

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



А.Я. Рак, Л.Г. Руденко, И.Н. Исакова-Сивак

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**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 ее 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 (НР). 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<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (ЦТЛ-эпитопов), в НР белках вакцинных доноров, то есть о способности Т-киллеров, специфичных к «донорному» НР, к распознаванию нуклеопротеинов актуальных штаммов вируса гриппа А. Целью исследования явилась оценка консервативности иммуногенных ЦТЛ-эпитопов НР белка вирусов-доноров подтипов H1N1 и H2N2, традиционно используемых для создания ЖГВ и ИГВ. **Материалы и методы.** Иммуноэпитопный анализ *in silico* НР 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/134/17/57 (H2N2), А/Ann Arbor/6/60 (H2N2), А/PR/8/34 (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 НР 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 НР белка вирусов-доноров для ЖГВ и ИГВ не встречается

#### Адрес для переписки:

Рак Александра Яковлевна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 (950) 005-18-37.  
E-mail: rak.ay@iemspb.ru

#### Contacts:

Alexandra Ya. Rak  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Akademika Pavlova str., 12, Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (950) 005-18-37.  
E-mail: rak.ay@iemspb.ru

#### Для цитирования:

Рак А.Я., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Сравнительный анализ консервативности иммуногенных Т-клеточных эпитопов нуклеопротеина вирусов-доноров для живых и инактивированных гриппозных вакцин // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 601–608. doi: 10.15789/2220-7619-CAO-16660

#### Citation:

Rak A.Ya., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Comparative analysis of the conservation of nucleoprotein immunogenic T-cell epitopes of master donor viruses for live and inactivated influenza vaccines // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 601–608. doi: 10.15789/2220-7619-CAO-16660

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.

The work was performed under the project "Creation of bivalent vaccine against SARS-CoV-2 and influenza using a new technological platform", supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-75-30003.

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, T-клеточный эпитоп, живая гриппозная вакцина.

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

Rak A.Ya., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N.

*Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia*

**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 cause 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<sup>+</sup> 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](http://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/134/17/57 (H2N2), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/PR/8/34 (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.

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

## 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 млн случаев тяжелой формы заболевания, смертность от которых достигает 22% [4].

Одним из наиболее эффективных средств борьбы с гриппозной инфекцией является вакцинопрофилактика, чаще всего осуществляемая с использованием таких инструментов, как сплит-, рекомбинантные и инактивированные (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 T-клеточный гетеросубтипический иммунный ответ к внутреннему белку вириона — нуклеопротеину (NP), наиболее богатому иммуногенными эпитопами для CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов компоненту вируса гриппа [3].

Штаммы, составляющие основу сезонных ЖГВ и ИГВ, являются продуктами генетической реассортации циркулирующих вирусных вариантов и вакцинных доноров [9]. 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 гг. выделения, а именно A/WSN/1933 (H1N1) (используемый для получения современных вакцин

на основе наночастиц), A/PR/8/34 (H1N1) (донор высокой репродуктивности для создания ИГВ), A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), лицензированный для производства ЖГВ [7], 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<sup>+</sup> 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/PR/8/34 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1)) в составе NP вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2), циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год.

## Материалы и методы

Для проведения иммуноэпитопного анализа из базы данных NCBI Influenza Virus Sequence Database [11] были отобраны аминокислотные последовательности NP антигена вакцинных доноров (A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1) и A/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 гг. Из рассмотрения были исключены лабораторные штаммы, а также полностью гомологичные последовательности, выявленные при выравнивании алгоритмом ClustalO [8]. 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 [5]. Параметры вклада С-концевого протеолиза, эффективности TAP-опосредованного транспорта пептидов в просвет эндоплазматического ретикула (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 [6] 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 [2]. Для дальнейшего исследования отбирали эпитопы с баллом иммуногенности более 0. Анализ консервации эпитопов проводили в IEDB с использованием соответствующего алгоритма Epitope Conservancy Assay [1] 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.

## Результаты и обсуждение

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что только 2 из 12 отобранных ЦТЛ-эпитопов (16,7%) для NP вакцинного донора A/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 A/PR/8/34 (H1N1), где только 3 из 13 предсказанных NP-эпитопов (23,1%) сохранились практически у всех циркулирующих в настоящее время вирусов (табл. 2).

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

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

Однако, в отличие от этого вакцинного донора, в пределах NP A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) были выявлены два уникальных консервативных эпитопа (251–259 и 438–446) и не обнаружены такие эпитопы как 198–206, 199–207, 276–284, 211–219, 213–221, присутствующие в NP антигене родственного вируса A/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

**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), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA-супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence		
ρ	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
ρ	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
ρ	113–121	A3	KEEIRRIWR	53,27	0,51
ρ	30–38	A3	GKMIDGIGR	50,99	0,26
ρ	211–219	A26	NGRRTRIAY	1,97	0,29
ρ	213–221	B27	RRTRIAYER	1,97	0,29
ρ	214–222	B7	RTRIAYERM	1,97	0,30
19421	17–25	B44	GERQNATEI	1,53	0,02
ρ	125–133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
ρ	245–253	B27, B39	SRNPGNAEF	0,10	0,11

Примечание. ρ — эпитоп предсказан.

Note. ρ — epitope is predicted.

**Таблица 2. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP вакцинного донора A/PR/8/34 (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/PR/8/34 (H1N1) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023

Эпитопы NP вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) NP epitopes of influenza virus A/PR/8/34 (H1N1)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), % Conservancy of NP CTL- epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA-супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence		
ρ	333–341	A24, B39	CHSAAFEDL	98,13	0,23
ρ	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
ρ	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
ρ	125–133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
ρ	211–219	A26, B62	NGRKTRIAY	1,36	0,02
ρ	213–221	B27	RKTRIAYER	1,29	0,29
ρ	31–39	A2, A24	KMIGGIGRF	0,44	0,29
ρ	30–38	A3	GKMIGGIGR	0,44	0,27

Примечание. ρ — эпитоп предсказан.

