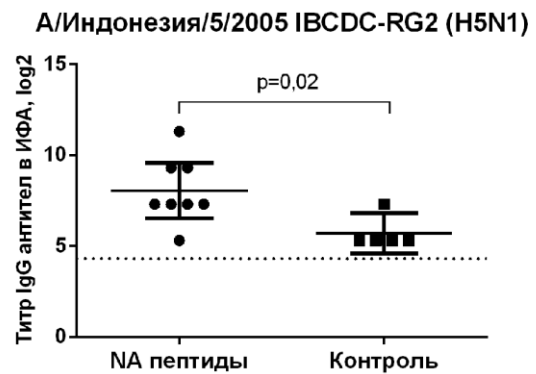
RN9/13-человек (H6N9)

RN9/13-human (H6N9)

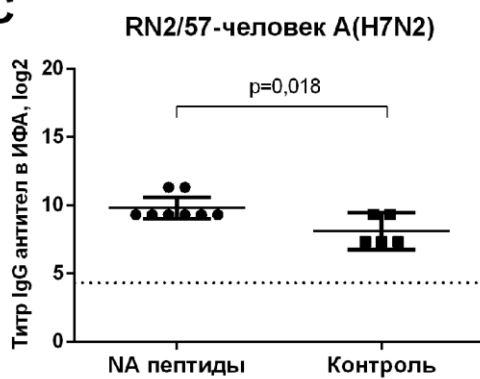
A



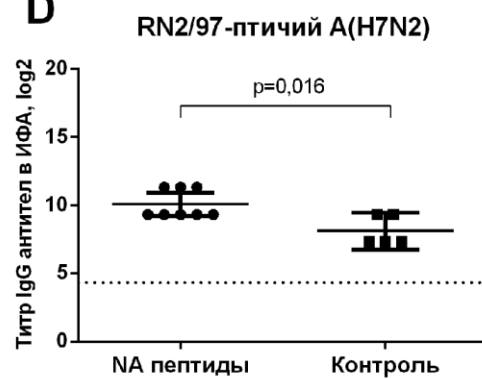
B



C



D



E



F

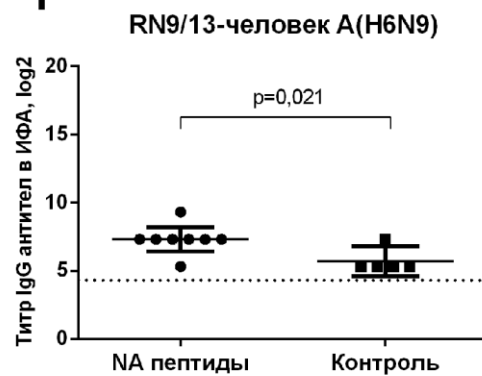


Рисунок 4. Защитная эффективность смеси из трех NA пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Оценку защитного эффекта вакцинации проводили по анализу потери веса животных (А), выживаемости (В) и титрам вирусов в легких мышей на 4 и 8 сутки после заражения (С). Пунктирная линия указывает на уровень детекции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

Figure 4. Protective efficacy of a mixture of three NA peptides for CBA mice. The protective effect of vaccination was assessed by monitoring animal weight loss (A), survival rates (B), and virus titers in the lungs of mice on days 4 and 8 after challenge (C). The dashed line indicates the limit of virus detection in the lung homogenates.

A/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09)

A/South Africa/3626/13 (H1N1pdm09)

День после заражения

Day post challenge

Масса тела, %

Body weight, %

NA пептиды

NA peptides

Контроль

Mock

A/Гонконг/17rg 6:2 PR8 (H7N9)

A/Honk Kong/17rg 6:2 PR8 (H7N9)

