

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСЕРВАТИВНОСТИ
ИММУНОГЕННЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ
НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСОВ-ДОНОРОВ ДЛЯ ЖИВЫХ И
ИНАКТИВИРОВАННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН**

Рак А. Я.¹,

Руденко Л. Г.¹,

Исакова-Сивак И. Н.¹

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONSERVATION OF
NUCLEOPROTEIN IMMUNOGENIC T-CELL EPITOPES OF MASTER
DONOR VIRUSES FOR LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA
VACCINES**

Rak A. Ya.^a,

Rudenko L. G.^a,

Isakova-Sivak I. N.^a

^a Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia.

Резюме

Антиген-специфические Т-клетки являются важным звеном противовирусного иммунитета при гриппозной инфекции, и современные вакцины разрабатываются как возможные индукторы данного звена иммунитета. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) является мощным стимулятором Т-клеточного иммунитета ввиду её способности вызывать продуктивную инфекцию в верхних дыхательных путях. Инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ) и новые разрабатываемые вакцинные кандидаты также могут вызывать образование вирус-специфических Т-клеток при использовании соответствующих адъювантов. При этом основной мишенью для развития Т-клеточного иммунитета являются неструктурные и внутренние антигены вакцинного донора, в частности нуклеопротеин (NP). Наиболее часто используемые в мире штаммы-доноры для ЖГВ и ИГВ были получены на основе вирусов, выделенных с 1933 по 1960 год. В связи с этим актуален вопрос о консервативности эпитопов, иммуногенных для CD8⁺ Т-лимфоцитов (ЦТЛ-эпитопов), в NP белках вакцинных доноров, то есть о способности Т-киллеров, специфичных к «донорному» NP, к распознаванию нуклеопротеинов актуальных штаммов вируса гриппа А. Целью исследования явилась оценка консервативности иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP белка вирусов-доноров подтипов H1N1 и H2N2, традиционно используемых для создания ЖГВ и ИГВ. Материалы и методы. Иммуноэпитопный анализ *in silico* NP белков был проведен для 1614 и 1767 штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, соответственно, циркулировавших в 2009–2023 гг. (по данным NCBI Influenza Virus Database), в сравнении с донорами аттенуации и высокой репродуктивности А/Ленинград/134/17/54 (H2N2), А/Ann Arbor/6/60 (H2N2), А/PR8/34 (H1N1) и А/WSN/1933 (H1N1). Для этого использовалась база данных Immune Epitope Database (IEDB, www.iedb.org), встроенный алгоритм предсказания ЦТЛ-эпитопов NetCTL и инструмент предсказания сайтов протеолиза NetChop. Картирование эпитопов, содержащих не более 1 сайта протеолиза, на аминокислотные последовательности NP антигена проводили с помощью алгоритма выравнивания ClustalO в программе JalView 2.8.1. Иммуногенность и консервативность отобранных эпитопов далее оценивали с помощью инструментов IEDB T-cell Immunogenicity predictor tool и Epitope Conservancy Assay, соответственно. Результаты. Было установлено, что большинство обнаруженных иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP белка вирусов-доноров для ЖГВ и ИГВ не встречается в последовательностях NP циркулирующих вирусов гриппа. И наоборот, большая часть иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP белка современных вирусов отсутствует в донорных вирусах и не может быть индуцирована путем вакцинации с использованием традиционных вакцин. Полученные данные свидетельствуют о необходимости актуализации NP антигена в составе вакцин путем направленного мутагенеза гена «донорного» NP или внесения в вакцинные штаммы гена, кодирующего NP циркулирующих вирусов гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, нуклеопротеин, белок нуклеокапсида, лимфоциты, Т-клеточный эпитоп, живая гриппозная вакцина.

