УДК 578.832.1

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОЭПИТОПНЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ СОВРЕМЕННЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВИРУСОВ ГРИППА А И ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А/ЛЕНИНГРАД/134/17/57 (H2N2) ДЛЯ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

**Кореньков Д.А., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова В.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н.**

*ФГБУ «НИИ Экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт–Петербург, e-mail: d.korenkov@gmail.com*

Вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины (ЖГВ) готовятся методом генетической реассортации актуальных циркулирующих вирусов с безвредным для человека донором аттенуации. В состав вакцинного штамма переходят поверхностные антигены от эпидемического вируса, а гены, кодирующие внутренние и неструктурные белки вириона, – от донора аттенуации. Иммунизация ЖГВ вызывает формирование не только гуморального, но и клеточного иммунного ответа, наиболее важным звеном которого является индукция вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) к внутреннему белку вириона – нуклеопротеину (NP). Ввиду того, что донор аттенуации для ЖГВ типа А – штамм А/Ленинград/134/17/57 (Лен/17) – происходит от вируса, выделенного в 1957 году, представлялось необходимым оценить, будут ли ЦТЛ, специфичные к NP белку вируса Лен/17, распознавать нуклеопротеины современных вирусов гриппа А. Мы провели иммуноэпитопный анализ *in silico* NP белков 757 штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, выделенных в 2009–2014 гг., в сравнении с донором аттенуации Лен/17, и показали, что большая часть предсказанных иммунодоминантных ЦТЛ-эпитопов NP белка вируса Лен/17 отсутствует у подавляющего большинства циркулирующих вирусов гриппа. Полученные данные указывают на необходимость включения в вакцинные штаммы ЖГВ NP гена от актуальных вирусов гриппа либо проведения точечного мутагенеза NP белка вируса Лен/17 с целью включения основных иммунодоминантных ЦТЛ-эпитопов современных вирусов.

**Ключевые слова: вирус гриппа, иммунодоминантный эпитоп, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), нуклеопротеин, живая гриппозная вакцина**

# COMPARATIVE IMMUNE EPITOPE ANALYSIS OF NUCLEOPROTEINS OF CURRENTLY CIRCULATING INFLUENZA A VIRUSES AND MASTER DONOR VIRUS A/LENINGRAD/134/17/57 (H2N2) FOR LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE

**Korenkov D.A., Isakova-Sivak I.N., Kuznetsova V.A., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N.**

*Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, e-mail: d.korenkov@gmail.com*

Vaccine strains for live attenuated influenza vaccine (LAIV) are prepared by genetic reassortment of currently circulating viruses with attenuated master donor virus (MDV). Genome of LAIV reassortants is composed of genes coding for surface glycoproteins from wild-type influenza viruses and genes encoding internal and non-structural proteins of the virion from the MDV. Immunization LAIV induces both humoral and cell-mediated immune response (CMI). CMI is mostly driven by the induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) to an internal virion protein – nucleoprotein (NP). Since MDV for type A LAIV – A/Leningrad/134/17/57 (Len/17) – originates from virus isolated in 1957, it seems necessary to evaluate whether the CTLs specific for NP protein of Len/17 will recognize NP protein of wild-type viruses. We conducted *in silico* immune epitope conservancy analysis of NP proteins of 757 influenza A strains (H1N1 and H3N2) isolated in 2009–2014. compared with the MDV. Here we demonstrate that most of the predicted immunodominant CTL epitopes of Len/17 NP protein is missing in the vast majority of circulating influenza viruses. These findings highlight the need for the inclusion of NP gene from wild-type influenza viruses into LAIV genome. The other possibility is that the NP gene of Len/17 can be mutated to include the major immunodominant CTL epitopes of circulating influenza viruses.

**Keywords: influenza virus, immunodominant epitope, cytotoxic T lymphocytes (CTL), nucleoprotein, live attenuated influenza vaccine**

Вирусы гриппа типа А являются высококонтагиозными респираторными патогенами, представляющими постоянную угрозу мировому сообществу. Ежегодные эпидемии гриппа вызывают от 3 до 5 миллионов случаев тяжелых респираторных заболеваний, не менее 250 тысяч из которых заканчиваются летальным исходом. Наиболее эффективным средством борьбы с гриппом является вакцинация. В настоящее время в практике здравоохранения применяется два вида гриппозных вакцин – инактивированные (ИГВ) и живые холодоадаптированные реассортантные (ЖГВ).

