

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



## ***In silico* идентификация В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней (African swine fever virus, *Asfivirus*, *Asfarviridae*)**

Мима К.А., Каторкина Е.И., Каторкин С.А., Цыбанов С.Ж., Малоголовкин А.С.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», 601125, Владимирская область, Петушинский р-н, пос. Вольгинский, Россия

**Ведение.** Вирус африканской чумы свиней (АЧС) – крупный ДНК-вирус, единственный представитель семейства *Asfarviridae*. Распространение вируса АЧС на территории РФ, стран Восточной Европы и Китая свидетельствует о неэффективности существующих способов борьбы с заболеванием и стимулирует исследования, направленные на создание вакцин. Одним из значимых антигенов, необходимых для формирования иммунной защиты против АЧС, является серотипспецифический вирусный белок CD2v.

**Цель работы** – идентификация В- и Т-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС с использованием методов *in silico* прогнозирования.

**Материал и методы.** Первичную последовательность белка CD2v вируса АЧС штамма Georgia 2007/1 анализировали с помощью программ VCPred, DiscoTop, NetCTLpan, VaxiJen, PVS и Epitope Conservancy Analysis.

**Результаты.** На основании проведённого комплексного многопараметрического анализа определены четыре В-клеточных иммуногенных эпитопа в секреторной области белка. Анализ секреторной области белка CD2v вируса АЧС в программе NetCTLpan позволил выявить пять Т-клеточных эпитопов с 32-й по 197-ю позицию аминокислот, имеющих перекрёстное связывание с 1-й по 13-ю аллель главного комплекса гистосовместимости I класса свиньи.

**Обсуждение.** В данном исследовании представлены результаты использования методов прогнозирования *in silico* для выявления В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса АЧС. Результаты анализа свидетельствуют о кластерном распределении эпитопов в белке CD2v. Наибольший интерес для дальнейшего использования в качестве компонента рекомбинантной полиэпитопной вакцины против АЧС представляет растворимая область белка CD2v с 17-й по 204-ю аминокислоту, содержащая В- и Т-клеточные эпитопы.

**Заключение.** Идентифицированы В- и Т-клеточные эпитопы в секреторной области белка CD2v (с 17-й по 204-ю позицию аминокислот) вируса АЧС с помощью *in silico* программ. Анализ консервативности В- и Т-клеточных эпитопов позволил сформировать карту распределения иммунных эпитопов в последовательности белка CD2v.

**Ключевые слова:** африканская чума свиней; белок CD2v; *in silico*; прогнозирование линейных В-эпитопов; прогнозирование линейных Т-эпитопов; главный комплекс гистосовместимости I класса; анализ иммуногенности пептида; анализ вариабельности белка; анализ консервативности иммуноэпитопов.

**Для цитирования:** Мима К.А., Каторкина Е.И., Каторкин С.А., Цыбанов С.Ж., Малоголовкин А.С. *In silico* идентификация В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней (*African swine fever virus, Asfivirus, Asfarviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 103-112.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-103-112>

**Для корреспонденции:** Мима Ксения Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории генетики вирусов ФГБНУ ФИЦВиМ, 601125, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский. E-mail: [mima89@ya.ru](mailto:mima89@ya.ru)

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-316-00092.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Участие авторов.** Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Поступила 09.01.2020  
Принята в печать 29.01.2020

### ***In silico* prediction of B- and T-cell epitopes in the CD2v protein of african swine fever virus (*African swine fever virus, Asfivirus, Asfarviridae*)**

Kseniya A. Mima, Elena I. Katorkina, Sergey A. Katorkin, Sodnom Zh. Tsybanov, Aleksandr S. Malogolovkin

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Vladimir region, Volginskiy, 601125, Russia

**Introduction.** African swine fever virus (ASF) is a large DNA virus that is the only member of the *Asfarviridae* family. The spread of the ASF virus in the territory of the Russian Federation, Eastern Europe and China indicates the ineffectiveness of existing methods of combating the disease and reinforces the urgent need to create effective

vaccines. One of the most significant antigens required for the formation of immune protection against ASF is a serotype-specific CD2v protein.

**The purpose of the study.** This study presents the results of immuno-informatics on the identification of B- and T-cell epitopes for the CD2v protein of the ASF virus using *in silico* prediction methods.

**Material and methods.** The primary sequence of the CD2v protein of the ASFV virus strain Georgia 2007/1 (ID-FR682468) was analyzed *in silico* by programs BCPred, NetCTLpan, VaxiJen, PVS and Epitope Conservancy Analysis.

**Results.** Using the BCPred and VaxiJen programs, 4 major B-cell immunogenic epitopes were identified. Analysis of the secretory region of ASF virus CD2v protein in NetCTLpan revealed 5 T-cell epitopes from the 32nd to the 197th position of amino acids that cross-link from the 1st to the 13th allele of the MHC-I of pig

**Discussion.** This study presents the results *in silico* prediction to identify B- and T-cell epitopes of ASF virus CD2v protein. The soluble region of the CD2v protein can be included in the recombinant polyepitope vaccine against African swine fever.

**Conclusion.** B- and T-cell epitopes in the secretory region of the CD2v protein (from 17 to 204 aa) of ASF virus were identified by *in silico* prediction. An analysis of the conservatism of the identified B- and T-cell epitopes allowed us to develop a map of the distribution of immune epitopes in the CD2v protein sequence.

**Keywords:** African swine fever; CD2v protein; *in silico*; prediction of linear B-epitopes; prediction of linear T-epitopes; major histocompatibility complex class I; analysis of immunogenicity peptides; analysis of protein variability; analysis of the conservativeness of immunopeptides.

**For citation:** Mima K.A, Katorkina E.I, Katorkin S.A, Tsybanov S.Zh., Malogolovkin A.S. *In silico* prediction of B- and T-cell epitopes in the CD2v protein of african swine fever virus (*African swine fever virus, Asfvirus, Asfarviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(2): 103-112. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-103-112>

**For correspondence:** Ksenia A. Mima, PhD, Leading Researcher of Laboratory of Virus Genomics, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Volginsky, Vladimir region, 601125, Russia. E-mail: [mima89@ya.ru](mailto:mima89@ya.ru)

#### Information about the authors:

Mima K.A, <https://orcid.org/0000-0001-7184-6968>

Katorkina E.I., <https://orcid.org/0000-0003-3329-0182>

Katorkin S.A., <https://orcid.org/0000-0002-4844-9371>

Tsybanov S.Zh., <https://orcid.org/0000-0001-8994-0514>

Malogolovkin A.S., <https://orcid.org/0000-0003-1352-1780>

**Acknowledgments.** The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-316-00092.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Contribution.** The authors contributed equally to this article.

