

ВИРУСОЛОГИЯ / VIROLOGY

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.217>

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА В/МАССАЧУСЕТС/02/2012

Научная статья

Сорокин Е.В.<sup>1</sup>, Иванова А.А.<sup>2</sup>, Царева Т.Р.<sup>3</sup>, Комиссарова К.С.<sup>4</sup>, Амосова И.В.<sup>5</sup>\*, Комиссаров А.Б.<sup>6</sup>, Грудинин М.П.<sup>7</sup>

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0003-1732-1727;

<sup>3</sup> ORCID : 0000-0003-4757-0521;

<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-1465-5548;

<sup>5</sup> ORCID : 0000-0003-1769-0645;

<sup>6</sup> ORCID : 0000-0003-1733-1255;

<sup>7</sup> ORCID : 0000-0001-5283-7505;

<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sup> Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (amosova.23[at]mail.ru)

**Аннотация**

В статье представлены результаты картирования вируснейтрализующих эпитопов в молекуле гемагглютинаина вируса В/Массачусетс/2/12. Отбор эскейп-мутантов проводили с помощью восьми моноклональных антител, которые были впервые получены к тяжелой субъединице гемагглютинаина данного вируса. Наличие вируснейтрализующей активности у моноклональных антител позволило отобрать 16 эскейп-мутантов этого эталонного штамма. Секвенирование гена, кодирующего последовательность гемагглютинаина эскейп-мутантов В/Массачусетс/2/12, и сравнительный анализ предсказанных аминокислотных последовательностей с аминокислотной последовательностью гемагглютинаина исходного вируса, позволили идентифицировать замены аминокислотных остатков в положениях 136 и 141, 237 и 240, 196 и 202 в петлях – 140, – 240 и в спирали-190, соответственно. Выявлено, что все указанные замены аминокислотных остатков находятся в рецептор-связывающем кармане гемагглютинаина вируса гриппа В и оказывают влияние на его антигенную специфичность.

**Ключевые слова:** вирус гриппа В, гемагглютинин, моноклональные антитела.

ANTIGENIC STRUCTURE OF THE HAEMAGGLUTININ OF INFLUENZA VIRUS V/MASSACHUSETTS/02/2012

Research article

Sorokin E.V.<sup>1</sup>, Ivanova A.A.<sup>2</sup>, Tsareva T.R.<sup>3</sup>, Komissarova K.S.<sup>4</sup>, Amosova I.V.<sup>5</sup>\*, Komissarov A.B.<sup>6</sup>, Grudinin M.P.<sup>7</sup>

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0003-1732-1727;

<sup>3</sup> ORCID : 0000-0003-4757-0521;

<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-1465-5548;

<sup>5</sup> ORCID : 0000-0003-1769-0645;

<sup>6</sup> ORCID : 0000-0003-1733-1255;

<sup>7</sup> ORCID : 0000-0001-5283-7505;

<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russian Federation

\* Corresponding author (amosova.23[at]mail.ru)

**Abstract**

This article presents the results of mapping of viral neutralizing epitopes in the haemagglutinin molecule of V/Massachusetts/2/12 virus. Escape mutants were selected using eight monoclonal antibodies, which were first obtained against the heavy subunit of the haemagglutinin of this virus. The presence of virus-neutralising activity of the monoclonal antibodies allowed the selection of 16 escape mutants of this reference strain. Sequencing of the gene encoding the haemagglutinin sequence of the V/Massachusetts/2/12 escape mutants and comparative analysis of the predicted amino acid sequences with the amino acid sequence of the haemagglutinin of the original virus made it possible to identify substitutions of amino acid residues at positions 136 and 141, 237 and 240, 196 and 202 in loops-140, 240 and helix-190, respectively. All of these amino acid residue substitutions were found to be located in the receptor-binding pocket of influenza B virus haemagglutinin and affect its antigenic specificity.

**Keywords:** influenza B virus, haemagglutinin, monoclonal antibodies.

**Введение**

Вирусы гриппа вызывают ежегодные эпидемии глобального масштаба, которые являются причиной роста смертности в мире, представляя собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Большинство научных исследований посвящено главным образом вирусам гриппа А, тогда как знания об антигенной структуре поверхностных и внутренних антигенов вирусов гриппа В по-прежнему достаточно ограничены [1]. Согласно современным данным результатом эволюции вирусов гриппа В стало формирование Ямагатской (В/Ямагата/16/88) и Викторианской (В/Виктория/2/87) эволюционных линий в середине 1980-х годов. В человеческой популяции они циркулируют, по меньшей мере, с 2002 года [2], [3], [4]. Одна треть от общего числа заболеваний гриппом как

правило вызваны вирусом гриппа В [5], который у детей вызывает тяжелые формы [6]. Следует отметить, что показатели госпитализации и смертности, вызванные вирусом гриппа В, ниже, чем для вирусов гриппа А (H3N2), однако выше, чем для вирусов гриппа А (H1N1pdm09) [7]. Инфекции, вызванные этими вирусами клинически практически неразличимы, поражают все возрастные группы, при этом частота осложнений, как правило, выше у детей младшего возраста и пожилых людей [8], [9]. Диверсификация вирусов гриппа определяется модификациями в геноме, которые включают нуклеотидные замены, делеции и вставки, а также реассортацию, которая для вирусов гриппа В может происходить между и внутри линий [10], [11], [12]. Генетические эволюционные характеристики вирусов гриппа В определялись в различных географических регионах [13], [14], [15], [16], однако широкомасштабная эволюционная динамика вирусов гриппа В на полногеномном уровне исследована слабо [17], [18], [19]. Анализ эволюции вирусов гриппа В показал, что она происходит более медленно, в отличие от вирусов гриппа А [18]. Исследования показали, что гены, кодирующие белки полимеразного комплекса (PB1 и PB2) и гемагглютинина (ГА) вирусов обеих линий эволюционируют независимо даже при высоком уровне реассортации, это вероятно определяется геномной несовместимостью данных сегментов [11], [20]. Отмечается, что вирусы подобные В/Виктория/2/87 подвергаются более быстрому антигенному дрейфу [17]. Высказано предположение, что различия в эволюционной динамике двух линий обусловлены разными предпочтениями связывания гемагглютинина с клеточным рецептором. В/Виктория/2/87 подобные вирусы способны связываться с клеточными рецепторами в позициях -2,3 и -2,6; в то время как В/Ямагата/16/88 подобные вирусы связываются с остатками сиаловой кислоты исключительно в позиции -2,6 в дыхательных путях человека [21].

В связи с вышеизложенным мониторинг изменений антигенной структуры поверхностного белка гемагглютинина вирусов гриппа В, и рецептор-связывающих характеристик вируса остаются актуальными задачами, имеющими как научную, так и важную с практической точки зрения значимость. Использование в современной вирусологии вируснейтрализующих моноклональных антител (моноАТ), которые направлены к конкретным иммуногенным сайтам поверхностного антигена, а также, методологии отбора и изучения эскейп-мутантов (ЭМ), позволяет мониторировать возникновение новых генетических/антигенных модификаций вирусов.

#### **Методы и принципы исследования**

**Вирусы гриппа В** получены из коллекции вирусов гриппа и ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

##### *Получение вирусосодержащей аллантоисной жидкости*

Вирусы гриппа культивировали в аллантоисной полости развивающихся куриных эмбрионов согласно Методическим рекомендациям «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 18 апреля 2006 г. № 0100/4430-06-34). Для получения аллантоисной жидкости, содержащей вирус гриппа, 10-11-дневные куриные эмбрионы заражали вирусом гриппа В в дозе от 10 до 100 ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл, инкубировали 72 часа при температуре 33 ± 0,5° С. Затем эмбрионы охлаждали при температуре +4° С и аллантоисную жидкость, содержащую вирус, собирали и контролировали гемагглютинирующую активность.

##### *Реакция гемагглютинации (РГА), реакция торможение гемагглютинации (РТГА)*

РГА и РТГА проводили в соответствии с Методическими рекомендациями «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 18 апреля 2006 г. № 0100/4430-06-34) [22]. За титр антител принимали наибольшее разведение, при котором полностью подавляется гемагглютинация 4 ГАЕ вируса.

##### *Получение гибридом*

Гибридомы – продуценты моноАТ к штамму вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 Ямагатской линии получали по методу [23] в следующей модификации. Мышей линии Balb/c иммунизировали внутрибрюшинно 70 мкг очищенного концентрата вируса, который был получен ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Через несколько недель мыши были бустированы очищенным концентратом вируса в дозе 50 мкг/мышь. Через три дня после бустирования проводили слияние спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышинной миеломы линии X63Ag8.653 в соотношении 10:1 в присутствии 50% раствора полиэтиленгликоля-2000 в среде Игла DMEM («БиоЛот», Россия). Клонирование гибридом проводили методом предельных разведений. Первичное тестирование клонов проводили иммуноферментным анализом. Гибридные клоны с заданным спектром реагирования реклонировали на селективной среде НАТ («Sigma»). Стабильные клоны гибридом – продуцентов специфических моноАТ криоконсервировали, и в дальнейшем применяли для стимуляции образования асцитов.