Иммунизация при помощи ИГВ приводит к формированию мощного гуморального иммунного ответа к поверхностным антигенам вируса гриппа – гемагглютинину (HA) и нейраминидазе (NA). Однако такой иммунный ответ является узкоспе-

цифичным, т.е. неспособным защитить привитого от дрейфовых вариантов вируса гриппа. В отличие от ИГВ, иммунизация ЖГВ приводит к формированию широкого спектра иммунитета, включая индукцию местного (локального) иммунного ответа, а также стимуляцию CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [11]. Иммунитет, опосредованный ЦТЛ, является перекрестным к различным сероподтипам вируса гриппа А, поскольку эти клетки распознают консервативные участки вирусных белков. Таким образом обеспечивается перекрестная защита привитых от дрейфовых и даже пандемических вариантов вирусов гриппа А [9]. Основной мишенью для образования CD8+ Т-клеток является молекула нуклеопротеина вируса гриппа А, содержащая наибольшее число эпитопов для ЦТЛ [7].

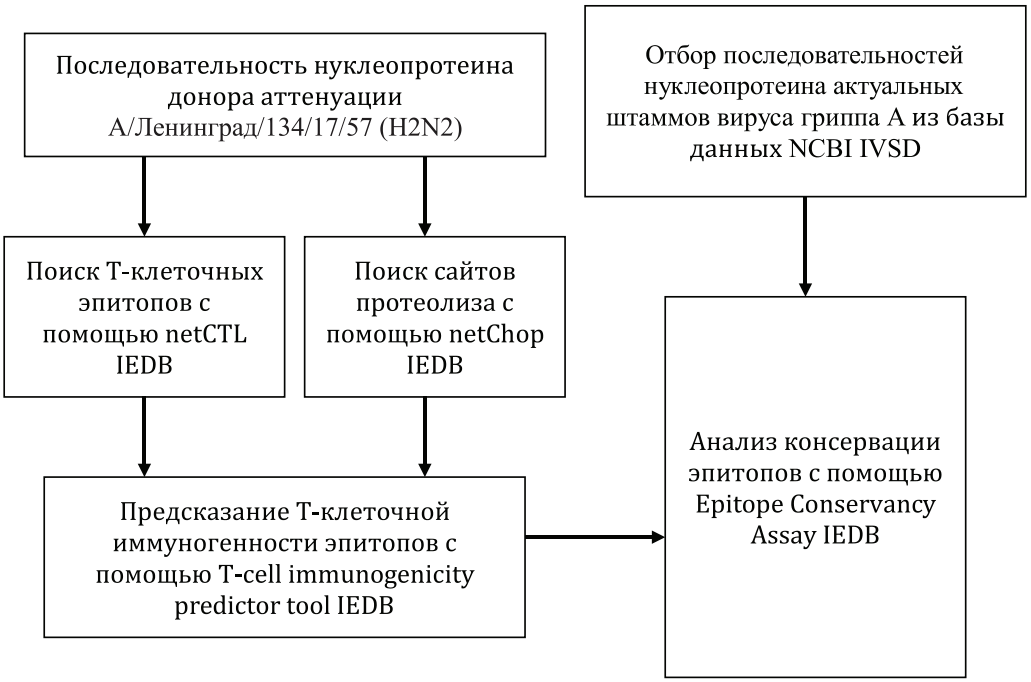
Вакцинные штаммы для ЖГВ готовятся путем реассортации генов дикого циркулирующего вируса гриппа А и холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В результате вакцинный штамм приобретает гены поверхностных белков (HA и NA) от дикого вируса, а вся часть генов внутренних белков, в том числе нуклеопротеина (NP) – от донора аттенуации [1]. Последние определяют безвредность (аттенуацию) ЖГВ. Однако донор аттенуации был получен из штамма 1957 года выделения и за более чем 50 лет нуклеопротеин циркулирующих вирусов мог значительно эволюционировать. Это несоответствие могло отразиться на антигенных свойствах современных вирусов и, как следствие, снижать спектр эффективности цитотоксического иммунитета у людей при вакцинации вирусом с антигенно устаревшим геном NP.