Received 09 January 2020  
Accepted 29 January 2020

## Введение

Африканская чума свиней (АЧС) – инфекционная болезнь диких и домашних свиней, характеризующаяся высокой летальностью (до 100%), сверхострым, подострым, острым и хроническим течением. На территории РФ она регистрируется с 2007 г., и на протяжении последних лет страны Восточной Европы и Китай являются территорией стационарного неблагополучия по данному заболеванию [1].

Вирус АЧС – представитель семейства *Asfarviridae*, рода *Asfvirus*. Геном вируса состоит из линейной двухцепочечной ДНК (дцДНК) размером 170–190 тыс. пар нуклеотидов, в зависимости от штамма/изолята. При анализе нуклеотидной последовательности генома референтного штамма Va71V вируса АЧС выявлено 150 открытых рамок считывания, а в инфицированных вирусом АЧС клетках идентифицировано 95 полипептидов с молекулярной массой от 10 до 220 кДа [2].

На протяжении многих лет исследовательские группы всего мира усиленно работают над созданием вакцины против АЧС на основе как аттенуированных штаммов, так и рекомбинантных вирусов с использо-

ванием ДНК- и РНК-технологий [3]. При разработке эффективных средств специфической профилактики против АЧС одним из актуальных направлений является использование рекомбинантных белков (эпитопов) иммунологически значимых белков вируса АЧС [4].

Вирусные белки, присутствующие на оболочке вирионов и поверхности инфицированных клеток, представляют основную мишень для клеточно-опосредованного иммунитета и могут быть мишенями для нейтрализующих антител, что, несомненно, требует детального изучения [5].

Ранее были идентифицированы белки, предположительно отвечающие за способность к интернализации вируса: p72/B646Lp, p54/E183Lp и p30/CP204Lp. Антитела к белкам p72/B646Lp и p54/E183Lp могут ингибировать связывание вируса с клетками, а антитела к p30/CP204Lp – интернализацию вируса [6]. Были идентифицированы и другие белки вируса АЧС, которые также отвечают за проникновение и распространение вируса. К ним относятся CD2v/EP402R, p12/O61Rp, D117L [6–8]. Применение данных белков в качестве протективных антигенов обеспечивало только частичную защиту, однако не защищало жи-

вотных от вирусов АЧС гетерологичного происхождения.

Известно, что отдельные эпитопы в составе вирусных антигенов способны индуцировать В- и Т-клеточный иммунный ответ и могут быть оптимальными кандидатами для создания эффективных вакцин [9].

Современные алгоритмы иммуноинформатики активно используются для поиска отдельных эпитопов вирусных антигенов для последующего включения их в состав кандидатных вакцин [10]. Эпитопы представляют собой короткие аминокислотные (аа) пептиды из 7–9 аа главного комплекса гистосовместимости I класса (major histocompatibility complex, МНС I) и 12–15 аа главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС II). Эпитопы Т-клеток, которые могут связываться с МНС I, стимулируют цитотоксические Т-лимфоциты.

Известно, что иммунная защита при АЧС реализуется за счёт цитотоксических Т-лимфоцитов-киллеров [11] и эффекторов антителозависимой клеточной цитотоксичности и действует против вирусных белков, представленных на поверхности заражённых моноситов [7, 12].

При поиске протективных антигенов вируса АЧС сотрудниками ФГБНУ ФИЦВиМ, [1, 12, 13] был идентифицирован и изучен CD2v белок вируса АЧС, являющийся важным компонентом при гомологичной инфекции. В качестве мишени для лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CD48 и CD58, и презентации антигенпрезентирующим клеткам предложено использовать секреторную часть белка вируса АЧС – CD2v [14]. Однако нет данных, подтверждающих, что только секреторная часть белка CD2v имеет В- и Т-клеточные эпитопы, обеспечивающие формирование иммунного ответа.

**Цель** данной работы – выявление В- и Т-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС с использованием методов *in silico* прогнозирования.

### Материал и методы

**Анализ аминокислотной последовательности.** Первичная последовательность белка CD2v вируса АЧС штамма Georgia 2007/1 (ID FR682468) была получена из базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Дополнительно для анализа вариабельности и консервативности использовали аминокислотные последовательности белка CD2v 103 полевых изолятов и штаммов вируса АЧС, представленные в базе данных Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

**Прогнозирование В-клеточных эпитопов.** Первичную последовательность белка CD2v вируса АЧС анализировали на наличие В-клеточных эпитопов с помощью программы VCPred и дополнительно VCPred + AAP (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>) при установленных стандартных параметрах. Для прогнозирования структурных В-клеточных эпитопов 3D-структуры белка CD2v вируса АЧС использовали сервер DiscoTope 2.0 (<http://tools.iedb.org/discotope>).

**Прогнозирование Т-клеточных эпитопов.** Т-клеточные линейные эпитопы анализировали в программе TepiTool (<http://tools.iedb.org/tepitool/>) и NetCTLpan 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTLpan/>) при установленных стандартных параметрах.

**Построение 3D-структуры белка CD2v вируса АЧС.** Для построения предполагаемой 3D-структуры белка CD2v вируса АЧС использовали сервер I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) при стандартных параметрах.

**Анализ иммуногенности** прогнозируемых В-эпитопов проводили с помощью программы VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) при установленных стандартных параметрах.

**Анализ вариабельности** белка CD2v вируса АЧС проводили в программе PVS (Protein Variability Server) ([www.imed.med.ucm.es/PVS/](http://www.imed.med.ucm.es/PVS/)) по методу Симпсона. Порог вариабельности выбран 0,46, согласно рекомендациям к программе.

**Анализ консервативности** эпитопов проводили в базе данных Epitope Conservancy Analysis с помощью алгоритма Epitope Conservancy Analysis (<http://tools.iedb.org/conservancy/>) при установленных стандартных параметрах.