##### *Получение эскейп-мутантов*

Для отбора ЭМ, штаммы исходного вируса клонировали в присутствии избытка отобранных моноАТ, обладающих выраженной вируснейтрализующей активностью [24]. Смесь вирус-моноАТ инкубировали в течение часа при 37° С, после чего инфицировали куриные эмбрионы, через 72 часа отбирали аллантоисную жидкость и анализировали в РГА. Отобранные эскейп-мутанты клонировали 3 раза методом предельных разведений, после чего исследовали их способность реагировать с гомологичными и гетерологичными моноАТ.

##### *Секвенирование эскейп-мутантов*

Для секвенирования гена НА ЭМ вируса гриппа В/Массачусетс/2/12 РНК выделяли коммерческим набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия).

РТ-ПЦР. Для амплификации фрагментов гена гемагглютинина применяли набор реагентов AgPath-ID One-step RT-PCR Kit (Ambion, США). Анализ апликонов проводили гель-электрофорезом в 1,7% агарозном геле. Фотосъемка осуществлялась системой мультиплексной визуализации ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, США).

Для выделения ДНК ампликонов использовали два метода: набором PCR Purification kit (Quiagen, Германия) или выделяли с помощью DEAE бумаги. Концентрацию ДНК после выделения определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo, США).

Для секвенирования методом Сэнгера применяли коммерческий набор реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). В состав реакционной смеси входили: BigDye Terminator – 1 мкл, 5X Sequencing Buffer – 4 мкл, праймер – 1 мкл, ДНК (из расчета 50 нг ДНК в конечном объеме смеси – 10 мкл) – 5 мкл. Конечный объем смеси – 10 мкл. Для увеличения глубины секвенирования каждая реакция была поставлена в двух повторах. Программа секвенирующей реакции: 96оС – 10 сек, 50оС – 5 сек, 60оС – 4 мин (25 циклов). Реакцию секвенирования проводили в термоциклере BioRad CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler (BioRad, США). Для определения нуклеотидной последовательности использовали 4-канальную автоматизированную систему капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов ABI prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Для капиллярного электрофореза использовали полимеры ABI prism3130 POP-7.

Сборка, хранение и обработка полученных нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей осуществлялись в программе Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США). Для множественного выравнивания полученных нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями ГА референсного штамма использовали программу Vector NTI 10 Advance и алгоритм CLUSTAL W.

### Основные результаты

#### Характеристика моноАТ к вирусу гриппа В/Массачусетс/2/12 в РТГА

РТГА основана на способности антител ингибировать взаимодействие гемагглютинина с эритроцитарными рецепторами. Значимость данной реакции заключается в возможности оценки уровня взаимодействия моноАТ с антигенными сайтами прежде всего в районе «рецепторного кармана» гемагглютинина. «Рецепторный карман» является исключительной мишенью для вируснейтрализующих моноАТ, блокирующих взаимодействие вируса с клеточным рецептором. Рецепторная область представляет собой вариабельную часть молекулы гемагглютинина, претерпевающую наибольшие изменения в процессе эволюции вируса в результате антигенного дрейфа. Благодаря этому вирус ускользает от действия вируснейтрализующих антител. Взаимодействие моноАТ с гемагглютинином отобранных штаммов в РТГА позволяет оценить антигенные штаммовые различия в рецепторной области, что имеет большое и практическое, и теоретическое значение. МоноАТ к штамму В/Массачусетс/2/12 (Ямагата) проявляли выраженную антигемагглютинирующую активность исключительно к вирусам, относящимся к этой эволюционной ветви (табл. 1).

Таблица 1 - Взаимодействие моноАТ к В/Массачусетс/2/12 с различными штаммами вируса гриппа В в РТГА

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.217.1>

Вирус	Штамм	Титр моноАТ в РТГА							
		1G4	1G9	2B10	3B12	3C2	4E11	5B11	5F11
Вирус подобные В/ Yamagata/ 16/88	<b>В/ Massachusetts /2/12</b> (генетическая линия 2)	<b>1:3276 80</b>	<b>1:655 360</b>	<b>1:655 360</b>	<b>1:3276 80</b>	<b>1:3276 80</b>	<b>1:2048 0</b>	<b>1:655 360</b>	<b>1:655 360</b>
	В/ Yamagata/ 16/88	1:10 240	1:81 920	1:40 960	1:10 240	1:20 480	1:20 480	1:163 840	1:20 480
	В/ Panama /45/90	1:163 840	1:655 360	1:163 840	1:20 480	1:40 960	1:40 960	1:81 920	1:81 920
	В/ Harbin/ 7/94	1:163 840	1:655 360	1:327 680	1:163 840	1:163 840	1:81 920	1:327 680	1:655 360
	В/ Yamanashi/ 168/98	1:81 920	1:655 360	1:327 680	1:40 960	1:81 920	1:81 920	1:163 840	1:327 680
	В/ Victoria/ 504/00	1:327 680	1:655 360	1:81 920	1:81 920	1:81 920	1:40 960	1:163 840	1:327 680

	В/ Shanghai/ 361/02	1:5 120	1:40 960	1:20 480	1:20 480	1:81 920	1:20 480	1:81 920	1:81 920
	В/ Florida/ 07/04	1:20 480	1:40 960	1:20 480	1:20 480	1:40 960	1:20 480	1:40 960	1:40 960
	В/ Florida/ 04/06 (генети ческая линия 1)	1:40 960	1:40 960	1:40 960	1:40 960	1:81 920	1:20 480	1:81 920	1:81 920
	В/ Phuket/ 3073/1 3 (генети ческая линия 3)	1:5 120	1:40 960	1:20 480	1:20 480	1:40 960	1:20 480	1:4096 0	1:40 960
Вирус ы подобн ые В/ Victori a /2/87	В /Shandong/7/9 7	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В /Malaysia/250 6/04	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В/ Brisbane/60/08	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В/ Brisbane/45/15	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
Штамм ы вирусо в гриппа В, выделе нные до раздел ения вирусо в на эволюц ионны е линии	В/Li/40	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В/Great Lakes/5 4	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В/ Russia/ 69	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В/Hong Kong5/ 72	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В/ Singapore/ 222/79	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	В/ USSR/ 100/83	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80

Следует подчеркнуть, что все моноАТ взаимодействовали со штаммами выделенными, начиная с В/Ямагата/16/88, а также со штаммами, относящимися к генетическим группам 1 (В/Флорида/04/06) и 3 (В/Пхукет/3073/13), которые наиболее широко распространены в мире [25], [26]. Таким образом, данные РТГА позволяют говорить, что моноАТ, полученные к гемагглютинирующему штамму В/Массачусетс/2/12, актуальны с точки зрения идентификации новых изолятов. Кроме того, следует отметить, что моноАТ не ассоциировали со штаммами ранних лет выделения, а также со штаммами Викторианской ветви.

*Отбор ЭМ вируса В/Массачусетс/2/12 с помощью моноАТ*

В результате проведенных исследований подтверждено, что эскейп-мутанты, полученные с помощью вируснейтрализующих моноАТ, стали незаменимым инструментом для мониторинга изменчивости антигенной структуры ГА и поиска иммунодоминантных эпитопов в структуре ГА1. Установлено, что полученные ЭМ содержали до трех мутаций в гене ГА, которые приводили к специфичным аминокислотным заменам. При этом в РТГА с ЭМ наблюдали 8-32-х-кратное и более снижение титров моноАТ, которые использовали для отбора ЭМ по сравнению с исходным вирусом. Таким образом, было получено 16 ЭМ, устойчивых к действию каждого из моноАТ, в частности, было получено по два ЭМ под действием моноАТ 2В10, 3В12, 3С2, 1Г4, 1Г9 и 4Е11, три – моноАТ 5В11 и один – моноАТ 5F11.