Abstract

Antigen-specific T cells are an important part of antiviral responses, and modern influenza vaccines are designed to induce this mode of immunity. Live attenuated influenza vaccine (LAIV) is a potent inducer of T-cell immunity because of its ability to induce productive infection in the upper respiratory tract. Inactivated influenza vaccines (IIV) and novel vaccine candidates can also induce virus-specific T-cells when appropriate adjuvants are used. In this case, non-structural and intrinsic antigens of the master donor viruses, particularly nucleoprotein (NP), are the main targets for the development of T-cell immunity. The most commonly used donor strains for LAIVs and IIVs worldwide were derived from viruses isolated between 1933 and 1960. In this regard, the question of conservation of epitopes immunogenic for CD8⁺ T-lymphocytes (CTL-epitopes) in donor-derived NPs, i.e. the ability of cytotoxic T cells specific to the donor's NP to recognize modern influenza A virus nucleoproteins, is relevant. The aim of the study was to evaluate the conservation of CTL-immunogenic NP epitopes of donors traditionally used to create LAIVs and IIVs. Materials and methods. Epitope NP analysis was performed for 1614 and 1767 strains of influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2, respectively, which circulated in 2009-2023 (data from the NCBI Influenza Virus Database). Immune Epitope Database (IEDB, www.iedb.org), NetCTL's built-in CTL-epitope prediction algorithm and NetChop proteolysis site predictor were used. CTL-epitopes were mapped to NPs of master donor viruses A/Leningrad/134/17/54 (H2N2), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/PR8/34 (H1N1), and A/WSN/1933 (H1N1) using the CrustalO alignment algorithm in JalView 2.8.1 Software. The immunogenicity and conservation of selected epitopes were further evaluated using IEDB T-cell Immunogenicity Predictor and Epitope Conservancy Assay, respectively. Results. The majority of immunogenic CTL-epitopes of donor viruses proved to be non-conserved, i.e., not found in NPs of circulating influenza strains. Conversely, most CTL-immunogenic NP epitopes of modern viruses are absent in donor viruses and cannot be induced by vaccination with conventional vaccines. The data obtained indicate the need to actualize NP in vaccine composition by directed mutagenesis of the donor-derived NP gene or by introduction of the gene encoding NP of circulating influenza viruses into vaccine strains.

Keywords: influenza virus, nucleoprotein, nucleocapsid protein, lymphocytes, T-cell epitope, live attenuated influenza vaccine.

1 Введение

Грипп является одной из наиболее распространенных в мире респираторных инфекций, вызываемой высококонтагиозным вирусным патогеном (чаще всего вирусами гриппа подтипа А) и часто характеризующейся осложненным течением. По данным ВОЗ, ежегодные эпидемии гриппа вызывают от 3 до 5 миллионов случаев тяжелой формы заболевания, смертность от которых достигает 22% [1].

Одним из наиболее эффективных средств борьбы с гриппозной инфекцией является вакцинопрофилактика, чаще всего осуществляемая с использованием таких инструментов, как сплит-, рекомбинантные и инаktivированные (ИГВ) вакцины, в том числе на основе наночастиц, а также живая гриппозная вакцина (ЖГВ). Показано, что в отличие от других способов вакцинации, иммунизация ЖГВ индуцирует как местный, так и Т-клеточный гетеросубтипический иммунный ответ к внутреннему белку вириона – нуклеопротеину (NP), наиболее богатому иммуногенными эпитопами для CD8⁺ Т-лимфоцитов компоненту вируса гриппа [2].

Штаммы, составляющие основу сезонных ЖГВ и ИГВ, являются продуктами генетической реассортации циркулирующих вирусных вариантов и вакцинных доноров [3]. Как правило, их геном представлен сегментами, кодирующими поверхностные белки (гемагглютинин и нейраминидазу) актуальных эпидемических вирусов гриппа, а также генами неструктурных белков и внутренних компонентов вириона (в частности, NP антигена), наследуемыми от вакцинного донора. Наиболее популярными донорными штаммами для создания гриппозных вакцин во всем мире являются вирусы 1933-1960 годов выделения, а именно A/WSN/1933 (H1N1) (используемый для получения современных вакцин на основе наночастиц), A/PR8/34 (H1N1) (донор высокой репродуктивности для создания ИГВ), A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), лицензированный для производства ЖГВ [4], а также донор аттенуации для американской ЖГВ A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), аминокислотный состав NP белка которых мог значительно отдалиться от такового у циркулирующих вирусов за более чем 60 лет. В случае если возникающие в NP замены затрагивают иммуногенные эпитопы, которые в комплексе с МНС-I служат активаторами цитотоксических CD8⁺ Т-клеток (ЦТЛ-эпитопы), различия в составе «донорного» и «эпидемического» NP антигенов могут снижать эффективность стимуляции Т-клеточного иммунитета с помощью вакцин, содержащих антигенно устаревший белок нуклеокапсида.