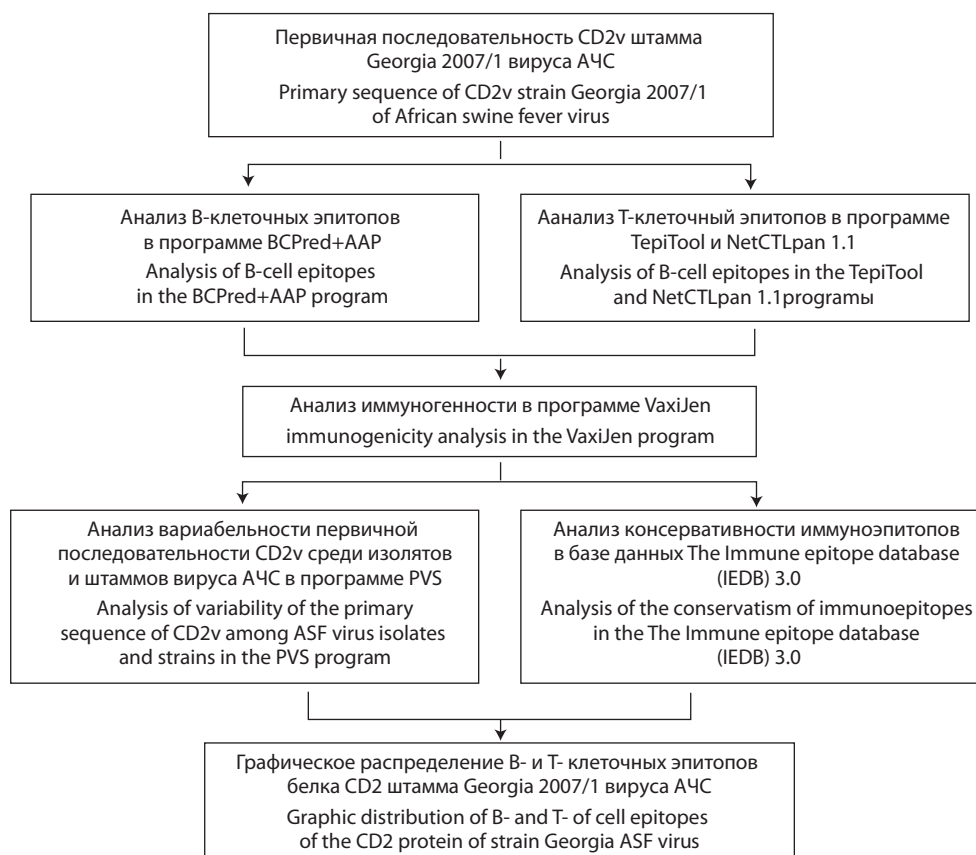
### Результаты

На первом этапе работы была смоделирована стратегия поиска и анализа В- и Т-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС. Для идентификации иммунных эпитопов была использована аминокислотная последовательность белка CD2v вируса АЧС штамма Georgia 2007/1. Выбор в пользу данного штамма объясняется тем, что, несмотря на длительный период циркуляции вируса на территории России (12 лет), современные штаммы и изоляты вируса АЧС сохраняют свою генетическую однородность и вирулентные свойства. Анализируя аналогичные работы [15–18], нами были выбраны часто применяемые инструменты биоинформатики для поиска и интерпретации В- и Т-клеточных эпитопов, которые были использованы для анализа антигена вируса АЧС. В результате была сформирована блок-схема дизайна исследования (рис. 1), которая позволила нам реализовать задачи и этапы исследования.

### Прогнозирование В-клеточных эпитопов

Известно, что антигенные эпитопы, способные индуцировать иммунитет обоих типов (В- и Т-клеточный), – хорошие кандидаты для разработки синтетических пептидных вакцин, иммунодиагностических тестов и выработки антител [9, 10]. Начальным этапом конструирования вакцин является предсказание В-клеточных эпитопов. Аминокислотная последовательность белка CD2v была подвергнута *in silico* прогнозированию на наличие В-клеточных эпитопов с помощью программы VCPred, с использованием метода прогнозирования линейных эпитопов в указанных В-клетках.

Методы VCPred и AAP (аминокислотная пара) довольно часто используют для прогнозирования В-кле-



**Рис. 1.** Дизайн исследования.

АЧС – африканская чума свиней.

**Fig. 1.** Study design.

ASF is African swine fever.

точных эпитопов фиксированной длины [19]. В нашем случае с помощью комбинации BCPred + AAP анализировали всю последовательность белка CD2v вируса АЧС (402 aa) на наличие линейных эпитопов длиной 20 aa, без перекрытия и с учётом специфичности не менее 75%.

Нами показано наличие девяти прогнозируемых В-клеточных эпитопов (табл. 1), имеющих высокие показатели прогнозирования – от 0,99 до 1,00 балла. Кроме того, было продемонстрировано, что большинство В-эпитопов находится во внецитоплазматическом домене (пять из девяти), они располагаются в позициях стартовых аминокислот 63, 104, 133, 154, 176.

Далее все девять эпитопов были проверены на иммуногенность с помощью программы VaxiJen [20]. При анализе учитывали только пептиды с показателем выше порогового значения (0,5). Так, четыре из девяти анализируемых эпитопов имеют наибольший количественный показатель прогнозирующей способности ( $AUC_{ROC}$ ), который варьируется от 0,5 для случайного прогноза до 1,0 для идеального прогноза. Можно отметить, что обнаруженные пептиды располагаются как в цитоплазматической, так и во внецитоплазматической части исследуемого белка. Наиболее иммуногенным представлен пептид в позиции 176-й

аминокислоты, имеющий  $AUC_{ROC} = 0,9935$ . При рассмотрении локализации данного эпитопа также выделяется его внецитоплазматическое расположение в последовательности белка CD2v вируса АЧС. Таким образом, нами выделены четыре из девяти В-клеточных эпитопов белка CD2v вируса АЧС.