#### Выявление иммунодоминантных эпитопов в молекуле гемагглютинина вируса В/Массачусетс/2/12

Для выявления иммунодоминантных эпитопов было проведено секвенирование ГА ЭМ вируса В/Массачусетс/2/12. Анализ предсказанной структуры ГА ЭМ вируса В/Массачусетс/2/12 в сравнении со структурой ГА исходного вируса позволил выявить замены аминокислот в шести положениях. Более того, все замены были расположены в районе рецептор-связывающего сайта (РСС) ГА, и касались петель-140, -240, и спирали-190. Исследование двух ЭМ, для моноАТ 1Г9, позволило установить, что ЭМ 1Г9/1 содержал две замены, в частности глицина на глутаминовую кислоту в положении 141 (Gly → Glu) и глицина на аргинин в положении 237 (Gly → Arg). Аминокислотная замена глицина на глутаминовую кислоту в 141 положении (Gly → Glu) была выявлена также у ЭМ 2В10/1, 2В10/2, 3С2/1, 3С2/2, 1Г4/1, 1Г4/2. ЭМ 1Г9/2 содержал единственную замену 237 Gly → Arg. Выявлено, что ЭМ 3В12/1, отобранный с помощью моноАТ 3В12, содержал единственную замену пролина на глутамин в 240 положении, а ЭМ 3В12/2 0150 две замены - Pro на Gln в 240 и Asn на Lys в 202 положениях, соответственно. Остаток-240 ГА1, по-видимому является частью антигенного сайта, который частично совпадает с антигенным сайтом D ГА штаммов гриппа А субтипа Н3 [27] и антигенным сайтом Ca1 ГА штаммов гриппа А субтипа Н1 [28], [29]. Подобные замены Pro → Gln или Thr в 240 положении ранее были обнаружены среди вирусов гриппа В до их расхождения на две эволюционные ветви [30], а изменение Pro 240 Ser – у штаммов Викторианской ветви [31]. Подобные замены ранее выявлялись у вирусов ветви Ямагата [32]. В исследовании с использованием моноАТ 5В11 было получено три ЭМ. Две одинаковые замены в 136 и 240 положениях, Arg → Ile и Pro → Ser, соответственно, содержали ЭМ 5В11/1 и 5В11/3, тогда как ЭМ 5В11/2 кроме замены Arg → Ile в 136 положении имел также аминокислотную замену Gly → Glu в 141 положении.

Следует отметить, что замена-136 имеет важное значение в структуре РСС - остаток Arg в 136 положении обнаружен у 98% вирусов Ямагатской ветви и только у 1% вирусов Викторианской ветви, а штаммы 1972-1982 годов выделения имеют остаток изолейцина [33].

В результате пассирования под давлением моноАТ 5F11 был получен только один ЭМ, который имел две замены: в 136 положении Arg → Ile и в 196 положении Asp → Gly. Выше отмечалось, что изменения в 136 положении в петле-140, значимо для формирования структуры рецептор-связывающего сайта. Замена остатка - 196 входящего в спираль -190, влияет на формирование верхней кромки рецептор-связывающего кармана (РСК) ГА вирусов гриппа В. Кроме того, набор остатков-196 на участке 196-198 определяет наличие/отсутствие потенциального сайта N-гликозилирования. ЭМ 4Е11/1 и 4Е11/2 содержали единственную замену Asn 202 Lys, которая располагается в спирали -190 и участвует в образовании РСК. Расположение всех выявленных аминокислотных замен в ГА ЭМ В/ Массачусетс /2/12 представлено на рис. 1.

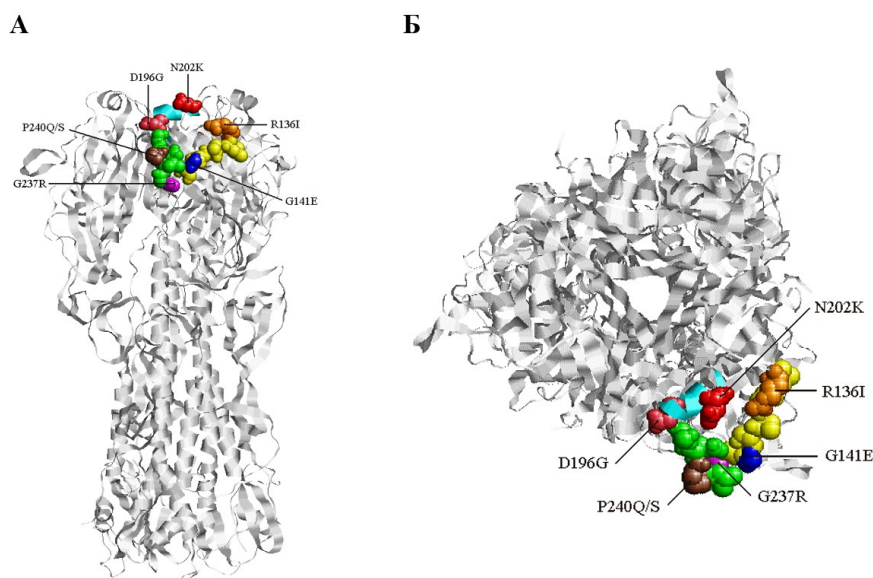


Рисунок 1 - Расположение аминокислотных замен в молекуле HA1 эскейп-мутантов вируса В/ Массачусетс /2/12

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.217.2>

Примечание: А – вид сбоку, Б – вид сверху

На рисунке показано расположение иммунодоминантных эпитопов на пространственной трехмерной модели молекулы ГА1, которая построена на основе идентифицированных эпитопов в ЭМ и опубликованных данных по кристаллической структуре молекулы ГА вируса гриппа В/Яманаши/166/98, PDB code: 4M40 [33], с помощью программы RasMol, версия 2.7.4.2. А – вид сбоку, Б – вид сверху.

На основании представленных данных можно сделать заключение, что идентифицированные в ходе исследования замены вовлечены в формирование ГА вируса В/Массачусетс/2/12 и влияют на способность связываться с моноАТ.

*Влияние замен аминокислотных остатков в молекуле ГА ЭМ вирусов гриппа В/Массачусетс/2/12 на характер взаимодействия с моноАТ*

Для оценки влияния замен на характер взаимодействия вируса с моноАТ, было изучено их взаимодействие с ЭМ в перекрестной РТГА (табл. 2). Согласно полученным результатам, все ЭМ слабо реагировали с гомологичными моноАТ, с помощью которых они были получены. В этом случае титры моноАТ варьировали от 1/64 в случае моноАТ 1G4 до 1/2048 в случае моноАТ 5F11.

Таблица 2 - Взаимодействие эскейп-мутантов вируса В/Массачусетс/2/12 с моноАТ в РТГА

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.217.3>

Эскейп-мутант	АК замена(ы)	Область рецептор-связывающего кармана	Сайт	Титр моноАТ в РТГА							
				1G4	1G9	2B10	3B12	3C2	4E11	5B11	5F11
				G141 → E	G141 → E G237 → R	G141 → E	N202 → K P240 → Q	G141 → E	N202 → K	R136 → I G141 → E P240 → S	R136 → I D196 → G
1G4/1	G141 → E	петля 140	ВА	<b>1:5120</b>	1:2560	1:1280	1:81920	<b>1:640</b>	1:2560	1:655360	1:327680
1G4/2	G141 → E	петля 140	ВА	<b>1:5120</b>	1:2560	1:1280	1:81920	1:640	1:5120	1:655360	1:327680
1G9/1	G141 → E G237 → R	петля 140 петля 240	ВА ----	1:10240	<b>1:1280</b>	1:640	1:40960	1:640	10240	1:327680	1:163840-327680
1G9/2	G237 → R	петля 240	----	1:10240	<b>1:640</b> - <b>1:1280</b> <b>0</b>	1:640	1:40960	1:640	1:5120-10240	1:163840-327680	1:81920-1:163840
2B10/1	G141 → E	петля 140	ВА	1:5120	1:640-1280	<b>1:640</b>	1:81920	1:320	1:5120	1:327680	1:327680
2B10/2	G141 → E	петля 140	ВА	1:5120	1:640-1280	<b>1:640</b>	1:163840	1:320	1:5120	1:327680	1:327680
3B12/1	P240 → Q	петля 240	----	1:81920	1:40960-81920	1:20480-40960	<b>1:1280</b> <b>0</b>	1:2560	1:1280	1:327680	1:640
3B12/2	N202 → K P240 → Q	α-спираль 190 петля 240	ВВ1 ----	1:1280	1:5120	1:2560	<b>1:80</b>	1:640	1:80	1:5120	1:5120
3C2/1	G141 → E	петля 140	ВА	1:5120	1:2560	1:1280	1:163840	<b>1:640</b>	1:5120	1:655360	1:655360
3C2/2	G141 → E	петля 140	ВА	1:5120	1:1280	1:1280	1:163840	<b>1:640</b>	1:5120	1:655360	1:655360
4E11/1	N202 → K	α-спираль 190	ВВ1	1:5120	1:163840	1:81920	1:20480-40960	1:163840	<b>1:160</b>	1:327680	1:327680
4E11/	N202	α-	ВВ1	1:5120	1:163840	1:81920	1:40960	1:163840	<b>1:160</b>	1:327680	1:327680

2	→К	спираль 190		0	840	920	60	840		680	680
5B11/ 1	R136 →I P240 →S	петля 140 петля 240	BA ----	1:163 840	1:163 840	1:81 920	1:80	1:163 840	1:102 40- 2048 0	<b>1:320</b> <b>-640</b>	1:80
5B11/ 2	R136 →I G141 →E	петля 140 петля 140	BA BA	1:640	1:512 0	1:256 0	1:80	1:256 0	1:256 0	<b>1:102</b> <b>40</b>	1:160 - 1:320
5B11/ 3	R136 →I P240 →S	петля 140 петля 240	BA ----	1:163 840	1:327 680	1:163 840	1:80	1:327 680	1:204 80	<b>1:640</b>	<1:80
5F11	R136 →I D196 →G	петля 140 α- спираль 190	BA BB1	1:327 680	1:655 360	1:327 680- 1:655 360	1:80- 160	1:327 680	1:204 80	1:256 0	<b>1:320</b>
<b>В/ Масс ачу сетс/ 2/12</b>	----- -	----- -	-----	<b>1:327</b> <b>680</b>	<b>1:655</b> <b>360</b>	<b>1:655</b> <b>360</b>	<b>1:327</b> <b>680</b>	<b>1:327</b> <b>680</b>	<b>1:204</b> <b>80</b>	<b>1:655</b> <b>360</b>	<b>1:655</b> <b>360</b>