Целью данного исследования стал анализ консервации *in silico* ЦТЛ-иммуноэпитопов NP антигена вирусов гриппа А, чаще всего используемых в качестве доноров для разработки и производства кросс-протективных вакцин (A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/PR8/34 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1)) в составе NP вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2),

циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год.

2 Материалы и методы

Для проведения иммуноэпитопного анализа из базы данных NCBI Influenza Virus Sequence Database [5] были отобраны аминокислотные последовательности NP антигена вакцинных доноров (А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), А/Ann Arbor/6/60 (H2N2), А/PR8/34 (H1N1) и А/WSN/1933 (H1N1), а также уникальные последовательности NP 1614 современных вирусов гриппа А подтипа H1N1 и 1767 – подтипа H3N2, циркулировавших среди людей в 2009-2023 годах. Из рассмотрения были исключены лабораторные штаммы, а также полностью гомологичные последовательности, выявленные при выравнивании алгоритмом ClustalO [6]. Поиск ЦТЛ-эпитопов в последовательностях NP вакцинных доноров проводили в базе данных Immune Epitope Database (IEDB, www.iedb.org) с использованием алгоритма предсказания NetCTL, поэтапно для всех HLA-супертипов [7]. Параметры вклада С-концевого протеолиза, эффективности ТАР-опосредованного транспорта пептидов в просвет эндоплазматического ретикулума (с участием транспортера, ассоциированного с процессингом антигена) и порога отбора эпитопов составляли 0,15, 0,05 и 0,75 соответственно. Затем последовательности NP вакцинных доноров были проанализированы на наличие протеолитических сайтов с помощью инструмента NetChop [8] и метода C-terminal proteolysis assay 3.0 при пороговом значении 0,5. Картирование ЦТЛ-эпитопов на последовательности NP вирусов гриппа А с учетом локализации сайтов протеолиза проводили с помощью программы JalView 2.8.1. Эпитопы, имеющие не более одного сайта протеолиза, были включены в дальнейший анализ. Предсказание иммуногенности отобранных ЦТЛ-эпитопов проводили в IEDB с использованием алгоритма предсказания Immunogenicity predictor tool [9]. Для дальнейшего исследования отбирали эпитопы с баллом иммуногенности более 0. Анализ консервации эпитопов проводили в IEDB с использованием соответствующего алгоритма Epitope Conservancy Assay [10] в режиме оценки линейных эпитопов с порогом идентичности последовательностей, равным 100. Степень консервативности эпитопов выражали как процент вирусных штаммов с полностью гомологичными последовательностями среди всех штаммов вируса гриппа А, включенных в анализ.

3 Результаты и обсуждение

Данные, представленные в **таблице 1**, показывают, что только 2 из 12 отобранных ЦТЛ-эпитопов (16,7 %) для NP вакцинного донора А/WSN/1933 (H1N1) оказались высококонсервативными. Примечательно, что половина отобранных иммуногенных эпитопов была выявлена только у 0,1-2,0% циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа А.

Аналогичные результаты были получены для А/PR8/34 (H1N1), где только 3 из 13 предсказанных NP-эпитопов (23,1%) сохранились практически у

84 всех циркулирующих в настоящее время вирусов (таблица 2).

85 Как и ожидалось, большая доля ЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации
86 А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), сохраняется у современных вирусов H1N1 и
87 H3N2 (5 из 12, 41,7%), поскольку этот вирус был выделен на два десятилетия
88 позже, чем первые два рассмотренных вакцинных донора (таблица 3).

89 Сходные данные были получены при анализе консервативности ЦТЛ-
90 эпитопов NP антигена донора аттенуации А/Ann Arbor/6/60 (H2N2), что
91 ожидаемо ввиду практически совпадающего времени выделения и подтипа
92 данного вируса с таковым у А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (таблица 4).

93 Однако, в отличие от других вакцинных доноров, в пределах NP А/Ann
94 Arbor/6/60 (H2N2) были выявлены два уникальных консервативных эпитопа
95 (251-259 и 438-446) и не обнаружены такие эпитопы как 198-206, 199-207, 276-
96 284, 211-219, 213-221, присутствующие в NP антигене родственного вируса
97 А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

98 Далее мы провели поиск иммуногенных ЦТЛ-эпитопов, содержащих не
99 более одного сайта протеолиза, в последовательностях NP современных
100 штаммов вирусов гриппа А подтипа H1N1 и H3N2, рекомендованных ВОЗ для
101 включения в состав поливалентных вакцин для применения в эпидемические
102 сезоны 2018-2024 гг. в Северном полушарии, а затем оценили представленность
103 обнаруженных эпитопов в NP вакцинных доноров (таблица 5).