### Прогнозирование Т-клеточных эпитопов

Рассматривая возможность дальнейшего создания пептидной вакцины, представляется логичным использование только внецитоплазматической части первичной последовательности белка CD2v вируса АЧС. Анализ секреторной части CD2v с 17-й по 204-ю аминокислоту проводили в программе NetCTLpan версия 1.1 только для МНС I [21], согласно параметрам программы, установленным по умолчанию: длина пептида – 9 aa; анализ проводили для свиных аллелей (SLA); порог идентификации пептида – 1,0; порог протеосомального расщепления (Cle) – 0,225; эффективность транспорта TAP (Transporter associated with antigen processing) – 0,025.

Вся последовательность CD2v была разделена на 196 пептидов длиной 9 aa каждый. В результате анализа пептиды-лиганды МНС I были выявлены в 33 аллелях: SLA-1\*0201, SLA-1\*0202, SLA-1\*0401,

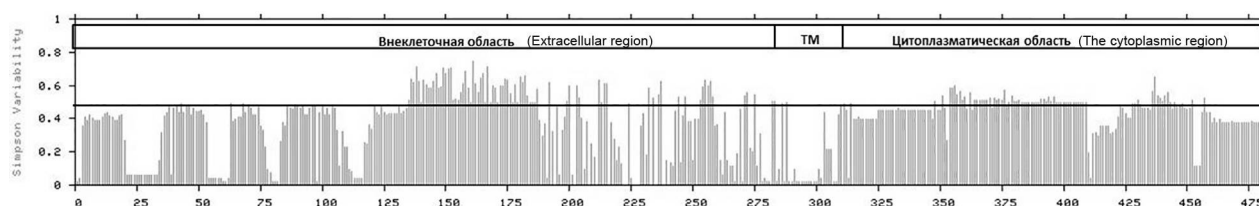
**Таблица 1.** *In silico* прогнозирование и анализ иммуногенности В-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней

**Table 1.** *In silico* prediction and analysis of the immunogenicity of B-cell epitopes of the African swine fever virus CD2v protein

Позиция аминокислот Amino acid position	Эпитоп Epitope	Показатель BCPred + AAP Score BCPred + AAP	Показатель AUC <sub>ROC</sub> Vaxijen Score AUC <sub>ROC</sub> Vaxijen	Иммуногенность Vaxijen Immunogenicity Vaxijen
232–254	<b>RKRKKHVEEIESPPPSESNE</b>	<b>1</b>	<b>0,5939</b>	++
371–390	SPPKPLPSIPLLNPPLST	1	0,3747	–
154–177	DTNGDILNYYWNGNNNFAT	1	0,2424	–
290–312	<b>PSTQPLNPFPLPKCPPPKP</b>	<b>1</b>	<b>0,4064</b>	+
104–126	<b>DKKINYTVKLLKSVDSPIT</b>	<b>1</b>	<b>0,5040</b>	++
266–286	SPRELLPKPYSRYQYNTPI	1	0,2061	–
176–196	<b>INNTISLNETENINCTNPI</b>	<b>1</b>	<b>0,9935</b>	+++
133–154	CKNNNGTNNVNIYLIINNTIV	1	0,0938	–
63–83	GNYCSCCGHNISLYNTTNNC	0,99	0,1204	–

**Примечание.** BCPred + AAP – показатель прогнозирования линейного эпитопа, где максимальное значение 1 балл; AUC<sub>ROC</sub> Vaxijen – количественный показатель прогнозирующей способности, варьируется от 0,5 для случайного прогноза до 1,0 для идеального прогноза, пороговое значение 0,5; серым цветом выделены эпитопы в цитоплазматическом домене; белым цветом представлены эпитопы во внецитоплазматическом домене; жирным шрифтом выделены эпитопы, имеющие прогнозируемую иммуногенность.

**Note.** BCPred + AAP - indicator of prediction of the linear epitope, where the maximum value is 1 point; AUC<sub>ROC</sub> Vaxijen - a quantitative indicator of predictive ability, which ranging from 0.5 for a random prediction, to 1.0 for an ideal prediction. A threshold value 0.5; epitopes in the cytoplasmic domain are highlighted in gray; epitopes in the extracytoplasmic domain are highlighted in white; epitopes with predicted immunogenicity are shown in bold font.



**Рис. 2.** Результаты анализа варибельности белка CD2v вируса африканской чумы свиней.

**Fig. 2.** Results of variability analysis of protein CD2v of African swine fever virus.

SLA-1\*0501, SLA-1\*0601, SLA-1\*0701, SLA-1\*0702, SLA-1\*0801, SLA-1\*1101, SLA-1\*1301, SLA-2\*0101, SLA-2\*0301, SLA-2\*0302, SLA-2\*0401, SLA-2\*0402, SLA-2\*0501, SLA-2\*0502, SLA-2\*0701, SLA-2\*1002, SLA-2\*1201, SLA-3\*0101, SLA-3\*0301, SLA-3\*0302, SLA-3\*0303, SLA-3\*0304, SLA-3\*0401, SLA-3\*0601, SLA-3\*0701, SLA-6\*0101, SLA-6\*0102, SLA-6\*0103, SLA-6\*0104 и SLA-6\*0105. В общей сложности всего было определено 53 пептида, способные связываться с МНС I (табл. 2).

Затем были выделены пептиды, имеющие перекрёстное связывание с несколькими аллелями МНС I (табл. 3). Так, пептид YYWNGNNNF способен связывать 13 аллелей с МНС I, SVDSPTITY – 10 аллелей, YGGLFWNTY – 8 аллелей, ITYNCTNSL – 5 аллелей, STLFYIIF – 4 аллели, GGLFWNTYY – 4 аллели, NTEIFNRTY – 3 аллели, DTNGDILNY – 3 аллели, остальные 6 пептидов способны связываться только с одной аллелью.

Далее мы искали аминокислотные последовательности белка CD2v в базе данных Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). В результате идентифицированы 103 источника первичной последовательности белка CD2v вируса АЧС. Множественное выравнивание полноразмерных последовательностей целевого белка CD2v различных штаммов и изолятов вируса АЧС

позволило определить от 51,5 до 100% гомологии. Затем сравнительный анализ 103 последовательностей белка CD2v в формате FASTA был использован для анализа варибельности. Варибельность белка CD2v вируса АЧС анализировали в программе PVS (Protein Variability Server) ([www.imed.med.ucm.es/PVS/](http://www.imed.med.ucm.es/PVS/)). Для анализа варибельных областей был использован метод Симпсона, основанный на расчёте индекса разнообразия аминокислотных последовательностей в пропорциях [22]. Индекс описывает вероятность того, что две последовательности с заменами, выбранные случайным образом, будут схожи с остальными аминокислотными последовательностями. Значения этого индекса находятся в диапазоне от 0 до 1 и тем больше, чем разнообразнее образцы. В нашем случае эталонной считалась консенсусная последовательность белка CD2v вируса АЧС. Порог изменчивости был установлен на уровне 0,46, как рекомендовано инструкцией.