МоноАТ 1G4, 2B10 и 3C2, узнающие эпитоп в 141 положении, показали значительное снижение титров со всеми ЭМ, несущими замену 141Gly → Glu. В тоже время, моноАТ 1G4 также имели заметное снижение титра до 1/32 при взаимодействии с ЭМ 1G9/2, несущим замену Gly → Arg в 237 положении; ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 с заменой Asn → Lys в положении 202 до 1/64 титра; ЭМ 3B12/2, содержащий замены Asn → Lys в 202 и Pro → Gln в 240 положении до 1/256 титра. Не выявлено существенного снижения титра при взаимодействии с ЭМ 3B12/1 с единичной заменой Pro → Gln в 240 положении (1/4 титра). МоноАТ 1G4 реагировали с ЭМ 5B11/1 и 5B11/3, содержащими замены Arg 136 Ile и Pro 240 Ser, и с ЭМ 5F11, содержащим замены Arg 136 Ile и Asp 196 Gly, как и с исходным вирусом (1-1/2 титра). Таким образом, установлено, что моноАТ 1G4 распознает эпитопы в положениях 141, 202 и 237.

МоноАТ 2B10 показали снижение взаимодействия до 1/16 титра с ЭМ 3B12/1 (замена Pro → Gln в 240 положении) и 1/256 с ЭМ 3B12/2 (замены Asn → Lys и Pro → Gln в 202 и 240 положениях, соответственно). При этом моноАТ 2B10 взаимодействовали до 1/8 титра с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (Asn 202 Lys). ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 (Arg 136Ile и Pro 240 Ser) реагировали с моноАТ 2B10 до 1/4-1/8 титра. Можно предполагать, что замены в положениях 202 и 240, Asn → Lys и Pro → Gln, соответственно, особенно в совокупности, значимы для связывания с моноАТ 2B10.

МоноАТ 3C2, в отличие от моноАТ 2B10 и моноАТ 1G4, практически не потеряли способности взаимодействовать с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2, содержащими Lys-202, однако, резкое снижение титров наблюдали в реакции с ЭМ 3B12/1, содержащим замену Pro → Gln в 240 положении до 1/128 и ЭМ 3B12/2, содержащим Lys-202 и Gln-240 до 1/512 титра. Изменения Arg 136 Ile в, Pro 240 Ser и Asp 196 Gly не отразились на способности моноАТ взаимодействовать с ЭМ. Можно предположить, что в этом варианте, помимо эпитопа в 141 положении, в случае моноАТ 3C2 существенным моментом является конкретный остаток в 240 положении.

МоноАТ 1G9, распознающие замены в 141 и 237 положениях, слабо реагировали с ЭМ, имеющими замены в 141 и 237 положениях. МоноАТ 1G9 проявляли незначительное уменьшение титров взаимодействуя с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (Asn 202Lys) до 1/4, до 1/8-1/16 с ЭМ 3B12/1 (Pro 240 Gln) и резкое падение титров с ЭМ 3B12/2 (остаток лизина и глутамин в 202 и 240 положениях). ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 (остаток изолейцина и серина в 136 и 240 положениях, соответственно) связывались с моноАТ на 1/2 – 1/4 титра, а ЭМ 5F11 (остаток изолейцина-136 и глицина-196) взаимодействовал с моноАТ 1G9 подобно исходному вирусу.

МоноАТ 3B12 распознавали остатки аспарагина-202 и пролина-240. МоноАТ 3B12 проявляли одинаковый характер реагирования с ЭМ 1G4, 2B10 и 3C2 (Gln → Glu в 141 положении) до 1/2-1/4 титра. МоноАТ 3B12 одинаково взаимодействовали до 1/8 с ЭМ 1G9/2 (Gln → Arg в 237 положении) и ЭМ 1G9/2, имеющим две замены Gln 141 Glu и Gln 237 Arg. Аналогичное взаимодействие было с ЭМ 4E11/1 и 4E11/2 (Asn 202 Lys). При этом, моноАТ 3B12 взаимодействовали до 1/256 с ЭМ 3B12/1 (замена Pro → Gln в 240 положении) и полностью перестали реагировать с ЭМ 3B12/2 (замены Asn → Lys и Pro → Gln в 202 и 240 положениях, соответственно). Аналогично, моноАТ 3B12 утратили способность к связыванию с ЭМ 5B11/1 и 5B11/3 (замены Arg → Ile и Pro → Ser в 136 и 240 положениях, соответственно), ЭМ 5B11/2 (замены Arg → Ile и Gln → Glu в 136 и 141 положениях, соответственно). Также моноАТ 3B12 практически полностью перестали реагировать с ЭМ 5F11 (замены Arg → Ile и Asp → Gly в 136 и 196 положениях, соответственно). Таким образом, вероятно, для моноАТ 3B12 наиболее значимыми являются остатки в 240 и 136 положениях, и в меньшей степени – аминокислотные остатки в 202 положении. Анализ ЭМ 4E11 установил

специфичность моноАТ 4Е11 к эпитопу в 202 положении. Действительно, моноАТ 4Е11 взаимодействовали с ЭМ 4Е11/1 и 4Е11/2, содержащими замену Asn → Lys в 202 положении на 1/128 по сравнению с исходным вирусом. Произошла полная утрата способности взаимодействия с ЭМ 3В12/2, содержащим замены Asn → Lys в 202 и Pro → Gln в 240 положениях и значительная – до 1/16 титра с ЭМ 3В12/1 (замена Pro → Gln в 240 положении). Менее значительное снижение титров (на 1/8) произошло в реакции с ЭМ 5В11/2 (замены Arg → Ile в 136 и Gly → Glu в 141 положениях). МоноАТ 5В11, по данным секвенирования ЭМ, были специфичны к эпитопам в положениях 136, 240 и 141. Вызывает удивление тот факт, что моноАТ 5В11 взаимодействовали с ЭМ 1G4, 2В10 и 3С2, имеющими замену Gly → Glu в 141 положении, практически, как и с диким вирусом (отличия в РТГА не более 1/2). При этом, моноАТ 5В11 слабо реагировали с ЭМ 3В12/2 (замены Asn → Lys в 202 и Pro → Gln в 240 положениях), но почти до полного титра (на 1/2) с ЭМ 4Е11/1 и 4Е11/2 (замену Asn → Lys в 202 положении) и ЭМ 3В12/1 (замена Pro → Gln в 240 положении). Было отмечено существенное снижение титров с гомологичными ЭМ 5В11/1 и 5В11/3 (замены Arg → Ile в 136 и Pro → Ser в 240, положениях) и менее значимое с ЭМ 5В11/2 (замены Arg → Ile в 136 и Gly → Glu в 141 положениях). Титр моноАТ 5В11 с ЭМ 5F11 (замены Arg → Ile в 136 и Asp → Gly в 196 положениях) был всего 1/256 от исходного вируса. Незначительное снижение титров на 1/2-1/8 показали моноАТ 5F11 с ЭМ 1G9/1 и 1G9/2, которые содержали, замены Gly → Glu и Gly → Arg в 141 и 237 положениях, соответственно. При этом моноАТ 5F11 слабо реагировали с ЭМ 3В12/1 (замена Pro → Gln в 240 положениях) и ЭМ 3В12/2 (замены Asn → Lys в 202 и Pro → Gln в 240 положениях). МоноАТ 5F11 очень слабо взаимодействовали с ЭМ 5В11/2 (замены Arg → Ile в 136 и Gly → Glu в 141, положениях) и гомологичным ЭМ 5F11 (Arg 136 Ile и Asp 196 Gly), с ЭМ 5В11/1 и 5В11/3 (Arg 136 Ile и Pro 240 Ser) взаимодействие отсутствовало полностью. Установлено, что ГА вируса гриппа В содержит четыре основные антигенные области: петли-120, -150 и -160, и спираль-190. Эти антигенные участки лежат в непосредственной близости или частично входят в структуру РСС, располагаясь близко в пространстве, и образуют большой протяженный антигенный сайт [34]. Это согласуется с нашими результатами, в случае, когда одно моноАТ распознает детерминанты, находящиеся в двух различных, но пространственно близких антигенных областях.

### Обсуждение

Анализ антигенной структуры ГА вирусов гриппа В Ямагатской эволюционной ветви имеет большое теоретическое, и практическое значение. В связи с этим, была поставлена цель провести эпипептидное картирование молекулы ГА вирусов гриппа В/Massachusetts/2/12 с помощью моноклональных антител и идентифицировать аминокислотные замены, значимые при связывании с вируснейтрализующими антителами.