Цитотоксические Т-клетки распознают пептиды, представленные молекулами МНС с помощью Т-клеточного рецептора. Презентация вирусных пептидов в составе молекул МНС класса I обеспечивает элиминацию инфицированных клеток цитотоксическими CD8+ Т-клетками. Эффективность презентации вирусного пептида (способности быть эпитопом) складывается из двух составляющих: процессинга пептидов в пути презентации с МНС молекулами I класса и иммуногенности комплекса пептид-МНС. Основанные на анализе процессинга и презентации пептидов математические модели предсказания иммунодоминантных эпитопов недавно стали доступны в базе данных The immune epitope database 3.0 (IEDB) [14].

**Целью настоящего исследования** явился сравнительный анализ *in silico* молекулярной эволюции ЦТЛ-иммуноэпитопов нуклепротеина современных циркулирующих вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2) в сравнении с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) – Лен/17.

## Материалы и методы исследования

Алгоритм настоящего исследования приведен на рисунке. Анализ данных проводился в несколько этапов, описание которых приведено ниже.




*Алгоритм проведения in silico анализа консервации (консервативности) иммунногенных Т-клеточных МНС-I эпитопов нуклеопротеина в актуальных циркулирующих штаммах вируса гриппа А. NCBI IVSD – NCBI Influenza Virus Sequence Database, IEDB – The immune epitope database*

**Отбор последовательностей нуклеопротеина актуальных штаммов вируса гриппа А** проводили с помощью базы данных NCBI Influenza Virus Sequence Database [2]. Отбирали уникальные полные белковые последовательности нуклеопротеина вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, выделенных повсеместно от человека с 2009 года по настоящее время (октябрь 2014). Из поиска были исключены лабораторные штаммы. После выравнивания алгоритмом CrustalO [13] и проверки на отсутствие полной гомологии было получено 757 уникальных последовательностей (табл. 1). Последовательность нуклеопротеина Лен/17 была получена из локальной базы данных отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева, ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН [8]

**Таблица 1**

Объем выборки изолятов вируса гриппа А в проводимом исследовании

| Год выделения | Количество исследуемых нуклеопротеиновых последовательностей вирусов гриппа А серотипов | |
|---|---|---|
| | H1N1 | N3N2 |
| 2009 | 367 | 57 |
| 2010 | 65 | 37 |
| 2011 | 44 | 39 |
| 2012 | 10 | 40 |
| 2013 | 31 | 46 |
| 2014 | 20 | 1 |

**Поиск Т-клеточных эпитопов** проводили в базе данных иммунноэпитопов IEDB с помощью алгоритма предсказания ЦТЛ-эпитопов netCTL [10]. Параметры вклада С-концевого протеолиза, эффективности транспорта TAP (Transporter associated with antigen processing), порога отбора эпитопов были 0,15; 0,05 и 0,75, соответственно. Картирование эпитопов на последовательности вакцинного штамма вируса гриппа А Лен/17 производилось с помощью алгоритма выравнивания CrustalO в программе Jalview 2.8.1.

**Предсказание Т-клеточной иммуногенности эпитопов** проводили в базе данных иммуноэпитопов IEDB с помощью алгоритма T cell class I pMHC immunogenicity predictor [5]. Маскирование пептидов было проведено по 1, 2 и С-концевой аминокислотам. Эпитопы с баллом иммуногенности больше 0 (средний балл для неиммуногенных пептидов [5]) были отобраны для дальнейшего анализа

**Поиск сайтов** протеолиза нуклеопротеина проводили в базе данных иммунноэпитопов IEDB с помощью алгоритма протеосомного процессинга пептидов netChop [12]. Использовали метод анализа С-концевого протеолиза 3.0 с порогом 0,5.

