

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-66-72

УДК 616.98:678.824.11

А.Г. Галеева¹, Н.И. Хаммадов¹, М.А. Ефимова^{1,2}**Биоинформатический анализ иммунодоминантных пептидов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus, Rhabdoviridae*)**¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация;²ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», Казань, Российская Федерация

Существует необходимость разработки антирабических вакцин нового поколения, обеспечивающих достижение протективного уровня антител после однократного введения. Перспективы решения данной проблемы открывают последние разработки в области «обратной вакцинологии». Основным параметром, определяющим эффективность рекомбинантных вакцин, является дизайн антиген-кодирующей последовательности. В связи с этим **целью** работы явилось проведение биоинформатического анализа пептидов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus, Rhabdoviridae*) для выявления иммуногенных эпитопов. **Материалы и методы.** Анализ 5 кандидатных протеиновых последовательностей более 100 штаммов и эпизоотических изолятов вируса бешенства проводили с использованием стандартных методов *in silico* прогнозирования по базе данных иммуногенных эпитопов The Immune Epitope Database (IEDB) (NIH, США). **Результаты и обсуждение.** В результате анализа первичных аминокислотных последовательностей, проведенного с использованием наиболее часто применяемых инструментов биоинформатики, установлено количество иммуногенных эпитопов и типы выявленного иммунного ответа (Т- и В-клеточные эпитопы, эпитопы связывания с МНС I класса) для вирусных белков: гликопротеина (G), нуклеопротеина (N), фосфопротеина (P), матричного протеина (M), РНК-зависимой РНК-полимеразы (L). В аминокислотной структуре указанных белков дополнительно идентифицированы сайты N- и O-гликозилирования, сигнальные пептиды и трансмембранные домены. В целях прогнозирования безопасности и эффективности данных белков в качестве компонентов рекомбинантных вакцин проведена *in silico* оценка их физико-химических свойств. Несмотря на то, что преобладающее количество эпитопов сосредоточено в структуре гликопротеина, эпитопы остальных белков, ранжируясь по уровню антигенности и консервативности, также могут представлять интерес в качестве компонентов профилактических препаратов либо диагностикумов. Представленные данные могут быть использованы при дизайне вставки в ходе конструирования вирус-векторной кандидатной вакцины либо контрольных положительных образцов в диагностических методах, основанных на индикации фрагментов вирусного генома.

Ключевые слова: вирус бешенства, рекомбинантные вакцины, биоинформатический анализ, обратная вакцинология.

Корреспондирующий автор: Галеева Антонина Глебовна, e-mail: antonina-95@yandex.ru.

Для цитирования: Галеева А.Г., Хаммадов Н.И., Ефимова М.А. Биоинформатический анализ иммунодоминантных пептидов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus, Rhabdoviridae*). Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 3:66–72. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-66-72

Поступила 10.03.2022. Отправлена на доработку 29.03.2023. Принята к публ. 14.04.2023.

A.G. Galeeva¹, N.I. Khammatov², M.A. Efimova^{1,2}**Bioinformatic Analysis of Immunodominant Peptides of Rabies Virus (*Rabies lyssavirus, Rhabdoviridae*)**¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation;²Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Russian Federation

Abstract. There is a need to develop a new generation of anti-rabies vaccines that provide a protective level of antibodies after a single injection. Prospects for solving this problem are opened by the latest developments in the field of “reverse vaccinology”. The main parameter that determines the effectiveness of recombinant vaccines is the design of the antigen-coding sequence. In this regard, **the aim** of the work was to conduct a bioinformatic analysis of rabies virus (*Rabies lyssavirus, Rhabdoviridae*) peptides to identify immunogenic epitopes. **Materials and methods.** Analysis of 5 candidate protein sequences of more than 100 strains and epizootic isolates of the rabies virus was performed using standard *in silico* prediction methods using Immune Epitope Database (IEDB) (NIH, USA). **Results and discussion.** As a result of the analysis of primary amino acid sequences, carried out using the most commonly used bioinformatics tools, the number of immunogenic epitopes and the types of immune response detected (T- and B-cell epitopes, class I MHC-binding epitopes) were established for viral proteins: glycoprotein (G), nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), RNA-dependent RNA polymerase (L). In the amino acid structure of these proteins, N- and O-glycosylation sites, signal peptides, and transmembrane domains were additionally identified. In order to predict the safety and efficacy of these proteins as components of recombinant vaccines, an *in silico* assessment of their physicochemical properties was carried out. Despite the fact that the predominant number of epitopes is concentrated in the structure of the glycoprotein, the epitopes of other proteins, ranging according to the level of antigenicity and conservatism, may also be of interest as components of preventive drugs or diagnostics. The presented data can be used in the design of the insert during the

construction of a candidate virus-vector vaccine or control positive samples in diagnostic methods based on the indication of viral genome fragments.