Селекция ЭМ вируса гриппа В/Massachusetts/2/12 стала возможной благодаря выраженной вируснейтрализующей активности разработанных моноАТ. Было получено 16 ЭМ, устойчивых к вируснейтрализующему действию каждого из используемых моноАТ, по два ЭМ в случае моноАТ 1G4, 1G9, 2В10, 3В12, 3С2 и 4Е11, три ЭМ – моноАТ 5В11 – и один ЭМ – моноАТ 5F11.

В результате сравнительного анализа аминокислотных последовательностей ГА ЭМ и ГА исходного вируса установлены замены в шести положениях – 136 и 141 в петле 140, 237 и 240 в петле-240, 196 и 202 в спирали-190.

Оказалось, что большинство замен были расположены в районах, формирующих РСС вирусов гриппа В, а именно в петлях-140 –240 и в спирали-190. Известно, что РСС, находящийся в верхней части молекулы ГА, сформирован спиралью-190 (НА1 193-202) на вершине, петлей-240 (ГА1 237-242) – левая кромка, и петлей-140 (ГА1 136-143) – правый край. При этом четыре аминокислотных остатка в молекуле ГА1 (Phe-95, Trp-158, His-191 и Tyr-202), составляющие основу РСС, высоко консервативны у большинства вирусов гриппа В.

Нами показано, что ряд ЭМ, отобранных с помощью моноАТ 1G4, 2В10 и 3С2, содержали идентичную замену глицина на глютаминовую кислоту (Gly 141 Glu), расположенную в петле-140. В ряде работ было указано, что 141 положение в структуре ГА гриппа В достаточно вариабельно. Так, вирусы с заменой Gly → Val в 141 положении выявлялись еще до расхождения на две филогенетические ветви [35], а замена Gly 141 Arg обнаружена у современных вирусов Ямагатской ветви [32]. Кроме того, показано, что некоторые лабораторные варианты вируса гриппа В, такие как, например, выращенные на куриных эмбрионах, проявляли альтернативные антигенные свойства благодаря единичной замене глицина в 141 положении [36]. Было показано, что замена Gly 141 Arg у вируса В/Лион/1271/96 после адаптации к куриным эмбрионам, привела к увеличению сродства к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе) и ослаблению связывания с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамином). Тогда как вариант того же вируса с Gly в 141 положении, адаптированный к клеткам МДСК, проявлял более высокое сродство с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамином) и значительно меньшее сродство к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе) [37]. Дополнительно установлено, что содержащий замену Gly → Arg в 141 положении, высокопродуктивный вариант вируса В/Виктория/504/2000 утратил способность связывать гликаны с 2,6 гликозидной связью. Тогда как, исходный вирус В/ Виктория /504/2000 предпочтительно связывался с гликанами с 2,6 гликозидной связью, но имел низкое сродство к гликанам с 2,3 гликозидной связью [38].

Анализ двух ЭМ, полученных с использованием моноАТ 1G9, показал, что ЭМ 1G9/1 имел две аминокислотные замены глицина на глютаминовую кислоту (Gly → Glu) в 141 позиции и глицина на аргинин (Gly → Arg) в 237 позиции. ЭМ 1G9/2 содержал только замену Gly → Arg в 237 позиции. Примечательно, что обе замены располагаются РСК ГА, но при этом, находятся в двух различных районах - замена Gly → Glu в 141 позиции в петле-140, в то же время, замена Gly → Arg в 237 позиции - в петле-240. Установлено, что присутствие остатка Gly-237 делает петлю-240 более протяженной, а единичная замена в донном положении обеспечивает переориентацию боковых цепей. Изменение ориентации боковых цепей в последовательности 235-240 ГА1 может кардинально изменять антигенные свойства этого региона (33 Ni F., et al., 2013). Так как, пространственно остатки Gly-237 и Gly-141 находятся близко, по-видимому, замена Gly → Arg в 237 позиции изменяет пространственную структуру таким образом, что это позволяет моноАТ 1G9 распознавать эпипептип в положении 141 ЭМ 1G9/1, имеющего замены Gly 141 Glu и Gly 237 Arg.

Установлено, что ЭМ 4Е11/1 и 4Е11/2 содержали единичную замену Asn 202 Lys. Ранее было обнаружено, что большая часть остатков, окружающих РСК ГА вируса гриппа В, одинаковы у штаммов Ямагатской и Викторианской



ветвей, кроме нескольких положений: 163, 198, 202 и 203 (нумерация для вирусов гриппа Викторианской ветви); в случае наличия Asn – 163 потенциального сайта N-гликозилирования в ГА вирусов гриппа В Ямагатской ветви нет [39]. Более того, отрицательно заряженный аминокислотный остаток Glu в 198, нейтральный остаток Ala в 202 и положительно заряженный остаток Lys в 203 позициях у вирусов Викторианской ветви, находящиеся в спирали 190, замещены у вирусов Ямагатской ветви соответственно на остатки Lys в 197, Lys в 201 и Asn в 202 позициях. Рассматривается, что эти три остатка могут играть существенную роль в специфичности распознавания сиалированных цепей [40]. Установлено, что замена Asn 202 Lys повлияла на рецептор-связывающие свойства ГА вируса гриппа В/Флорида/04/06 Ямагатской ветви, вероятно, увеличив рецепторный репертуар. Таким образом, замена аспарагина в 202 позиции может влиять как на антигенные, так и на рецепторные свойства ГА. Замены в 148, 149, 150 и 203, позициях, прилегающих к сайту связывания рецептора ГА, определяли основные антигенные различия между ранними В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 подобными вирусами [41].

Показано, что ЭМ 3В12/1 имел единичную замену пролина на глутамин в 240 положении, а ЭМ 3В12/2 содержал две замены Pro 240 Gln и Asn 202 Lys. Ранее замена Pro 240 Ser была обнаружена у ЭМ Викторианской ветви [31]. Рядом авторов рассматривается вариант, что переориентация боковых цепей в петле 240 влияет на изменение антигенных характеристик этого региона [33], [31]. Из 8 вариантов ЭМ (V1–V8) вируса В/Осака/983/97 Викторианской ветви, которые были селектированы с помощью моноАТ 10В8, ЭМ V3 и V8 (замена лизина на треонин в 203 положении), утратили способность контактировать с гетерологичным моноАТ 8Е6. Тогда как ЭМ V1 и V2 (замена пролина на серин в 241 положении), отобранные под действием моноАТ 8Е6, реагировали с гетерологичным моноАТ 10В8. Авторы полагают, что остаток в положении 203 входит в структуру или находится вблизи эпитопа моноАТ 8Е6. Установлено, что остатки пролина в 240 и серина в 242 позициях, находятся в эквивалентных положениях к остаткам 226 и 228, соответственно, в ГА штаммов гриппа А субтипа Н3. Эти оба остатка вовлечены в качестве основных детерминант рецепторной специфичности [42]. ЭМ 5В11/1 и 5В11/3 имели две одинаковые аминокислотные замены Arg 136 Ile и Pro 240 Ser, в то время как ЭМ 5В11/2 имел аналогичную аминокислотную замену Arg → Ile в 136 и аминокислотную замену Gly → Glu в 141 положениях. ЭМ 5F11 имел две аминокислотные замены Arg → Ile и Pro → Gln в 136 и 196 положениях. Ранее было показано, что левый край рецептор-связывающего сайта ГА В/Гонконг/8/73 содержит аминокислотные остатки Pro в 238 и Ser в 240 положениях, находящихся в эквивалентных позициях остаткам 226 и 228, соответственно, в молекуле ГА штаммов гриппа А субтипа Н3. Хотя боковая цепочка в случае остатка Pro в 238 позиции короче, чем в случае аминокислотного остатка Leu в 226 позиции в молекуле ГА штаммов вирусов гриппа А субтипа Н3, главные цепочки петли-240 в ГА В/ Гонконг /8/73 сдвинуты в сторону петли-140 так, что боковые цепочки атомов, ответственные за взаимодействие с рецепторами, были расположены аналогичным образом [43]. Вероятно, замена остатка Pro в положении 238, придающего жесткую структуру петле-240, на Ser, меняет конформацию молекулы таким образом, что позволяет распознавать антителам остатки в петле-120. С другой стороны, можно предположить, что замены на изолейцин в 136 и серин в 240 положениях являются компенсаторными. Большая часть остатков петли-190 переменны. Прежде были описаны ЭМ с единичной заменой в позиции 196, конкретно, аспарагина на аспарагиновую кислоту или лизин, которая приводит к потере потенциального сайта N-гликозилирования [30], [44], а также вариантам, адаптированным к росту в куриных эмбрионах [45]. Замена остатка Asp → Gly в 196 позиции не приводила к появлению потенциального сайта N-гликозилирования. Тогда как единичная замена остатка Asp → Tyr в 194 положении у вирусов гриппа В, приспособленных к росту в куриных эмбрионах, значительно меняла антигенные свойства, что свидетельствует об антигенной значимости спирали-190, независимо от прикрепленных к ней гликанов [46]. Спираль-190 гемагглютинаина вируса гриппа В частично совпадает с антигенным сайтом D ГА вируса гриппа А субтипа Н3 [27] и сайтом Ca1 ГА вируса гриппа А субтипа Н1 [28], [29]. Несомненно, все остатки в структуре спирали-190 играют важную роль в антигенных свойствах ГА вируса гриппа В [34].