**Анализ консервации** эпитопов проводили в базе данных иммуноэпитопов The immune epitope database (IEDB) 3.0 с помощью алгоритма epitope Conservancy Analysis [4] в режиме оценки линейных эпитопов с порогом идентичности последовательности не менее 100%. Идентичные последовательности удалялись перед анализом. Консервация эпитопа выражалась в виде процента штаммов с полностью гомологичными ему последовательностями относительно всей исследуемой выборки вирусов гриппа А.

## Результаты исследования и их обсуждение

При поиске Т-клеточных эпитопов в последовательности нуклеопротеина вируса гриппа Лен/17 было выявлено 210 9-мерных эпитопов для двенадцати HLA супертипов класса I (A1, A2, A3, A24, A26, B8, B27, B39, B44, B58, B62). Около половины эпитопов (103/210) были уникальными и связывались с молекулами HLA не более одного супертипа. После объединения общих эпитопов для нескольких HLA-супертипов были получены 138 уникальных последовательностей. Далее список из 138 эпитопов был ограничен теми, которые проходили проверку теста предсказания иммуногенности Т-клеточных эпитопов. Доля иммуногенных эпитопов составила 49% (68/138). Для исключения эпитопов с высоким риском протеолиза при протеосомном процессинге нуклеопротеина, из 68 были отобраны эпитопы не более чем с 1 предсказанным сайтом протеолиза. Доля эпитопов нуклепротеина Лен/17, прошедших эту проверку, составила 26% (18/68). Таким образом, с помощью применённого алгоритма (рисунок) были отобраны 18 из 210 проанализированных эпитопов, которые отвечали критериям ЦТЛ-иммуногенности и малой вероятностью протеолиза.

В табл. 2 представлены результаты анализа консервации иммуногенных эпитопов Лен/17. Анализ консервации позволяет оценить долю вирусов из исследуемой выборки, несущих в нуклеопротеине полностью гомологичные Лен/17 эпитопы (далее процент консервации). Из данных табл. 2 видно, что лишь 8 из 18 отобранных эпитопов (44,4%) были высококонсервативны, т.е. сохранялись в большинстве исследуемых нуклепротеинов вируса гриппа А (90% и более штаммов с идентичными последовательностями). Тогда как остальные 10 иммуногенных эпитопов были идентичны лишь у 4–33% современных циркулирующих вирусов гриппа А. Такая вариация в степени консервативности этих эпитопов говорит о различных механизмах селектирующего действия на вирусы. Опираясь на полученные данные, можно говорить о двух типах отбора иммуногенных ЦТЛ-эпитопов. В первую группу эпитопов входят высококонсерватиные последовательности (с процентом консервации более 90%), во-вторую – низкоконсервативные последовательности (с консервацией 4–33%). Оценка влияния отбора на эпитопы требует проверки и может быть установлена с помощью алгоритмов оценки молекулярной эволюции [6].

**Таблица 2**

Консервативность ЦТЛ-эпитопов нуклеопротеина (NP) донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) по отношению к современным штаммам вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2)