Анализ варибельности белка CD2v вируса АЧС (рис. 2) показал, что наиболее варибельной областью является внеклеточная часть белка. Подробно рассматривая секреторную область, можно выделить участок со 130-й по 260-ю аминокислоту, имеющий наибольший профиль изменчивости. Однако в секреторной области встречаются и отдельные локусы, ко-

**Таблица 2.** *In silico* прогнозирование Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней

**Table 2.** *In silico* prediction of T-cell epitopes of the African swine fever virus CD2v protein

Аллель Allele	Пептид Peptide	Показатель MHC I Score MHC I	Показатель TAP Score TAP	Показатель Cle Score Cle	Показатель Comb Score Comb	Оценка достоверности Reliability index
SLA-1*0201	SVDSPTITY	0,40300	3,04100	0,97851	0,69919	0,80
SLA-1*0202	SVDSPTITY	0,40300	3,04100	0,97851	0,69919	0,80
SLA-1*0401	NTEIFNRTY	0,17800	2,93700	0,96077	0,46760	0,80
SLA-1*0401	SVDSPTITY	0,21800	3,04100	0,97851	0,51419	0,40
SLA-1*0401	ITYNCTNSL	0,21700	1,15300	0,96219	0,46232	0,80
SLA-1*0501	YGGLFWNTY	0,15300	2,48500	0,93511	0,42552	0,80
SLA-1*0501	YYWNGNNNF	0,21300	3,09200	0,96218	0,50679	0,15
SLA-1*0601	SVDSPTITY	0,24100	3,04100	0,97851	0,53719	0,80
SLA-1*0701	SVDSPTITY	0,18100	3,04100	0,97851	0,47719	0,80
SLA-1*0701	DTNGDILNY	0,24500	2,63400	0,81970	0,49528	0,80
SLA-1*0702	SVDSPTITY	0,18100	3,04100	0,97851	0,47719	0,80
SLA-1*0702	DTNGDILNY	0,24500	2,63400	0,81970	0,49528	0,80
SLA-1*0801	SVDSPTITY	0,22300	3,04100	0,97851	0,51919	0,80
SLA-1*1101	YGGLFWNTY	0,10000	2,48500	0,93511	0,37252	0,80
SLA-1*1101	YYDNRSNF	0,08400	2,61300	0,94314	0,36153	0,80
SLA-1*1101	YYWNGNNNF	0,10300	3,09200	0,96218	0,39679	0,30
SLA-1*1301	YYWNGNNNF	0,19700	3,09200	0,96218	0,49079	0,80
SLA-2*0101	STLFYIIF	0,19700	2,63200	0,66679	0,41283	0,80
SLA-2*0301	ITYNCTNSL	0,26900	1,15300	0,96219	0,51432	0,40
SLA-2*0302	SVDSPTITY	0,22700	3,04100	0,97851	0,52319	0,80
SLA-2*0401	YGGLFWNTY	0,16600	2,48500	0,93511	0,43852	0,80
SLA-2*0401	NTEIFNRTY	0,16400	2,93700	0,96077	0,45360	0,80
SLA-2*0401	DTNGDILNY	0,18500	2,63400	0,81970	0,43528	0,80
SLA-2*0402	NIFTINDTY	0,08600	3,34300	0,87245	0,36588	0,80
SLA-2*0402	YGGLFWNTY	0,09700	2,48500	0,93511	0,36952	0,80
SLA-2*0402	TYCGIAGNY	0,11600	3,07200	0,96286	0,40944	0,20
SLA-2*0402	YYWNGNNNF	0,10200	3,09200	0,96218	0,39579	0,30
SLA-2*0501	ITYNCTNSL	0,14200	1,15300	0,96219	0,38732	0,80
SLA-2*0502	ITYNCTNSL	0,30800	1,15300	0,96219	0,55332	0,30
SLA-2*0701	VFLNNIFTI	0,14600	0,79200	0,87718	0,36317	0,40
SLA-2*0701	SVDSPTITY	0,05000	3,04100	0,97851	0,34619	0,80
SLA-2*0701	YYWNGNNNF	0,06500	3,09200	0,96218	0,35879	0,80
SLA-2*1002	SVDSPTITY	0,29000	3,04100	0,97851	0,58619	0,80
SLA-2*1201	ITYNCTNSL	0,12700	1,15300	0,96219	0,37232	0,80
SLA-3*0101	KYQNYLSTL	0,29000	1,34200	0,78452	0,50007	0,80
SLA-3*0301	YGGLFWNTY	0,23700	2,48500	0,93511	0,50952	0,80
SLA-3*0301	GGLFWNTYY	0,21400	2,44500	0,93864	0,48632	0,80
SLA-3*0301	YYWNGNNNF	0,19500	3,09200	0,96218	0,48879	0,80
SLA-3*0302	NIFTINDTY	0,15300	3,34300	0,87245	0,43288	0,80
SLA-3*0302	YGGLFWNTY	0,21700	2,48500	0,93511	0,48952	0,30
SLA-3*0302	NTEIFNRTY	0,15500	2,93700	0,96077	0,44460	0,80
SLA-3*0302	YYWNGNNNF	0,16200	3,09200	0,96218	0,45579	0,80
SLA-3*0302	YQNYLSTLF	0,38700	2,59700	0,09834	0,47405	0,40
SLA-3*0303	YGGLFWNTY	0,23700	2,48500	0,93511	0,50952	0,80
SLA-3*0303	GGLFWNTYY	0,21400	2,44500	0,93864	0,48632	0,80
SLA-3*0303	YYWNGNNNF	0,19500	3,09200	0,96218	0,48879	0,80
SLA-3*0304	YGGLFWNTY	0,25800	2,48500	0,93511	0,53052	0,40
SLA-3*0304	GGLFWNTYY	0,24300	2,44500	0,93864	0,51532	0,80
SLA-3*0401	STLFYIIF	0,45200	2,63200	0,66679	0,66783	0,20
SLA-3*0601	GGLFWNTYY	0,33100	2,44500	0,93864	0,60332	0,80
SLA-3*0601	STLFYIIF	0,38000	2,63200	0,66679	0,59583	0,80
SLA-3*0701	STLFYIIF	0,39600	2,63200	0,66679	0,61183	0,80
SLA-6*0101	YYWNGNNNF	0,24100	3,09200	0,96218	0,53479	0,30
SLA-6*0102						
SLA-6*0103						
SLA-6*0104						
SLA-6*0105						