104 В целом проведенный анализ показал, что большинство NP-
105 специфических иммунодоминантных ЦТЛ-эпитопов вакцинных прототипов,
106 разработанных на основе антигенно устаревших вирусов гриппа А, не
107 присутствуют в современных штаммах, и напротив, представленность
108 иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP антигена современных вирусов гриппа А у
109 четырех наиболее популярных вакцинных доноров не превышает 24%
110 (таблица 5), что может иметь по крайней мере два негативных последствия. Во-
111 первых, массовое применение вакцин на основе неактуальных NP доноров
112 приведет к клональной экспансии эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов, не
113 способных к распознаванию и уничтожению клеток, инфицированных
114 недавними вариантами вируса гриппа, что неоправданно истощит иммунную
115 систему вакцинируемых. Во-вторых, большинство новых эпитопов NP
116 современных вирусов гриппа не будет распознаваться индуцированными
117 вакциной Т-клетками, поскольку эти эпитопы еще не были представлены в
118 вакцинах на основе классических доноров.

119 Среди проанализированных ЦТЛ-эпитопов NP четырех наиболее
120 популярных вакцинных доноров по степени консервативности можно выделить
121 три группы пептидов: высококонсервативные (для которых процент
122 консервации составляет более 90 %), среднеконсервативные (сохраняющиеся у
123 40-55% современных штаммов вируса гриппа А) и низкоконсервативные (с
124 консервацией 3% и менее). Выявленные различия в степени консервативности

отдельных эпитопов NP могут свидетельствовать о дифференциальном действии естественного отбора со стороны иммунной системы хозяина в процессе вирусной эволюции. Это предположение может быть в дальнейшем дополнительно проверено с помощью алгоритмов оценки молекулярной эволюции [11, 12].

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что NP-специфические CD8⁺ Т-клетки, генерируемые в ответ на вакцинацию штаммами, полученными на основе классических доноров, будут способны распознавать лишь небольшую часть иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP антигена современных вариантов вируса гриппа. Этот недостаток может быть устранен либо введением в состав штаммов ЖГВ, помимо генов поверхностных белков (гемагглютенина и нейраминидазы), гена NP актуальных вирусных вариантов, либо направленным точечным мутагенезом последовательностей NP вакцинных доноров для приведения ее в соответствие антигенному набору ЦТЛ-эпитопов NP современных вирусов гриппа А.

4 Заключение

В настоящем исследовании был выявлен ряд экспериментальных и предсказанных иммуногенных ЦТЛ-эпитопов в белке нуклеокапсида стандартных вакцинных доноров для создания гриппозных вакцин и проанализирована степень их консервативности по наличию в NP современных штаммов вируса гриппа А. По результатам анализа степени консервации этих эпитопов, большая их часть отсутствует в NP антигене штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, циркулировавших в мире с 2009 по 2023 год. Таким образом, существует вероятность ограниченной перекрестной NP-специфичности, а, следовательно, и защитной функции вакцин-индуцированных CD8⁺ Т-лимфоцитов, что может быть скорректировано за счет актуализации эпитопного состава NP вакцинных доноров в соответствии с таковым у современных вирусных вариантов. Выявленные в работе последовательности иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP могут быть использованы для конструирования новых прототипов вакцин против гриппа с улучшенными кросс-протективными свойствами.

(Работа выполнена по теме проекта «Создание бивалентной вакцины против SARS-CoV-2 и гриппа с использованием новой технологической платформы», поддержанного грантом Российского научного фонда №21-75-30003).

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP вакцинного донора A/WSN/1933 (H1N1) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год.

Table 1. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of vaccine donor A/WSN/1933 (H1N1) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023.