Все остатки на наружной поверхности спирали-190 имеют значимую антигенную роль. Отдельные замены в этой области неоднократно встречались в ЭМ вирусов гриппа, селектированных с использованием моноАТ: Glu 195 Lys, Gln 197 Lys, Val → Ala, Leu или Glu в 199 пзициях [30], [44], Lys 200 Asn, Arg или Thr [30], [44], [31] и Ser → Leu или Pro в 205 положении [30], [44]. Кроме того, исследование ГА вируса гриппа В/Гонконг/73 с использованием сайт-направленного мутагенеза показало, что замены Thr → Pro в 196 и Gln → Ile в 197 позициях полностью подавляют способность моноАТ взаимодействовать с исследуемым вирусом [47]. «Горячей точкой» на спирали-190 является последовательность аминокислотных остатков 194-196 ГА1, представляющая собой потенциальный сайт N-гликозилирования. Вирус с единичной заменой Ala → Thr в 196 положении, которая создает новый потенциальный сайт гликозилирования в последовательности 194-196 ГА1, вызвал эпидемию в Японии [48]. Кроме того, единственная замена остатка Asn → Ser в 194 положении, вызвала различия в антигенной реактивности между двумя циркулирующими В/Ямагата/16/88 подобными штаммами [49]. Таким образом, полученные данные подтверждают ранее полученные результаты о том, что переменность остатков в структуре спирали-190 сильно влияет на антигенные свойства гемагглютинаина вируса гриппа В [34].

### Заключение

В результате проведенных исследований с помощью разработанных моноАТ, обладающих вируснейтрализующей активностью, получены 16 ЭМ эталонного штамма В/Массачусетс/2/12, резистентных к этим моноАТ. Сравнительный анализ предсказанных последовательностей ГА ЭМ В/Массачусетс/2/12 и исходного вируса позволил выявить в ГА1 вируса гриппа В Ямагатской ветви замены в 136 и 141 (петля-140), 196 и 202 (спираль-190) и 237, 240 (петля-240) положениях. Все выявленные аминокислотные замены расположены в участках, которые участвуют в формировании РСК ГА вируса гриппа В и оказывают влияние на антигенную специфичность ГА.

**Финансирование**

Работа выполнена в рамках государственного задания № 121052400147-7 «Изучение консервативных и переменных эпитопов в молекулах нуклеопротеина и геммагглютининов вирусов гриппа В».

**Конфликт интересов**

Не указан.

**Рецензия**

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

**Funding**

The work was carried out within the framework of state assignment No. 121052400147-7 "Study of Conservative and Variable Epitopes in the Nucleoprotein and Hemagglutinin Molecules of Influenza B Viruses".

**Conflict of Interest**

None declared.

**Review**

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

**Список литературы / References**

1. Koutsakos M. Knowns and unknowns of influenza B viruses / M. Koutsakos, T. Nguyen, W.S. Barclay [et al.] // *Future Microbiol.* — 2016. — 11(1) — P. 119-135. — DOI: 10.2217/fmb.15.120 — PMID: 26684590.
2. Kanegae Y. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season / Y. Kanegae, S. Sugita, A. Endo et al. // *J Virol.* — 1990. — Vol. 64(6). — P. 2860-2865.
3. Rota P.A. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 / P.A. Rota, T.R. Wallis, M.W. Harmon et al. // *Virology.* — 1990. — 175(1). — P. 59-68. — PMID: 2309452.
4. Lo Y-C. Surveillance and vaccine effectiveness of an influenza epidemic predominated by vaccine-mismatched influenza B/Yamagata-lineage viruses in Taiwan, 2011—12 season / Y-C. Lo, J-H. Chuang, H-W. Kuo et al. // *PLoS One.* — 2013. — 8(3):e58222. — DOI: 10.1371/journal.pone.0058222 — PMID: 23472161.
5. Yang J-R. Phylogenetic and evolutionary history of influenza B viruses, which caused a large epidemic in 2011—2012, Taiwan / J-R. Yang, Y-P. Huang, F-Y. Chang et al. // *PLoS One.* — 2012. — 7(10):e47179. — DOI: 10.1371/journal.pone.0047179 — PMID: 23071751.
6. Garg S. A cluster of patients infected with I221V influenza b virus variants with reduced oseltamivir susceptibility—North Carolina and South Carolina, 2010-2011 / S. Garg, Z. Moore, N. Lee et al. // *J Infect Dis.* — 2013. — 207(6). — P. 966-973. — DOI: 10.1093/infdis/jis776 — PMID: 23242536.
7. McCullers J.A. Fatal influenza B infections: time to reexamine influenza research priorities / J.A. McCullers, F.G. Hayden // *J Infect Dis.* — 2012. — 205(6). — P. 870-872. — DOI: 10.1093/infdis/jir865 — PMID: 22291194.
8. Hong K.W. Clinical manifestations of influenza A and B in children and adults at a tertiary hospital in Korea during the 2011—2012 season / K.W. Hong, H.J. Cheong et al. // *Jpn J Infect Dis.* — 2015. — 68. — P. 20-26. — DOI: 10.7883/yoken.JJID.2013.466.
9. Heider A. Molecular characterization and evolution dynamics of influenza B viruses circulating in Germany from season 1996/1997 to 2019/2020 / A. Heider, M. Wedde, R. Dürrwald et al. // *Virus Res.* — 2022. — 322:198926. — DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198926.
10. Chen R. The Evolutionary Dynamics of Human Influenza B Virus / R. Chen, C. Rubing, E.C. Holmes // *J Mol Evol.* — 2008. — 66(6). — P. 655-663. — DOI: 10.1007/s00239-008-9119-z — PMID: 18504518.
11. Dudas G. Reassortment between Influenza B Lineages and the Emergence of a Coadapted PB1-PB2-HA Gene Complex / G. Dudas, T. Bedford, S. Lycett, A. Rambaut // *Mol Biol Evol.* — 2015. — 32(1). — P. 162-172. — DOI: 10.1093/molbev/msu287.
12. Nerome R. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism / R. Nerome, Y. Hiromoto, S. Sugita, et al. // *Arch. Virol.* — 1998. — Vol. 143(8). — P. 1569-1583.
13. Cortes-Alcala R. The burden of influenza A and B in Mexico from the year 2010 to 2013: An observational, retrospective, database study, on records from the Directorate General of Epidemiology database / R. Cortes-Alcala, G. Dos Santos, R. DeAntonio et al. // *Hum Vaccin Immunother.* — 2018. — 10. — P. 1-9. — DOI: 10.1080/21645515.2018.1456281.
14. Varghese B. Epidemiology of viral respiratory infections in Australian working-age adults (20-64 years): 2010-2013 / B. Varghese, E. Dent, M. Chilver et al. // *Epidemiol Infect.* — 2018. — 146(5). — P. 619-626. — DOI: 10.1017/S0950268818000286. — Epub 2018 Feb 21.
15. Caini S. Epidemiology of seasonal influenza in the Middle East and North Africa regions, 2010-2016: Circulating influenza A and B viruses and spatial timing of epidemics / S. Caini, C. El-Guerche Séblain, M.A. Ciblak, J. Paget // *Influenza Other Respir Viruses.* — 2018. — 12(3). — P. 344-352. — DOI: 10.1111/irv.12544. — Epub 2018 Feb 19.
16. Korsun N. Genetic characterisation of the influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2019-2020 winter season / N. Korsun, I. Trifonova, S. Voleva et al. // *Virus Genes.* — 2021. — 57(5):401-412. — DOI: 10.1007/s11262-021-01853-w.
17. Vijaykrishna D. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses / D. Vijaykrishna, E.C. Holmes, U. Joseph et al. // *Elife.* — 2015. — 4:e05055. — DOI: 10.7554/eLife.05055 — PMID: 25594904.
18. Bedford T. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift / T. Bedford, R. Steven, I.G. Barr et al. // *Nature.* — 2015. — 523(7559). — P. 217-220. — DOI: 10.1038/nature14460 PMID: 26053121.
19. Virk R.K. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity / Virk R.K., J. Jayakumar, I. H. Mendenhall et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2020. — Vol. 117(1). — P. 619-628. — DOI: 10.1073/pnas.1916585116.