Выживаемость, %

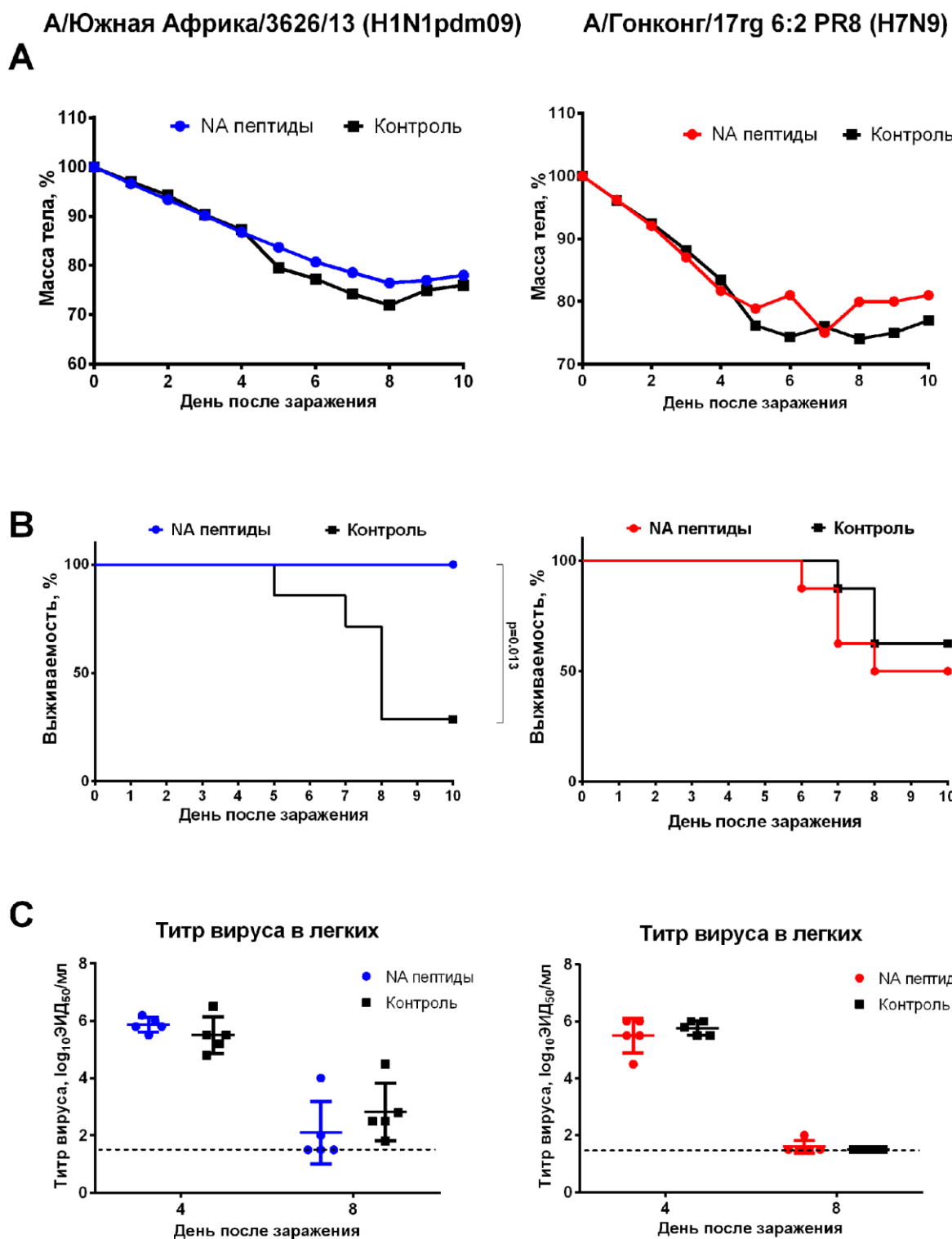
Survival, %

Титр вируса в легких

Virus titer in the lungs

Титр вируса, \log_{10} ЭИД₅₀/мл

Virus titer, \log_{10} EID₅₀/ml



МЕТАДАННЫЕ

Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А.

18 страниц текста, включая титульный лист и резюме. 4 рисунка.

Раздел: оригинальная статья.

Дата отправления: 12.12.19

Адрес для переписки:

Сычев Иван Александрович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.

Тел.: +7 (904) 638-04-18.

E-mail: sychev.ia@iemspsb.ru

Address for correspondence:

Sychev Ivan

Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”

197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12.

Phone: +7 (904) 638-04-18.

E-mail: sychev.ia@iemspsb.ru

Авторы:

Сычев И.А. – младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Sychev I.A. – MD, Junior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Копейкин П.М. – младший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Kopeikin P.M. – Junior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Цветкова Е.В. – к.б.н., доцент, кафедра биохимии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия.

Старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Tsvetkova E.V. – PhD, Associate Professor, The Department of biochemistry, FSBEI HE “Saint-Petersburg State University”, St. Petersburg, Russian Federation.

Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Чередова К.В. – лаборант-исследователь отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Cheredova K.V. – lab technician, Department of Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Мильман Б.Л. – д.х.н, зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Milman B.L. – ScD, Head of Laboratory for Mass Spectrometry, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Шамова О.В. – д.б.н., доцент, зав. отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Shamova O.V. – PhD, ScD, Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Исакова-Сивак И.Н. – д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Isakova-Sivak I.N. – PhD, ScD, Head of the Laboratory of immunology and prevention of viral diseases, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Дешева Ю.А. – д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Desheva Y.A. – MD, PhD, ScD, Senior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ

Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А

Induction of cross-reactive antibodies in mice immunized with conserved linear B-cell epitopes of influenza A virus neuraminidase

Авторы:

Сычев И.А.¹ – младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Sychev I.A.^a – MD, Junior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Копейкин П.М.¹ – младший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Kopeikin P.M.^a – Junior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Цветкова Е.В.^{1,2} – к.б.н., доцент, кафедра биохимии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия.

Старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Tsvetkova E.V.^{a,b} – PhD, Associate Professor, The Department of biochemistry, FSBEI HE “Saint-Petersburg State University”, St. Petersburg, Russian Federation.

Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Чередова К.В.¹ – лаборант-исследователь отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Cheredova K.V.^a – lab technician, Department of Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Мильман Б.Л.¹ – д.х.н., зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Milman B.L.^a – ScD, Head of Laboratory for Mass Spectrometry, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Шамова О.В.¹ – д.б.н., доцент, зав. отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Shamova O.V.^a – PhD, ScD, Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Исакова-Сивак И.Н.¹ – д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Isakova-Sivak I.N.^a – PhD, ScD, Head of the Laboratory of immunology and prevention of viral diseases, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Дешева Ю.А.¹ – д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Desheva Y.A.^a – MD, PhD, ScD, Senior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

1. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины».
2. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».
 - a. Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”.
 - b. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”.

Сокращённое название:

Консервативные эпитопы нейраминидазы

Conserved influenza NA epitopes

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

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

Адрес для корреспонденции:

Сычев Иван Александрович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.

Тел.: +7 (904) 638-04-18.

E-mail: sychev.ia@iemspb.ru

Address for correspondence:

Sychev Ivan

Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”

197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12.

Phone: +7 (904) 638-04-18.

E-mail: sychev.ia@iemspb.ru

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер	Источник на русском	Источник на английском	DOI/URL
1.	Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Штамм вируса гриппа A/17/mallard/Нидерланды/00/95(H7N3) для производства живой и производства инактивированной гриппозных вакцин. Патент на изобретение 2012108866 Российская Федерация, опубликовано: 20.09.2013, Бюллетень изобретений. № 26, 2014.	[Desheva Y.A., Rudenko L.G., Alexandrova G.I. The strain of influenza virus A/17/mallard/Netherlands/00/95 (H7N3) for the production of live and production of inactivated influenza vaccines. Patent for invention 2012108866 Russian Federation, published: 09.20.2013, <i>Byulleten` izobreteniy = Bulletin of inventions. No. 26, 2014</i> (In Russ)].	-
2.	Дешева Ю.А., Смолоногина Т.С., Руденко Л.Г. Реассортантный штамм вируса гриппа RN2/57-Human A(H7N2) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации. Патент на изобретение 2464312 Российская Федерация, опубликовано: 20.10.2012, Бюллетень изобретений. № 29, 2012.	[Desheva Y.A., Smolonogina T.S., Rudenko L.G. Reassortant strain of influenza virus RN2/57-Human A(H7N2) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. Patent for invention 2464312 Russian Federation, published: 10.20.2012, <i>Byulleten` izobreteniy = Bulletin of inventions. No. 29, 2012</i> .(In Russ)]	-
3.	Дешева Ю.А., Смолоногина Т.С., Руденко Л.Г., Киселева И.В., Ларионова	[Desheva Y.A., Smolonogina T.S., Rudenko L.G., Kiseleva I.V., Larionova N.V. Reassortant	-

	Н.В. Реассортантный штамм вируса гриппа RN 1/09-Swine A(H7N1) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации. Патент на изобретение 2428476 Российская Федерация, опубликовано: 10.09.2011, Бюллетень изобретений. № 25, 2011.	strain of influenza virus RN1/09-Swine A(H7N1) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. Patent for invention 2428476 Russian Federation, published: 09.10.2011, <i>Byulleten` izobreteniy = Bulletin of inventions. No. 25, 2011.</i> (In Russ)]	
4.	Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»	[Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 08/12/1977 "Measures to further improve organizational forms of work using experimental animals"]	-
5.	Смолоногина Т.С., Дешева Ю.А. Реассортантный штамм вируса гриппа RN9/13-Human A(H6N9) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации. Патент на изобретение 2587629 Российская Федерация, опубликовано: 20.06.2016. Бюллетень изобретений № 17, 2016.	[Smolonogina T.S., Desheva Y.A. Reassortant strain of influenza virus RN9/13-Human A(H6N9) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. Patent for invention 2587629 Russian Federation, published: 06.20.2016. <i>Byulleten` izobreteniy = Bulletin of inventions No. 17, 2016.</i> (In Russ)]	
6.	Бао Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., et al. The influenza virus resource at the National	-	-