**Таблица 3.** Т-клеточные эпитопы белка CD2v вируса африканской чумы свиней, имеющие перекрёстное связывание с аллелями МНС I  
**Table 3.** T-cell epitopes of African swine fever virus CD2v protein cross-linked with MHC I alleles

№	Пептид Peptide	Аллель Allele	Показатель иммуногенности Score Immunogenicity	Иммуногенный потенциал Immunogenic potential
1	YYWNGNNNF	SLA-1*0501, SLA-1*1101, SLA-1*1301, SLA-2*0402, SLA-2*0701, SLA-3*0301, SLA-3*0302, SLA-3*0303, SLA-6*0101, SLA-6*0102, SLA-6*0103, SLA-6*0104, SLA-6*0105	0,0134	–
2	SVDSPTITY	SLA-1*0201, SLA-1*0202, SLA-1*0401, SLA-1*0601, SLA-1*0701, SLA-1*0702, SLA-1*0801, SLA-2*0302, SLA-2*0701, SLA-2*1002	-0,2392	–
3	YGGLFWNTY	SLA-1*0501, SLA-1*1101, SLA-2*0401, SLA-2*0402, SLA-3*0301, SLA-3*0302, SLA-3*0303, SLA-3*0304	0,1467	–
4	ITYNCTNSL	SLA-1*0401, SLA-2*0301, SLA-2*0501, SLA-2*0502, SLA-2*1201	0,5662	+
5	STLFYIHF	SLA-2*0101, SLA-3*0401, SLA-3*0601, SLA-3*0701	-0,0831	–
6	GGLFWNTYY	SLA-3*0301, SLA-3*0303, SLA-3*0304, SLA-3*0601	0,1157	–
7	NTEIFNRTY	SLA-1*0401, SLA-2*0401, SLA-3*0302	0,0108	–
8	DTNGDILNY	SLA-1*0701, SLA-1*0702, SLA-2*0401	-0,1999	–
9	YYDNNRSNF	SLA-1*1101	0,5656	+
10	NIFTINDTY	SLA-2*0402	0,5329	+
11	TYCGIAGNY	SLA-2*0402	1,3006	+++
12	VFLNNIFTI	SLA-2*0701	-0,2956	–
13	KYQNYLSTL	SLA-3*010	0,5117	+
14	YQNYLSTLF	SLA-3*0302	-0,0829	–



**Рис. 3.** Графическое распределение B- и T-клеточных эпитопов белка CD2v штамма Georgia 2007/1 вируса африканской чумы свиней.  
**Fig. 3.** Image of positions of B- and T-cell epitopes in CD2v protein of strain Georgia 2007/1 African swine fever virus.

которые имеют низкий показатель изменчивости и являются консервативными среди выборки штаммов и изолятов вируса АЧС. Наиболее консервативный профиль гетерогенности имеет С-концевая часть белка, которая характерна для цитоплазматической локализации.

Результаты определения вариабельности белка CD2v вируса АЧС легли в основу следующего исследования по анализу консервативности иммунных эпитопов. Консервативность эпитопов анализировали в базе данных иммуноэпитопов The immune epitope database (IEDB) 3.0 с помощью алгоритма Epitope Conservancy Analysis [23] и оценки линейных эпитопов с порогом идентичности последовательности не менее 100%. Консервацию эпитопа выражали в процентах (табл. 4) с полностью гомологичными ему последовательностями относитель-

но всей исследуемой выборки штаммов и изолятов вируса АЧС.

Как видно из результатов анализа консервативности, представленных в табл. 4, для четырёх B-клеточных эпитопов характерен диапазон консервативности от 50 до 100%. Наиболее консервативным является эпитоп PSTQPLNPFPLPKPCPPPKP, локализующийся в позиции от 290-й аминокислоты и имеющий 100% показатель гомологии. Наиболее вариабельным эпитопом оказался пептид DKKINYTVKLLKSVDSPTIT, локализующийся в позиции от 104-й аминокислоты и имеющий 50% показатель гомологии.

Так, в конце исследования нами была сформирована карта распределения идентифицированных иммунных эпитопов на первичной последовательности белка CD2 вируса АЧС (рис. 3), принадлежащих к современным полевым изолятам вируса АЧС, штамма Georgia 2007/1.

**Таблица 4.** Консервативность Т- и В-клеточных эпитопов белка CD2v в штаммах и изолятах вируса африканской чумы свиней

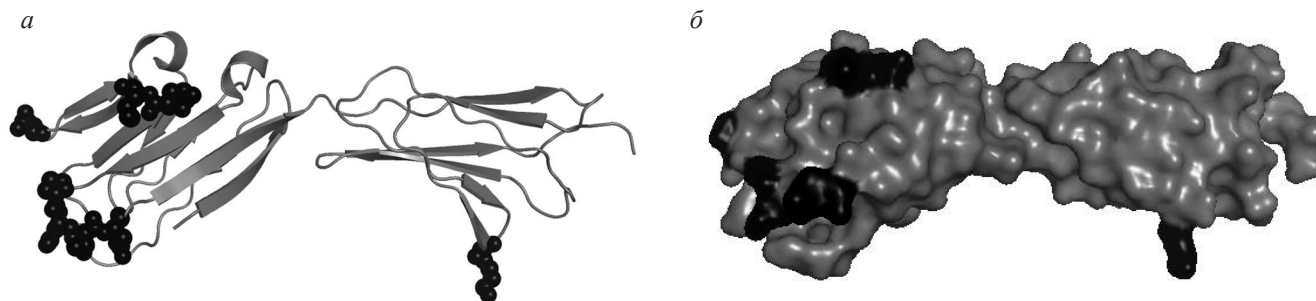
**Table 4.** Conservation of T-and B-cell epitopes of CD2v protein in strains and isolates of African swine fever virus