Note. ρ — 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/Ленинград/134/17/57 (H2N2) NP epitopes of influenza virus A/Ленинград/134/17/57 (H2N2)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009– 2023), % Conservancy of NP CTL- epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA- супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence		
167950	198–206	A24, B27	KRGINDRNF	99,01	0,20
53890	199–207	B58	RGINDRNF	99,01	0,17
p	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
p	245–253	B27, B39	SRNPGNAEI	96,43	0,11
p	250–258	A1, A3	NAEIEDLIF	96,36	0,35
p	114–122	B44	EEIRRIWRQ	53,30	0,49
п p	276–284	B7	LPACVYGPA	2,11	0,02
19421	17–25	B44	GERQNATEI	1,53	0,02
p	125–133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
p	211–219	A26, B62	NGRKTRIAIY	1,36	0,02
p	333–341	A24	CNSAAFEDL	1,33	0,23
p	213–221	B27	RKTRIAIYER	1,29	0,29

Примечание. p — эпитоп предсказан.

Note. p — epitope is predicted.

**Таблица 4. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации А/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 А/Ann Arbor/6/60 (H2N2) NP epitopes of influenza virus A/Ann Arbor/6/60 (H2N2)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), % Conservancy of NP CTL- epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA- супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность 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	SDMRAEIR	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.

Далее мы провели поиск иммуногенных ЦТЛ-эпитопов, содержащих не более одного сайта протеолиза, в последовательностях NP современных штаммов вирусов гриппа А под-типа H1N1 и H3N2, рекомендованных ВОЗ для включения в состав поливалентных вакцин

для применения в эпидемические сезоны 2018–2024 гг. в Северном полушарии, а затем оценили представленность обнаруженных эпитопов в NP вакцинных доноров (табл. 5).

В целом проведенный анализ показал, что большинство NP-специфических иммунодоми-

**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/PR/8/34
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	AVKIGITMV	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	RGINDRNFWR	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	AAVKIGITM	p	0,01	–	–	–	–
H3N2	NGEDATSGL	p	0,01	–	–	–	–
<b>Представленность ЦТЛ-эпитопов в последовательности NP различных вакцинных доноров, %</b> 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.

нантных ЦТЛ-эпитопов вакцинных прототипов, разработанных на основе антигенно устаревших вирусов гриппа А, не присутствуют в современных штаммах, и напротив, представленность иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP антигена современных вирусов гриппа А у четырех наиболее популярных вакцинных доноров не превышает 24% (табл. 5), что может иметь по крайней мере два негативных последствия. Во-первых, массовое применение вакцин на основе неактуальных NP доноров приведет к клональной экспансии эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, не способных к распознаванию и уничтожению клеток, инфицированных недавними вариантами вируса гриппа, что неоправданно истощит иммунную систему вакцинируемых. Во-вторых, большинство новых эпитопов NP современных вирусов гриппа не будет распознаваться индуцированными вакциной Т-клетками, поскольку эти эпитопы еще не были представлены в вакцинах на основе классических доноров.

Среди проанализированных ЦТЛ-эпитопов NP четырех наиболее популярных вакцинных доноров по степени консервативности можно выделить три группы пептидов: высококонсервативные (для которых процент консервации составляет более 90%), среднеконсервативные (сохраняющиеся у 40–55% современных штаммов вируса гриппа А) и низкоконсервативные (с 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 [10, 12].

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что NP-специфические CD8<sup>+</sup> 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 цельновирионных гриппозных вакцин, помимо генов поверхностных белков (гемагглютинина 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.

## 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<sup>+</sup> 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.

## Список литературы/References

1. 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, vol. 8, pp. 1–6. doi: 10.1186/1471-2105-8-361
2. 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, vol. 9, no. 10: e1003266. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003266
3. 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<sup>+</sup> T-cell responses. *Immunology and Cell Biology*, 2013, vol. 91, no. 2, pp. 184–194. doi: 10.1038/icb.2012.78
4. Influenza. World Health Organization (3 october 2023). World Health Organization fact sheet. Access date: March 23, 2024. [Electr. resource]
5. 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, vol. 8, pp. 1–12. doi: 10.1186/1471-2105-8-424
6. 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, vol. 57, pp. 33–41. doi: 10.1007/s00251-005-0781-7
7. 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, vol. 34, no. 45, pp. 5436–5441. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.08.018

8. 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, vol. 7, no. 1: 539. doi: 10.1038/msb.2011.75
9. Sridhar S., Brokstad K.A., Cox R.J. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2015, vol. 3, no. 2, pp. 373–389. doi: 10.3390/vaccines3020373
10. 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. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
11. 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 Res.*, 2015, vol. 43, no. D1, pp. D405–D412. doi: 10.1093/nar/gku938
12. 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. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, vol. 35, no. 3, pp. 773–777. doi: 10.1093/molbev/msx335

---

**Авторы:**

**Рак А.Я.**, к.б.н., старший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Руденко Л.Г.**, д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Исакова-Сивак И.Н.**, член-корреспондент РАН, д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Rak A.Ya.**, PhD (Biology), Senior Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Rudenko L.G.**, DSc (Medicine), Professor, Head of A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Isakova-Sivak I.N.**, RAS Corresponding Member, DSc (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 26.03.2024  
Принята к печати 30.03.2024

Received 26.03.2024  
Accepted 30.03.2024