Эпитопы NP вируса гриппа A/WSN/1933 (H1N1)/ NP epitopes of influenza virus A/WSN/1933 (H1N1)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), %/ Conservancy of NP CTL-epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказан ие ЦТЛ- иммуноген ности эпито- па, баллы/Predi ction of epitope CTL- immunogen icity, score
Номер эпитопа в IEDB/Epito pe IEDB ID	Позици я на транскрипте NP/Posi tion in NP transcrip t	Связыв аю- щий эпитоп HLA- суперти п/Epitop e- binding HLA supertyp e	Аминокислотна я последовательн ость/ Amino acid sequence		
p	174-182	B27	RRSGAAGAA	98.13	0.11
p	317-325	A3	RPNENPAHK	97.86	0.13
41691	32-40	A1, A26	MIDGIGRFY	52.31	0.32
11696	114-122	B44	EEIRRIWRQ	53.30	0.49
p	113-121	A3	KEEIRRIWR	53.27	0.51
p	30-38	A3	GKMIDGIGR	50.99	0.26
p	211-219	A26	NGRRTRIAY	1.97	0.29
p	213-221	B27	RRTRIAYER	1.97	0.29
p	214-222	B7	RTRIAYERM	1.97	0.30
19421	17-25	B44	GERQNATEI	1.53	0.02
p	125-133	B39	NGDDATAGL	1.40	0.16
p	245-253	B27, B39	SRNPGNAEF	0.10	0.11

Примечание: p – эпитоп предсказан.

Note: p – epitope is predicted.

Таблица 2. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP вакцинного донора A/PR8/34 (H1N1) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год.

Table 2. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of vaccine donor A/PR8/34 (H1N1) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023.

Эпитопы NP вируса гриппа A/WSN/1933 (H1N1)/ NP epitopes of influenza virus A/WSN/1933 (H1N1)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), %/ Conservancy of NP CTL-epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказан ие ЦТЛ- иммуноген ности эпито- па, баллы/Predi ction of epitope CTL- immunogen icity, score
Номер эпитопа в IEDB/Epito pe IEDB ID	Позици я на тран- скрипте NP/Posi tion in NP transcrip t	Связыв аю- щий эпитоп HLA- суперти п/Epitop e- binding HLA supertyp e	Аминокислотна я последовательн ость/ Amino acid sequence		
p	333-341	A24, B39	CHSAAFEDL	98.13	0.23
p	174-182	B27	RRSGAAGAA	98.13	0.11
p	317-325	A3	RPNENPAHK	97.86	0.13
11696	114-122	B44	EEIRRIWRQ	53.30	0.49
63408	23-31	A3, B44	TEIRASVGK	51.63	0.03
164131	32-40	A3, B62	MIGGIGRFY	44.72	0.32
19421	17-25	B44	GERQNATEI	1.53	0.02
p	125-133	B39	NGDDATAGL	1.40	0.16
p	211-219	A26, B62	NGRKTRIAY	1.36	0.02
p	213-221	B27	RKTRIAYER	1.29	0.29
p	31-39	A2, A24	KMIGGIGRF	0.44	0.29
p	30-38	A3	GKMIGGIGR	0.44	0.27

Примечание: p – эпитоп предсказан.

Note: p – epitope is predicted.

Таблица 3. Консервация экспериментально определенных и предсказанных

ЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год.

Table 3. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of attenuation donor A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023.

Эпитопы NP вируса гриппа А/WSN/1933 (H1N1)/ NP epitopes of influenza virus A/WSN/1933 (H1N1)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), %/ Conservancy of NP CTL-epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказан ие ЦТЛ- иммуноген ности эпито- па, баллы/Predi ction of epitope CTL- immunogen icity, score
Номер эпитопа в IEDB/Epito pe IEDB ID	Позици я на тран- крипте NP/Posi tion in NP transcrip t	Связыв аю- щий эпитоп HLA- суперти п/Epitop e- binding HLA supertyp e	Аминокислотна я последовательн ость/ Amino acid sequence		
167950	198-206	A24, B27	KRGINDRNF	99.01	0.20
53890	199-207	B58	RGINDRNF	99.01	0.17
р	174-182	B27	RRSGAAGAA	98.13	0.11
р	245-253	B27, B39	SRNPGNAEI	96.43	0.11
р	250-258	A1, A3	NAEIEDLIF	96.36	0.35
р	114-122	B44	EEIRRIWRQ	53.30	0.49
п р	276-284	B7	LPACVYGPA	2.11	0.02
19421	17-25	B44	GERQNATEI	1.53	0.02
р	125-133	B39	NGDDATAGL	1.40	0.16
р	211–219	A26, B62	NGRKTRIAIY	1.36	0.02
р	333-341	A24	CNSAAFEDL	1.33	0.23
р	213-221	B27	RKTRIAIYER	1.29	0.29

Примечание: р – эпитоп предсказан.

Note: р – epitope is predicted.