20. Kim J.I. Reassortment compatibility between PB1, PB2, and HA genes of the two influenza B virus lineages in mammalian cells / J.I. Kim, I. Lee, S. Park et al. // *Sci Rep.* — 2016. — 6:27480. — DOI: 10.1038/srep27480 — PMID: 27270757.
21. Reina J. The Victoria and Yamagata Lineages of Influenza B Viruses, unknown and undervalued / J. Reina // *Rev. Esp. Quimioter.* — 2022. — 35(3). — 231-235. — DOI: 10.37201/req/159.2021.
22. Методические рекомендации «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация». Утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 18 апреля 2006 г. № 0100/4430-06-34.
23. Kohler G. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion / G. Kohler, C. Milstein // *Eur. J. Immunol.* — 1976. — Vol. 6. — P. 511-519.
24. Kaverin N.V. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies / N.V. Kaverin, I. Rudneva, E. Govorkova et al. // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81. — P. 12911-12917.
25. Horthongkham N. Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014 / N. Horthongkham, N. Athipanyasilp, A. Pattama et al. // *PLoS One.* — 2016. — Vol.7. — 11(7):e0158244. — DOI: 10.1371/journal.pone.0158244.
26. Tramuto F. The Molecular Epidemiology and Evolutionary Dynamics of Influenza B Virus in Two Italian Regions during 2010-2015: The Experience of Sicily and Liguria / F. Tramuto, A. Orsi, C.M. Maida et al. // *Int J Mol Sci.* — 2016. — Vol. 17(4): 549. — DOI: 10.3390/ijms17040549.
27. Wiley D.C. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation / D.C. Wiley, I.A. Wilson, J.J. Skehel // *Nature.* — 1981. — Vol. 289. — P. 373-378.
28. Caton A.J. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H3 subtype) / A.J. Caton, G.G. Brownlee, J.M. Yewdell, W. Gerhard // *Cell* — 1982. — 31. — P. 417-427.
29. Gerhard W. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies / W. Gerhard, J. Yewdell, M. E. Frankel, R. Webster // *Nature.* — 1981. — Vol. 290. — P. 713-717.
30. Berton M.T. Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies / M.T. Berton, C.W. Naeve, R.G. Webster // *J. Virol.* — 1984. — Vol. 52. — P. 919-927.
31. Nakagawa N. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains / N. Nakagawa, R. Kubota, T. Nakagawa, Y. Okuno // *J. Gen. Virol.* — 2001. — Vol. 82. — P. 2169-2172.
32. Nakagawa N. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the 'loop' / N. Nakagawa, R. Kubota, T. Nakagawa, Y. Okuno // *J. Gen. Virol.* — 2003. — Vol. 84. — P. 769-773.
33. Ni F. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin / F. Ni, E. Kondrashkina, Q. Wang // *Virology.* — 2013. — Vol. 44. — P. 112-122.
34. Wang Q. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin / Q. Wang, F. Cheng, M. Lu et al. // *J. Virol.* — 2008. — Vol. 82. — P.3011-3020.
35. Webster R. G. Analysis of antigenic drift in the haemagglutinin molecule of influenza B virus with monoclonal antibodies / R. G. Webster and M. T. Berton // *J. Gen. Virol.* — 1981. — Vol. 54. — P. 243-251.
36. Lugovtsev V.Y. Mutational pattern of influenza B viruses adapted to high growth replication in embryonated eggs / V.Y. Lugovtsev, G.M. Vodeiko, R.A. Levandowski // *Virus Res.* — 2005. — Vol. 109. — P. 149-157.
37. Govorkova E.A. Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells / E.A. Govorkova, M.N. Matrosovich, A.B. Tuzikov et al. // *Virology.* — 1999. — Vol. 262. — P. 31-38.
38. Lugovtsev V.Y. Changes of the receptor-binding properties of influenza B virus B/Victoria/504/2000 during adaptation in chicken eggs / V.Y. Lugovtsev, D.F. Smith, J.P. Weir // *Virology.* — 2009. — Vol. 394. — P. 218-226.
39. Carbone V. Molecular characterization of the receptor binding structure-activity relationships of influenza B virus hemagglutinin / V. Carbone, H. Kim, J.X. Huang et al. // *Acta Virol.* — 2013. — Vol. 57(3). — P. 313-332.
40. Wang Y.F. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features / Y.F. Wang, C.F. Chang, C.Y. Chi et al. // *J. Med. Virol.* — 2012. — Vol. 84(4). — P. 679-85. — DOI: 10.1002/jmv.23219.
41. Rosu M.E. Substitutions near the HA receptor binding site explain the origin and major antigenic change of the B/Victoria and B/Yamagata lineages / M.E. Rosu, P. Lexmond, T.M. Bestebroer et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2022. — 119(42):e2211616119. — DOI: 10.1073/pnas.2211616119.
42. Wiley D.C. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus / D.C. Wiley, J.J. Skehel // *Annu Rev Biochem.* — 1987. — 56. — P. 365-94. — DOI:10.1146/annurev.bi.56.070187.002053
43. Wang Q. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin / Q. Wang, X. Tian, X. Chen, J. Ma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2007. — Vol. 104. — P. 16874-16879.
44. Berton M.T. The antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: operational and topological mapping with monoclonal antibodies / M.T. Berton, Webster R.G. // *Virology.* — 1985. — Vol. 143. — P. 583-594.
45. Saito T. Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation / T. Saito, Y. Nakaya, T. Suzuki et al. // *J. Med. Virol.* — 2004. — Vol. 74. — P. 336-343.
46. Lugovtsev V.Y. Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of hemagglutinin / V. Y. Lugovtsev, G. M. Vodeiko, C. M. Strupczewski et al. // *Virology.* — 2007. — Vol. 365. — P. 315-323.
47. Rivera K. Probing the structure of influenza B hemagglutinin using sitedirected mutagenesis / K. Rivera, H. Thomas, H. Zhang et al. // *Virology.* — 1995. — 206. — P. 787-795.

48. Nakagawa N. Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002—2003 season / N. Nakagawa, R. Kubota, A. Maeda, Y. Okuno // *J Clin Microbiol.* — 2004. — 42. — P. 3295-3297.
49. Muyanga J. Antigenic and genetic analyses of influenza B viruses isolated in Lusaka, Zambia in 1999 / J. Muyanga, Y. Matsuzaki, K. Sugawara et al. // *Arch Virol.* — 2001. — 146. — P. 1667.