№	Позиция аминокислот Amino acid position	Последовательность Sequence	Иммуногенность Immunogenicity	Консервативность эпитопов,% Conservation of epitopes,%
В-клеточные эпитопы B-cell epitopes				
1	232–254	RKRKKHVEEIESPPSESNE	++	80
2	290–312	PSTQPLNPFPLPKCPPPKP	+	100
3	104–126	DKKINYTVKLLKSVDSPTIT	++	50
4	176–196	INNTISSLNETENINCTNPI	+++	65
Т-клеточные эпитопы T-cell epitopes				
1	122–131	ITYNCTNSL	+	88,89
2	48–57	YYDNNRSNF	+	44,44
3	32–41	NIFTINDTY	+	44
4	57–66	TYCGIAGNY	+++	55,56
5	197–206	KYQNYLSTL	+	33,33

**Таблица 5.** *In silico* прогнозирование структурных В-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней

**Table 5.** *In silico* prediction of structural B-cell epitopes of the African swine fever virus CD2v protein

Позиция аминокислоты, Amino acid position	Аминокислотный остаток Amino acid	Количество контактирующих остатков аминокислот Amount of contact amino acid	Скоринг приближённости Score proximity	Скоринг DiscoTop Score DiscoTop
21	VAL	9	-2,943	-3,639
32	LYS	0	-1,863	-1,648
40	ASN	1	-3,15	-2,903
80	PRO	10	-2,242	-3,134
81	ASN	12	-1,309	-2,538
83	THR	0	-0,447	-0,395
84	ASP	8	-0,935	-1,747
128	LYS	0	-4,154	-3,676



**Рис. 4.** 3D-модель структуры растворимой области белка CD2v вируса африканской чумы свиней штамма Georgia 2007/1, прогнозируемая сервером I-Tasser (а), и прогнозируемые структурные В-клеточные эпитопы белка CD2v вируса африканской чумы свиней в 3D-формате (б).

Области В-клеточных эпитопов показаны чёрным цветом.

**Fig. 4.** 3D model of the structure of soluble region of CD2v protein of strain Georgia 2007/1 African swine fever virus, predicted by server I-Tasser (a), and predicted structural B-cell epitopes of African swine fever virus CD2v protein in 3D format (b).

Areas of B-cell epitopes are shown in black.

### Прогнозирование структурных В-клеточных эпитопов

Для поиска структурных В-клеточных эпитопов была смоделирована предполагаемая 3D-модель растворимой области белка CD2v вируса АЧС штамма Georgia 2007/1. Используя программу I-Tasser, удалось получить несколько прогнозируемых 3D-структур

исследуемого белка, из которых модель 1CCZ pdb (рис. 4, а) обладала наибольшей структурной гомологией с белком CD2v. Модель трёхмерной структуры белка CD2v вируса АЧС – 1CCZ была использована в качестве матрицы для поиска конформационных В-клеточных эпитопов. С помощью сервера DiscoTop 2.0 и 3D-модели 1CCZ pdb были идентифи-



цированы 8 участков прогнозируемых В-клеточных эпитопов (см. рис. 4, б; табл. 5).

### Обсуждение

Ранее авторами [12, 13] было установлено, что белок CD2v вируса АЧС способен модулировать иммунный ответ и является неотъемлемым компонентом защиты. В связи с этим обнаружить наличие Т- и В-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС с использованием методов *in silico* прогнозирования стало актуальной задачей.

Прогнозирование в программе VCPred с дополнительным анализом AAP является основным методом, который позволяет предсказать наличие В-клеточных эпитопов в исследуемом белке. Нами выявлено 9 предполагаемых В-клеточных эпитопов. Дополнительный анализ иммуногенности в программе Vaxijen для выявленных пептидов позволил сузить круг пептидов до четырёх основных, несущих свойства антигенности. Иммуногенные В-клеточные эпитопы локализуются как во внецитоплазматической, так и во внутриплазматической части белка CD2v. Таким образом, были определены эпитопы (RKRRKKNVEEIESPPSESNE, PSTQPLNPFPLPKPCPPPKP, DKKINYTVKLLKSVDSPIT, INNTISSLNETENINCTNPI), которые входят в состав антигена CD2v и могут активировать В-клеточный иммунитет.

Далее был проведён анализ для идентификации Т-клеточных эпитопов, способных связываться с молекулой МНС I. К сожалению, отсутствие референсной трёхмерной структуры белка CD2v, а также *in silico* серверов с базами данных аллелей свиньи не позволяет оценить наличие структурных конформационных Т-клеточных эпитопов. Так, нами выявлено 53 линейных эпитопа только во внецитоплазматической области белка CD2v вируса АЧС. Пептиды, которые связываются с различными аллелями МНС I и одновременно имеют сайт расщепления протеосом на С-конце (Cle), высокоэффективны в прогнозировании Т-клеточных эпитопов. Применение анализа иммуногенности в программе Vaxijen позволило выявить Т-пептиды с большим иммуногенным потенциалом. В результате были выделены следующие пептиды, которые, по нашему мнению, заслуживают особого внимания для активации Т-клеточного ответа: ITYNCTNSL, YYDNNRSNF, NIFTINDTY, TYCGIAGNY, KYQNYLSTL.

Анализируя достоверность результатов идентификации Т-клеточных эпитопов, G. Вигмакина и соавт. [13] идентифицировали четыре кластера Т-клеточных эпитопа белка CD2v, показавших интерфероновый ответ на стимуляцию синтетическим пептидами клеток РВМС (peripheral blood mononuclear cell). Два Т-эпитопа были локализованы во внецитоплазматической области белка CD2v и затрагивали иммуноглобулин-подобный домен. Таким образом, подтверждено, что белок CD2v штамма Congo K-49 вируса АЧС имеет Т-клеточные эпитопы, способные активировать клетки CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. Кроме того, некоторые из этих пептидов совпали с *in silico* прогнозированием в программе CTLPred, что ещё раз доказывает обоснованность использования вычис-

лительных моделей и алгоритмов для поиска полиэпитопных антигенов.