	Center for Biotechnology Information. J. Virol., 2008, vol. 82, no. 2, pp. 596-601.		
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.	-	-
8.	Bui C., Bethmont A., Chughtai A.A., Gardner L., Sarkar S., Hassan S., et al. 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.	-	-
9.	Chan W.C., White P.D. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, 2000.	-	-
10.	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.	-	-
11.	Chen Y.Q., Wohlbold T.J., Zheng N.Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., et al. Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective	-	-

	neuraminidase-reactive antibodies. Cell, 2018, vol. 173, no. 2, pp. 417-429.		
12.	Davydov Y.I., Tonevitsky A. Prediction of linear B-cell epitopes. Molecular Biology, 2009, vol. 43, no. 1, pp. 150-158.	-	-
13.	Desheva J.A., Lu X.H., Rekestin A.R., Rudenko L.G., Swayne D.E., Cox N.J., et al. 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.		
14.	Dowdle W.R. Influenza anti-neuraminidase: the second best antibody. N. Engl. J. Med., 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1360-1361.	-	-
15.	Doyle T.M., Hashem A.M., Li C., Van Domselaar G., Larocque L., Wang J., et al. Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes. Antiviral research, 2013, vol. 100, no. 2, pp. 567-574.	-	-
16.	Eichelberger M.C., Monto A.S. Neuraminidase, the forgotten surface antigen, emerges as an influenza vaccine	-	-

	target for broadened protection. The Journal of infectious diseases, 2019, vol. 219, Supplement_1, pp. 75-80.		
17.	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. Current opinion in immunology, 2018, vol. 53, pp. 38-44.	-	-
18.	Gottlieb T., Ben-Yedidia T. Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine. Journal of autoimmunity, 2014, vol. 54, pp. 15-20.	-	-
19.	Gravel C., Li C., Wang J., Hashem A.M., Jaentschke B., Xu K.W., et al. 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.	-	-
20.	Herrera-Rodriguez J., Meijerhof T., Niesters H.G., Stjernholm G., Hovden A.O., Sorensen B., et al. A novel peptide-based vaccine candidate with protective efficacy against influenza A in a mouse	-	-

	model. <i>Virology</i> , 2018, vol. 515, pp. 21-28.		
21.	Huang P., Xu Y., Ni H., Zhong J., Zhang X., Tan S., et al. Linear B-cell epitope mapping of neuraminidases of the 2009 A H1N1 viruses based on immunoinformatics. <i>Vaccine</i> , 2011, vol. 29, no. 6, pp. 1278-1282.	-	-
22.	Krammer F., Fouchier R.A.M., Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw-Saliba K., Wan H., et al. NAction! How can neuraminidase-based immunity contribute to better influenza virus vaccines? <i>MBio</i> , 2018, vol. 9, no. 2, e02332-17.	-	-
23.	Larsen J.E., Lund O., Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. <i>Immunome Res.</i> , 2006, vol. 2, no. 1., p. 2.	-	-
24.	Murphy B.R., Kasel J.A., Chanock R.M. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. <i>N. Engl. J. Med.</i> , 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1329-1332.	-	-

25.	Nichol K.L. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. Vaccine, 2008, vol. 26, Supplement 4, pp. 17-22.		
26.	Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166-1167.	-	-
27.	Pace C.N. Evaluating contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding. Methods Enzymol., 1995, vol. 259, pp. 538-554.	-	-
28.	Ponomarenko J., Bui H.H., Li W., Fussedder N., Bourne P.E., Sette A., et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. BMC Bioinformatics, 2008, vol. 9, pp. 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.	-	-
30.	Reed L.J., Muench H.. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Epidemiology, 1938, vol. 27, no.3, pp. 493-497.	-	-

31.	Rubinstein N.D., Mayrose I., Martz E., Pupko T. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. BMC Bioinformatics, 2009, vol. 10, pp. 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.	-	-
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.	-	-
34.	Soema P.C., Rosendahl Huber S.K., Willems G.J., Jacobi R., Hendriks M., Soethout E., et al. Whole-inactivated influenza virus is a potent adjuvant for influenza peptides containing CD8(+) T cell epitopes. Frontiers in immunology, 2018, vol. 9, pp. 525.	-	-
35.	Stadlbauer D., Zhu X., McMahon M., Turner J.S, Wohlbold T.J., Schmitz A.J., et al. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase. Science, 2019, vol. 366, no. 6464, pp. 499-504.	-	-

36.	Sweredoski M.J., Baldi P. COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. <i>Protein Eng. Des. Sel.</i> , 2009, vol. 22, no. 3, pp. 113-120.	-	-
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. <i>Viruses</i> , 2014, vol. 6, no. 6, pp. 2465-2494.	-	-
38.	Xiao J., Zhang L., Wang Z., Xiang W., Lu P., Zhao Y., et al. Conserved peptides enhance immune efficiency of inactive vaccines against emerging avian influenza viruses in chicken. <i>Science China Life sciences</i> , 2017, vol. 60, no. 12, pp. 1340-1347.	-	-