### Список литературы на английском языке / References in English

1. Koutsakos M. Knowns and unknowns of influenza B viruses / M. Koutsakos, T. Nguyen, W.S. Barclay [et al.] // *Future Microbiol.* — 2016. — 11(1) — P. 119-135. — DOI: 10.2217/fmb.15.120 — PMID: 26684590.
2. Kanegae Y. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season / Y. Kanegae, S. Sugita, A. Endo et al. // *J Virol.* — 1990. — Vol. 64(6). — P. 2860-2865.
3. Rota P.A. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 / P.A. Rota, T.R. Wallis, M.W. Harmon et al. // *Virology.* — 1990. — 175(1). — P. 59-68. — PMID: 2309452.
4. Lo Y-C. Surveillance and vaccine effectiveness of an influenza epidemic predominated by vaccine-mismatched influenza B/Yamagata-lineage viruses in Taiwan, 2011—12 season / Y-C. Lo, J-H. Chuang, H-W. Kuo et al. // *PLoS One.* — 2013. — 8(3):e58222. — DOI: 10.1371/journal.pone.0058222 — PMID: 23472161.
5. Yang J-R. Phylogenetic and evolutionary history of influenza B viruses, which caused a large epidemic in 2011—2012, Taiwan / J-R. Yang, Y-P. Huang, F-Y. Chang et al. // *PLoS One.* — 2012. — 7(10):e47179. — DOI: 10.1371/journal.pone.0047179 — PMID: 23071751.
6. Garg S. A cluster of patients infected with I221V influenza b virus variants with reduced oseltamivir susceptibility—North Carolina and South Carolina, 2010-2011 / S. Garg, Z. Moore, N. Lee et al. // *J Infect Dis.* — 2013. — 207(6). — P. 966-973. — DOI: 10.1093/infdis/jis776 — PMID: 23242536.
7. McCullers J.A. Fatal influenza B infections: time to reexamine influenza research priorities / J.A. McCullers, F.G. Hayden // *J Infect Dis.* — 2012. — 205(6). — P. 870-872. — DOI: 10.1093/infdis/jir865 — PMID: 22291194.
8. Hong K.W. Clinical manifestations of influenza A and B in children and adults at a tertiary hospital in Korea during the 2011—2012 season / K.W. Hong, H.J. Cheong et al. // *Jpn J Infect Dis.* — 2015. — 68. — P. 20-26. — DOI: 10.7883/yoken.JJID.2013.466.
9. Heider A. Molecular characterization and evolution dynamics of influenza B viruses circulating in Germany from season 1996/1997 to 2019/2020 / A. Heider, M. Wedde, R. Dürrwald et al. // *Virus Res.* — 2022. — 322:198926. — DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198926.
10. Chen R. The Evolutionary Dynamics of Human Influenza B Virus / R. Chen, C. Rubing, E.C. Holmes // *J Mol Evol.* — 2008. — 66(6). — P. 655-663. — DOI: 10.1007/s00239-008-9119-z — PMID: 18504518.
11. Dudas G. Reassortment between Influenza B Lineages and the Emergence of a Coadapted PB1-PB2-HA Gene Complex / G. Dudas, T. Bedford, S. Lycett, A. Rambaut // *Mol Biol Evol.* — 2015. — 32(1). — P. 162-172. — DOI: 10.1093/molbev/msu287.
12. Nerome R. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism / R. Nerome, Y. Hiromoto, S. Sugita, et al. // *Arch. Virol.* — 1998. — Vol. 143(8). — P. 1569-1583.
13. Cortes-Alcala R. The burden of influenza A and B in Mexico from the year 2010 to 2013: An observational, retrospective, database study, on records from the Directorate General of Epidemiology database / R. Cortes-Alcala, G. Dos Santos, R. DeAntonio et al. // *Hum Vaccin Immunother.* — 2018. — 10. — P. 1-9. — DOI: 10.1080/21645515.2018.1456281.
14. Varghese B. Epidemiology of viral respiratory infections in Australian working-age adults (20-64 years): 2010-2013 / B. Varghese, E. Dent, M. Chilver et al. // *Epidemiol Infect.* — 2018. — 146(5). — P. 619-626. — DOI: 10.1017/S0950268818000286. — Epub 2018 Feb 21.
15. Caini S. Epidemiology of seasonal influenza in the Middle East and North Africa regions, 2010-2016: Circulating influenza A and B viruses and spatial timing of epidemics / S. Caini, C. El-Guerche Séblain, M.A. Ciblak, J. Paget // *Influenza Other Respir Viruses.* — 2018. — 12(3). — P. 344-352. — DOI: 10.1111/irv.12544. — Epub 2018 Feb 19.
16. Korsun N. Genetic characterisation of the influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2019-2020 winter season / N. Korsun, I. Trifonova, S. Voleva et al. // *Virus Genes.* — 2021. — 57(5):401-412. — DOI: 10.1007/s11262-021-01853-w.
17. Vijaykrishna D. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses / D. Vijaykrishna, E.C. Holmes, U. Joseph et al. // *Elife.* — 2015. — 4:e05055. — DOI: 10.7554/eLife.05055 — PMID: 25594904.
18. Bedford T. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift / T. Bedford, R. Steven, I.G. Barr et al. // *Nature.* — 2015. — 523(7559). — P. 217-220. — DOI: 10.1038/nature14460 PMID: 26053121.
19. Virk R.K. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity / Virk R.K., J. Jayakumar, I. H. Mendenhall et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2020. — Vol. 117(1). — P. 619-628. — DOI: 10.1073/pnas.1916585116.
20. Kim J.I. Reassortment compatibility between PB1, PB2, and HA genes of the two influenza B virus lineages in mammalian cells / J.I. Kim, I. Lee, S. Park et al. // *Sci Rep.* — 2016. — 6:27480. — DOI: 10.1038/srep27480 — PMID: 27270757.
21. Reina J. The Victoria and Yamagata Lineages of Influenza B Viruses, unknown and undervalued / J. Reina // *Rev. Esp. Quimioter.* — 2022. — 35(3). — 231-235. — DOI: 10.37201/req/159.2021.
22. Metodicheskie rekomendacii «Vydelenie virusov grippa v kletochnyh kul'turah i kurinyh embrionah i ih identifikaciya» [Methodological recommendations "Isolation of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification"]: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare dated April 18, 2006 No. 0100/4430-06-34 [in Russian].

23. Kohler G. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion / G. Kohler, C. Milstein // *Eur. J. Immunol.* — 1976. — Vol. 6. — P. 511-519.
24. Kaverin N.V. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies / N.V. Kaverin, I. Rudneva, E. Govorkova et al. // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81. — P. 12911-12917.
25. Horthongkham N. Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014 / N. Horthongkham, N. Athipanyasilp, A. Pattama et al. // *PLoS One.* — 2016. — Vol. 7. — 11(7):e0158244. — DOI: 10.1371/journal.pone.0158244.
26. Tramuto F. The Molecular Epidemiology and Evolutionary Dynamics of Influenza B Virus in Two Italian Regions during 2010-2015: The Experience of Sicily and Liguria / F. Tramuto, A. Orsi, C.M. Maida et al. // *Int J Mol Sci.* — 2016. — Vol. 17(4): 549. — DOI: 10.3390/ijms17040549.
27. Wiley D.C. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation / D.C. Wiley, I.A. Wilson, J.J. Skehel // *Nature.* — 1981. — Vol. 289. — P. 373-378.
28. Caton A.J. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H3 subtype) / A.J. Caton, G.G. Brownlee, J.M. Yewdell, W. Gerhard // *Cell* — 1982. — 31. — P. 417-427.
29. Gerhard W. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies / W. Gerhard, J. Yewdell, M. E. Frankel, R. Webster // *Nature.* — 1981. — Vol. 290. — P. 713-717.
30. Berton M.T. Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies / M.T. Berton, C.W. Naeve, R.G. Webster // *J. Virol.* — 1984. — Vol. 52. — P. 919-927.
31. Nakagawa N. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains / N. Nakagawa, R. Kubota, T. Nakagawa, Y. Okuno // *J. Gen. Virol.* — 2001. — Vol. 82. — P. 2169-2172.
32. Nakagawa N. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the 'loop' / N. Nakagawa, R. Kubota, T. Nakagawa, Y. Okuno // *J. Gen. Virol.* — 2003. — Vol. 84. — P. 769-773.
33. Ni F. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin / F. Ni, E. Kondrashkina, Q. Wang // *Virology.* — 2013. — Vol. 44. — P. 112-122.
34. Wang Q. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin / Q. Wang, F. Cheng, M. Lu et al. // *J. Virol.* — 2008. — Vol. 82. — P.3011-3020.
35. Webster R. G. Analysis of antigenic drift in the haemagglutinin molecule of influenza B virus with monoclonal antibodies / R. G. Webster and M. T. Berton // *J. Gen. Virol.* — 1981. — Vol. 54. — P. 243-251.
36. Lugovtsev V.Y. Mutational pattern of influenza B viruses adapted to high growth replication in embryonated eggs / V.Y. Lugovtsev, G.M. Vodeiko, R.A. Levandowski // *Virus Res.* — 2005. — Vol. 109. — P. 149-157.
37. Govorkova E.A. Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells / E.A. Govorkova, M.N. Matrosovich, A.B. Tuzikov et al. // *Virology.* — 1999. — Vol. 262. — P. 31-38.
38. Lugovtsev V.Y. Changes of the receptor-binding properties of influenza B virus B/Victoria/504/2000 during adaptation in chicken eggs / V.Y. Lugovtsev, D.F. Smith, J.P. Weir // *Virology.* — 2009. — Vol. 394. — P. 218-226.
39. Carbone V. Molecular characterization of the receptor binding structure-activity relationships of influenza B virus hemagglutinin / V. Carbone, H. Kim, J.X. Huang et al. // *Acta Virol.* — 2013. — Vol. 57(3). — P. 313-332.
40. Wang Y.F. Characterization of glycan binding specificities of influenza B viruses with correlation with hemagglutinin genotypes and clinical features / Y.F. Wang, C.F. Chang, C.Y. Chi et al. // *J. Med. Virol.* — 2012. — Vol. 84(4). — P. 679-85. — DOI: 10.1002/jmv.23219.
41. Rosu M.E. Substitutions near the HA receptor binding site explain the origin and major antigenic change of the B/Victoria and B/Yamagata lineages / M.E. Rosu, P. Lexmond, T.M. Bestebroer et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2022. — 119(42):e2211616119. — DOI: 10.1073/pnas.2211616119.
42. Wiley D.C. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus / D.C. Wiley, J.J. Skehel // *Annu Rev Biochem.* — 1987. — 56. — P. 365-94. — DOI:10.1146/annurev.bi.56.070187.002053
43. Wang Q. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin / Q. Wang, X. Tian, X. Chen, J. Ma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2007. — Vol. 104. — P. 16874-16879.
44. Berton M.T. The antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: operational and topological mapping with monoclonal antibodies / M.T. Berton, Webster R.G. // *Virology.* — 1985. — Vol. 143. — P. 583-594.
45. Saito T. Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation / T. Saito, Y. Nakaya, T. Suzuki et al. // *J. Med. Virol.* — 2004. — Vol. 74. — P. 336-343.
46. Lugovtsev V.Y. Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of hemagglutinin / V. Y. Lugovtsev, G. M. Vodeiko, C. M. Strupczewski et al. // *Virology.* — 2007. — Vol. 365. — P. 315-323.
47. Rivera K. Probing the structure of influenza B hemagglutinin using sitedirected mutagenesis / K. Rivera, H. Thomas, H. Zhang et al. // *Virology.* — 1995. — 206. — P. 787-795.
48. Nakagawa N. Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002—2003 season / N. Nakagawa, R. Kubota, A. Maeda, Y. Okuno // *J Clin Microbiol.* — 2004. — 42. — P. 3295-3297.
49. Muyanga J. Antigenic and genetic analyses of influenza B viruses isolated in Lusaka, Zambia in 1999 / J. Muyanga, Y. Matsuzaki, K. Sugawara et al. // *Arch Virol.* — 2001. — 146. — P. 1667.