Таблица 4. Консервация экспериментально определенных и предсказанных

ЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год.

Table 4. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of attenuation donor A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023.

Эпитопы NP вируса гриппа A/WSN/1933 (H1N1)/ NP epitopes of influenza virus A/WSN/1933 (H1N1)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), %/ Conservancy of NP CTL-epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказан ие ЦТЛ- иммуноген ности эпито- па, баллы/Predi ction of epitope CTL- immunogen icity, score
Номер эпитопа в IEDB/Epito pe IEDB ID	Позици я на транскрип те NP/Posi tion in NP transcrip t	Связыв аю- щий эпитоп HLA- суперти п/Epitop e- binding HLA supertyp e	Аминокислотна я последовательн ость/ Amino acid sequence		
p	174-182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
p	317-325	A3	RPNENPAHK	97,86	0,13
p	245-253	B27	SRNPGNAEI	96,43	0,11
984	251-259	B44	AEIEDLIFL	96,29	0,34
p	114-122	B44	EEIRRIWRQ	53,30	0,49
41691	32-40	A1, A3, A26	MIDGIGRFY	52,31	0,32
p	438-446	A3	SDMRAEIIR	51,74	0,32
p	30-38	A3	GKMIDGIGR	50,99	0,26
19421	17-25	B44	GERQNATEI	1,53	0,02
p	125-133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
p	333-341	A24	CNSAAFEDL	1,33	0,23
p	174-182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11

Примечание: p – эпитоп предсказан.

Note: p – epitope is predicted.

Таблица 5. Анализ представленности иммуногенных ЦТЛ-эпитопов современных вирусов гриппа А в последовательностях NP вакцинных доноров.

Table 5. Analysis of the representation of immunogenic CTL epitopes of contemporary influenza A viruses in the NP sequences of vaccine donors.

Иммуногенные ЦТЛ-эпитопы/ Immunogenic CTL-epitopes				Вирусы-доноры для создания вакцин/ Donor viruses for vaccine development			
Подтип вируса гриппа/ Influenza virus subtype	Аминокислотная последовательность/Amino acid sequence	Номер эпитопа/ Epitope ID	ЦТЛ-иммуногенность эпитопа, баллы/Epitope CTL-immunogenicity, score	A/WSN/1933	A/Leningrad/134/17/57	A/Ann Arbor/6/60	A/PR8/34
H1N1	RMIGGIGRF	p	0,29	-	-	-	-
H1N1	GRMIGGIGR	p	0,27	-	-	-	-
H1N1	KRGINDRNF	167950	0,20	-	+	-	-
H1N1	GENGRRTRV	p	0,19	-	-	-	-
H1N1	NGEDATAGL	p	0,18	-	-	-	-
H1N1	IQNSITIER	p	0,17	-	-	-	-
H1N1	GEDATAGLT	p	0,14	-	-	-	-
H1N1	AMELIRMIK	p	0,13	-	-	-	-
H1N1	SVGRMIGGI	p	0,07	-	-	-	-
H1N1	AVKGIGTMV	p	0,06	-	-	-	-
H1N1	GERQDTTEI	p	0,05	-	-	-	-
H1N1	MELIRMIKR	41392	0,01	-	-	-	-
H1N1, H3N2	MIDGIGRFY	41691	0,32	+	-	+	-
H1N1, H3N2	GINDRNFWR	20377	0,29	-	-	-	-

H1N1, H3N2	RGINDRNFV	53890	0,17	-	+	-	-
H1N1, H3N2	RRSGAAGAA	p	0,11	+	+	+	+
H1N1, H3N2	SRNPGNAEI	p	0,11	-	+	+	-
H3N2	EEIRRIWRQ	p	0,49	+	+	+	+
H3N2	NAEIEDLIF	p	0,35	-	+	-	-
H3N2	SDMRAEIIR	p	0,32	-	-	+	-
H3N2	GKMIDGIGR	p	0,26	+	-	+	-
H3N2	AANPIVPSF	p	0,05	-	-	-	-
H3N2	GDRQNATEI	p	0,02	-	-	-	-
H3N2	AAVKGIGTM	p	0,01	-	-	-	-
H3N2	NGEDATSGL	p	0,01	-	-	-	-
Представленность ЦТЛ-эпитопов в последовательности NP различных вакцинных доноров, %/ Representation of CTL-epitopes in the NP sequence of different vaccine donors, %				16	24	24	8

Примечание: p – эпитоп предсказан.