| Эпитопы NP вируса гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) | | | | Консервация Т-клеточных эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А 2009–2014 гг., % | Предсказание Т-клеточной иммуногенности эпитопа, баллы | Количество вероятных сайтов протеолиза |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Номер эпитопа | Позиция на транскрипте NP | Связывающий эпитоп HLA-супертип | Аминокислотная последовательность | | | |
| 84, 136 | 198–206 | A24, B27 | KRGINDRNF | 98,6% | 0,20 | 1 |
| 177 | 199–207 | B58 | RGINDRNFW | 98,6% | 0,17 | 1 |
| 31 | 200–208 | A3 | GINDRNFWR | 98,4% | 0,29 | 1 |
| 141 | 174–182 | B27 | RRSGAAGAA | 98,4% | 0,11 | 1 |
| 38 | 317–325 | A3 | RPNENPAHK | 97,9% | 0,13 | 1 |
| 138, 142 | 245–253 | B27, B39 | SRNPGNAEI | 97,8% | 0,11 | 1 |
| 52 | 66–74 | A3 | MVLSAFDER | 97,4% | 0,06 | 1 |
| 11 | 250–258 | A1 | NAEIEDLIF | 92,9% | 0,35 | 1 |
| 167 | 114–122 | B44 | EEIRRIWRQ | 33,0% | 0,49 | 1 |
| 50, 165 | 23–31 | A3, B44 | TEIRASVGK | 27,7% | 0,03 | 1 |
| 100 | 439–447 | A26 | DMRAEIIRM | 27,6% | 0,42 | 0 |
| 51 | 438–446 | A3 | SDMRAEIIR | 27,6% | 0,32 | 1 |
| 49 | 30–38 | A3 | GKMIDGIGR | 27,0% | 0,26 | 1 |
| 119 | 276–284 | B8 | LPACVYGPA | 5,8% | 0,02 | 1 |
| 159 | 17–25 | B44 | GERQNATEI | 4,9% | 0,02 | 1 |
| 145 | 125–133 | B39 | NGDDATAGL | 4,4% | 0,16 | 1 |
| 89, 206 | 211–219 | A26, B62 | NGRKTRIAY | 4,2% | 0,02 | 1 |
| 134 | 213–221 | B27 | RKTRIAYER | 4,0% | 0,29 | 1 |

Более того, в штаммах с отсутствием полностью гомологичных исследуемым эпитопам последовательностей совпадало от 5 до 8 аминокислотных остатков в 9-мерных пептидах. Замена даже одной аминокислоты может кардинально изменять иммуногенность пептида [3].

Важно отметить, что из семи наиболее иммуногенных эпитопов нуклеопротеина вируса Лен/17 (с уровнем предсказанной иммуногенности выше 0,2) лишь два эпитопа ($NP_{250-258}$ и $NP_{200-208}$) встречались у большинства циркулирующих штаммов вируса гриппа А (92–98%). Остальные 5 иммуногенных эпитопов нуклеопротеина Лен/17 (114–122, 439–447, 438–446, 213–221 и 30–38) встречались только у 4–33% современных вирусов.

Эти данные свидетельствуют о том, что ЦТЛ иммунный ответ, индуцированный вакцинацией штаммами ЖГВ, содержащими ген NP от вируса Лен/17, может быть направлен на 8 из 18 эпитопов (или на 2 из 7 высокоиммуногенных эпитопов) против инфекции актуальными вирусами гриппа А, что может сказаться на выраженности и спектре действия вирус-специфичного ЦТЛ иммунитета.

Устранить указанный недостаток современных штаммов ЖГВ можно двумя способами: первое – переносить в геном вакцинных штаммов ЖГВ, помимо поверхностных антигенов современных циркулирующих вирусов гриппа А, также и их NP ген. Второе – выявить аминокислотные остатки в NP белке донора аттенуации Лен/17, отличающиеся от циркулирующих штаммов вируса гриппа А и находящиеся в иммунодоминантных ЦТЛ-эпитопах последних. Точечный мутагенез таких аминокислот с помощью методов обратной генетики позволит создавать вакцинные штаммы ЖГВ с актуальным набором иммунодоминантных эпитопов в их нуклеопротеине.

## Заключение

С помощью математических моделей было предсказано наличие иммуногенных Т-клеточных эпитопов в нуклеопротеине донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), презентируемых в составе молекул МНС класса I. При анализе консервации показано, что больше половины этих эпитопов отсутствует у подавляющего числа современных вирусов гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, циркулирующих с 2009 года. Эти данные свидетельствуют о возможном недостаточно широком спектре цитотоксических вирус-специфичных Т-клеток индуцированных ЖГВ для защиты от актуальных

вирусов гриппа А. Обнаруженные эпитопы могут быть использованы в качестве перспективных мишеней для создания обратно-генетических вакцининдуцирующих широкий перекрестный цитотоксический Т-клеточный иммунитет против актуальных штаммов на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 14-15-00034.*

## Список литературы

1. Aleksandrova G.I. [Use of the genetic recombination method for obtaining vaccinal strains of the influenza virus] // Vopr Virusol. – 1977. № 4. – С. 387–95.

2. Bao Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., Ostell J., Lipman D. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information // J Virol. – 2008. – Т. 82, № 2. – С. 596–601.