Выявление конформационных В-эпитопов растворимой области белка CD2v позволило идентифицировать восемь структурных эпитопов. Это позволяет ещё раз убедиться в способности антигена CD2v вируса АЧС активировать В-клеточный иммунитет.

Учитывая возможность создания препарата для профилактики АЧС с помощью технологии рекомбинантных белков, нужно рассматривать структурные и физико-химические особенности данного белка, в частности, использования только растворимой области. Как упоминалось ранее, эпитопы, способные индуцировать иммунитет обоих типов (В- и Т-клетки), являются хорошими кандидатами для создания вакцины.

### Заключение

Результаты анализа *in silico* прогнозирования В- и Т-клеточных эпитопов позволяют сделать вывод о том, что аминокислотная последовательность с 17-й по 204-ю аминокислоту белка CD2v вируса АЧС может быть включена в конструкцию полиэпитопной В- и Т-клеточной вакцины против АЧС.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5-22 см. REFERENCES)

1. Середина А.Д. Белки вируса африканской чумы свиней. *Научный журнал КубГАУ*. 2012; 3(77): 1-12. Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/35.pdf>
4. Власова Н.Н. Перспективы использования методов молекулярной иммунологии и генной инженерии в системе мер по борьбе с африканской чумой свиней (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2012; 47(4): 22-30.
23. Мима К.А., Бурмакина Г.С., Титов И.А., Малооголовкин А.С. Иммунологически значимые гликопротеины р54 и CD2v вируса африканской чумы свиней: биоинформатический анализ генетических вариаций и гетерогенности. *Сельскохозяйственная биология*. 2015; 50(6): 785-93. DOI: <http://doi.org/10.15389/agrobiol.2015.6.785rus>

### REFERENCES

1. Sereda A.D. Proteins of African swine fever virus. *Nauchnyy zhurnal KubGAU*. 2012; 3(77): 1-12. Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/35.pdf> (in Russian)
2. Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res*. 2013; 173(1): 198-203. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
3. Barderas M.G., Rodriguez F., Gomez-Puertas P., Aviles M., Beitia F., Alonso C., et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch. Virol*. 2001; 146(9): 1681-91. DOI: <http://doi.org/10.1007/s007050170056>
4. Vlasova N.N. Prospects of molecular immunology and genetic engineering in control of African swine fever (review). *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2012; 47(4): 22-30. (in Russian)
5. Han T., Marasco W.A. Structural basis of influenza virus neutralization. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2011; 1217: 178-90. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05829.x>
6. Zsak L., Onisk D.V., Afonso C.L., Rock D.L. Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-Kda viral protein. *Virology*. 1993; 196(2): 596-602. DOI: <http://doi.org/10.1006/viro.1993.1515>
7. Escribano J.M., Galindo I., Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts. *Virus Res*. 2013; 173(1): 101-9. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.012>

8. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F., Rock D.L. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*. 2004; 319(2): 337-442.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2003.11.011>
9. Thomson S.A., Elliott S.L., Sherritt M.A., Sproat K.W., Coupar B.E., Scalzo A.A., et al. Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* 1996; 157(2): 822-6.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.11.009>
10. Khalili S., Jahangiri A., Borna H., Ahmadi Zanoos K., Amani J. Computational vaccinology and epitope vaccine design by immunoinformatics. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2014; 61(3): 285-307.  
DOI: <http://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.4>
11. Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A., Stirling C.M., Argilaguet J.M., Netherton C.L., et al. Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.* 2013; 173(1): 110-21.  
DOI: <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000490>
12. Burmakina G., Malogolovkin A., Tulman E.R., Zsak L., Delhon G., Diel D.G., et al. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(7): 1670-5.  
DOI: <http://doi.org/10.1099/jgv.0.001195>
13. Burmakina G., Malogolovkin A., Tulman E.R., Xu W., Delhon G., Kolbasov D., et al. Identification of T-cell epitopes in African swine fever virus CD2v and C-type lectin proteins. *J. Gen. Virol.* 2019; 100(2): 259-65.  
DOI: <http://doi.org/10.1097/01.tp.0000120377.57543.d8>
14. Crosby K., Yatko C., Dersimonian H., Pan L., Edge A.S. A novel monoclonal antibody inhibits the immune response of human cells against porcine cells: identification of a porcine antigen homologous to CD58. *Transplantation.* 2004; 77(8): 1288-94.  
DOI: <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000490>
15. Li X., Yang X., Jiang Y., Liu J. A novel HBV DNA vaccine based on T cell epitopes and its potential therapeutic effect in HBV transgenic mice. *Int. Immunol.* 2005; 17(10): 1293-302.  
DOI: <http://doi.org/10.1093/intimm/dxh305>
16. Oyarzun P., Kobe B. Computer-aided design of T-cell epitope-based vaccines: Addressing population coverage. *Int. J. Immunogenet.* 2015; 42(5): 313-21.  
DOI: <http://doi.org/10.1111/iji.12214>
17. Khan M.A., Hossain M.U., Rakib-Uz-Zaman S.M., Morshed M.N. Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Ebola viruses: An immunoinformatics study. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82(1): 25-34.  
DOI: <http://doi.org/10.1111/sji.12302>
18. Soria-Guerra R.E., Nieto-Gomez R., Govea-Alonso D.O., Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J. Biomed. Inform.* 2015; 53: 405-14.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
19. Chen J., Liu H., Yang J., Chou K.C. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids.* 2007; 33(3): 423-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1007/s00726-006-0485-9>
20. Doytchinova I.A., Flower D.R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8: 4.  
DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
21. Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. NetCTLpan: pan-specific MHC class I epitope predictions. *Immunogenetics.* 2010; 62(6): 357-68.  
DOI: <http://doi.org/10.1007/s00251-010-0441-4>
22. 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: 361.  
DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2105-8-361>
23. Mima K.A., Burmakina G.S., Titov I.A., Malogolovkin A.S. African swine fever virus glycoproteins p54 and CD2v in the context of immune response modulation: bioinformatic analysis of genetic variability and heterogeneity. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2015; 50(6): 785-93.  
DOI: <http://doi.org/http://doi.org/10.15389/agrobiol.2015.6.785eng> (in Russian)