Note: p – epitope is predicted.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Рак Александра Яковлевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины;

адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;

телефон: 8(950)005-18-37;

e-mail rak.ay@iemspsb.ru

Rak Alexandra Ya. – PhD, Senior Researcher of Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine

address: 197022 St Petersburg, Akademika Pavlova st, 12;

telephone: 8(950)005-18-37;

e-mail rak.ay@iemspsb.ru

Блок 2. Информация об авторах

Руденко Лариса Георгиевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины;

Rudenko Larisa G. – MD, Professor, Head of Department of Virology, Institute of Experimental Medicine;

Исакова-Сивак Ирина Николаевна – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины;

Isakova-Sivak Irina N. – D.B.Sc., Corresponding Member of RAS, Head of Laboratory of immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine.

Блок 3. Метаданные статьи

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСЕРВАТИВНОСТИ ИММУНОГЕННЫХ
Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСОВ-ДОНОРОВ
ДЛЯ ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONSERVATION OF
NUCLEOPROTEIN IMMUNOGENIC T-CELL EPITOPES OF MASTER
DONOR VIRUSES FOR LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA VACCINES**

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ЭПИТОПЫ НР ДОНОРОВ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

NP EPITOPES OF INFLUENZA VACCINE DONORS

Ключевые слова: вирус гриппа, нуклеопротеин, белок нуклеокапсида, лимфоциты, Т-клеточный эпитоп, живая гриппозная вакцина.

Keywords: influenza virus, nucleoprotein, nucleocapsid protein, lymphocytes, T-cell epitope, live attenuated influenza vaccine.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 4.

Количество таблиц – 5,

Количество рисунков – 0.

26.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядко вый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi
10	Bui H. H., Sidney J., Li W., Fusseder N., Sette A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. BMC bioinformatics. 2007; 8: 1-6.	-	https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-361 [10.1186/1471-2105-8-361]
9	Calis J. J. A., Maybeno M., Greenbaum J.A., Weiskopf D., De Silva A.D., Sette A., Keşmir C., Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. PLoS Computational Biology. 2013; 9(10): e1003266.	-	https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003266 [10.1371/journal.pcbi.1003266]
2	Grant E., Wu C., Chan K.F., Eckle S., Bharadwaj M., Zou Q.M., Kedzierska K., Chen W. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8+ T-cell responses. Immunology and Cell Biology. 2013; 91(2): 184- 194.	-	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/icb.2012.78 [10.1038/icb.2012.78]

1	Influenza. World Health Organization (3 october 2023). — World Health Organization fact sheet. Access date: March 23, 2024. [Electr. resource]	-	https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)
7	Larsen M. V., Lundegaard C., Lamberth K., Buus S., Lund O., Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. BMC bioinformatics. 2007; 8: 1-12.	-	https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-424 [10.1186/1471-2105-8-424]
8	Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Keşmir C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. Immunogenetics. 2005; 57: 33-41.	-	https://link.springer.com/article/10.1007/s00251-005-0781-7 [10.1007/s00251-005-0781-7]
4	Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I.N. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. Vaccine. 2016; 34(45): 5436-5441.	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X16306752?via%3Dihub [10.1016/j.vaccine.2016.08.018]
6	Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular Systems Biology. 2011; 7(1): 539.	-	https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/msb.2011.75 [10.1038/msb.2011.75]

3	Sridhar S., Brokstad K.A., Cox R.J. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. Vaccines (Basel). 2015;3(2): 373-89.	-	https://www.mdpi.com/2076-393X/3/2/373 [10.3390/vaccines3020373]
12	Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 2011; 28(10): 2731-2739.	-	https://academic.oup.com/mbe/article/28/10/2731/973375 [10.1093/molbev/msr121]
5	Vita R., Overton J.A., Greenbaum J.A., Ponomarenko J., Clark J.D., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Gabbard J.L., Hix D., Sette A., Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. Nucleic Acids Research. 2015; 43(D1): D405-D412.	-	https://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D405/2439504 [10.1093/nar/gku938]
11	Weaver S., Shank S.D., Spielman S.J., Li M., Muse S.V., Kosakovsky Pond S.L. Datamonkey 2.0: a modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. Molecular Biology and Evolution. 2018; 35(3): 773-777.	-	https://academic.oup.com/mbe/article/35/3/773/4782511 [10.1093/molbev/msx335]