3. Berkhoff E. G.M., Geelhoed-Mieras M.M., Fouchier R.A.M., Osterhaus A.D. M. E., Rimmelzwaan G.F. Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8+ T-cell clones // Journal of General Virology. – 2007. – Т. 88, № 2. – С. 530–535.

4. 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. – Т. 8. – С. 361.

5. Calis J.J., Maybeno M., Greenbaum J.A., Weiskopf D., De Silva A.D., Sette A., Kesmir C., Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity // PLoS Comput Biol. – 2013. – Т. 9, № 10. – С. e1003266.

6. Delport W., Poon A. F.Y., Frost S.D.W., Kosakovsky Pond S.L. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology // Bioinformatics. – 2010. – Т. 26, № 19. – С. 2455-–2457.

7. 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 // Immunol Cell Biol. – 2013. – Т. 91, № 2. – С. 184–94.

8. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J., Donis R.O. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) // Virology. – 2011. – Т. 412, № 2. – С. 297–305.

9. Kreijtz J.H., de Mutsert G., van Baalen C.A., Fouchier R.A., Osterhaus A. D., Rimmelzwaan G. F. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus // J Virol. – 2008. – Т. 82, № 11. – С. 5161–6.

10. 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. – Т. 8. – С. 424.

11. Naikhin A.N., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov E.M., Doroshenko E.M., Grigor'eva E.P., Suvorova M.A., Rudenko L.G. [Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the A/California/07/ 2009 (H1N1) virus, A(H1N1) pdm2009] // Vopr Virusol. – 2013. – Т. 58, № 2. – С. 38–42.

12. Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Kesmir C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage // Immunogenetics. – 2005. – Т. 57, № 1–2. – С. 33–41.

13. Fast, scalable generation of high□quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega / 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., 2011. – Т. 1.

14. 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. – 2014.10.1093/nar/gku938.

## References

1. Aleksandrova G.I. [Use of the genetic recombination method for obtaining vaccinal strains of the influenza virus] Vopr Virusol. 1977. no. 4. pp. 387–95.

2. Bao Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., Ostell J., Lipman D. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information J Virol. 2008. V. 82, no. 2. pp. 596–601.

3. Berkhoff E. G.M., Geelhoed-Mieras M.M., Fouchier R.A.M., Osterhaus A.D.M.E., Rimmelzwaan G.F. Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8+ T-cell clones Journal of General Virology. 2007. Vol. 88, no. 2. pp. 530–535.

4. 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. 361.

5. Calis J.J., Maybeno M., Greenbaum J.A., Weiskopf D., De Silva A.D., Sette A., Kesmir C., Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity PLoS Comput Biol. 2013. Vol. 9, no. 10. pp. e1003266.

6. Delport W., Poon A.F.Y., Frost S.D.W., Kosakovsky Pond S.L. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology Bioinformatics. 2010. Vol. 26, no. 19. pp. 2455–2457.

7. 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 Immunol Cell Biol. 2013. Vol. 91, no. 2. pp. 184–94.

8. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N. J., Donis R.O. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) Virology. 2011. Vol. 412, no. 2. pp. 297–305.

9. Kreijtz J.H., de Mutsert G., van Baalen C.A., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G. F. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus J Virol. 2008. Vol. 82, no. 11. pp. 5161–6.

10. 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. 424.

11. Naikhin A.N., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov E.M., Doroshenko E.M., Grigor'eva E. P., Suvorova M. A., Rudenko L. G. [Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the A/California/07/ 2009 (H1N1) virus, A(H1N1) pdm2009] Vopr Virusol. 2013. Vol. 58, no. 2. pp. 38–42.

12. Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Kesmir C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage Immunogenetics. 2005. Vol. 57, no. 1–2. pp. 33–41.

13. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. / 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., 2011. Vol. 1.

14. 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. 2014.10.1093/nar/gku938.

**Рецензенты:**

Назаров П.Г., д.м.н., профессор, зав. отделом иммунологии, ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;

Кривицкая В.З., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии диагностических препаратов отдела биотехнологии, ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 06.11.2014.