Key words: rabies virus, recombinant vaccines, bioinformatics analysis, reverse vaccinology.

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

Funding: The study was conducted within the framework of the Research and Development Project theme 04.10.2021.03/03.4-2.

Corresponding author: Antonina G. Galeeva, e-mail: antonina-95@yandex.ru.

Citation: Galeeva A.G., Khamadov N.I., Efimova M.A. Bioinformatic Analysis of Immunodominant Peptides of Rabies Virus (*Rabies lyssavirus*, *Rhabdoviridae*). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 3:66–72. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-66-72

Received 10.03.2022. *Revised* 29.03.2023. *Accepted* 14.04.2023.

Galeeva A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>
Khamadov N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5669-1486>

Efimova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>

Бешенство – вирусный антропозооноз, клинически характеризующийся развитием острого менингоэнцефалита, продолжает оставаться одной из инфекционных болезней с самой высокой летальностью: ежегодно в мире регистрируются десятки тысяч предотвратимых смертей [1]. В глобальном масштабе воздействие бешенства оценивается, согласно расчетам Всемирной организации здравоохранения, в 3,7 млн потерянных лет жизни (YLL – years of life lost) и 8,6 млрд долларов из-за затрат на постэкспозиционное лечение ежегодно [2]. Для большинства развивающихся стран бешенство является гиподиагностируемым заболеванием. Преобладающим источником инфекции (в 99 % случаев) для человека являются укусы собак. Экономически эффективный контроль распространения бешенства включает массовую вакцинацию и контроль популяций псовых [3]. Несмотря на неизбежный летальный исход после манифестации клинических симптомов, бешенство у человека можно предотвратить путем быстрого проведения постэкспозиционной профилактики [4]. В Российской Федерации для профилактики бешенства у людей и животных зарегистрированы и применяются культуральные инактивированные вакцины отечественного и зарубежного производства с доказанной клинической эффективностью и безопасностью [5]. Несмотря на несомненный успех современных коммерческих вакцин, условие многократной иммунизации делает предэкспозиционную профилактику бешенства неэкономичной для большинства развивающихся стран, что требует разработки вакцин нового поколения, обеспечивающих достижение протективного уровня антител после однократного введения.

Вирус бешенства относится к порядку *Mono-negavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, включающему как минимум 10 родов; род *Lyssavirus* включает классический вирус бешенства и 16 других генотипов, энзоотичных преимущественно в популяциях летучих мышей и разделенных на четыре главные филогенетические группы [6]. Геном рабдовирусов состоит из несегментированной одноцепочечной отрицательно-смысловой РНК размером около 12 тыс. нуклеотидов, кодирующей пять структурных белков: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матричный белок (M), гликопротеин

(G) и РНК-полимеразу (L), – расположенных в порядке 3'-NPMGL-5' и задействованных в вирусном патогенезе. Известно, что ключевой мишенью антирабических антител является гликопротеин вируса бешенства – единственный поверхностно-экспонированный белок (и лиганд для клеточного рецептора), в структуре которого был идентифицирован ряд антигенных участков, с которыми связываются нейтрализующие моноклональные антитела [7, 8]. Возможность клонирования гликопротеина в плазмидные векторы с целью экспрессии белка в различных системах привела к разработке ряда кандидатных вакцин, демонстрировавших высокий протективный эффект на мышинных моделях летального заражения [9]. Последние исследования по разработке антирабических вакцин основаны на экспрессии рекомбинантного гликопротеина *in vivo* путем трансдукции вирусным вектором [10].

Основным параметром, определяющим иммуногенность подобных вакцин, является структура не только вектора, но и вставки – антиген-кодирующей последовательности. Грамотный дизайн векторной вакцины открывает возможности комплексной стимуляции иммунного ответа, его высокой специфичности и безопасности [11]. В настоящее время исследователями все чаще применяются современные подходы к исследованию биомолекул, ключевая роль среди которых отводится биоинформатическим и протеомным методам, использующим обширные базы данных секвенирования эпитопов и функциональных доменов [12, 13]. Преимущество подобных алгоритмов исследования заключается в возможности тщательного отбора мишеней, ответственных за формирование протективного иммунного ответа, идентификации антигенов возбудителей особо опасных инфекций, а также в значительном сокращении временных и экономических затрат относительно традиционного подхода к конструированию вакцин. Данные факторы позволяют рассматривать *in silico* прогнозирование как достоверный и обоснованный метод идентификации антигенных детерминант [14].

В связи с вышеизложенным **целью** настоящего исследования явился биоинформатический анализ пептидов вируса бешенства для выявления иммунных эпитопов.

Материалы и методы

Анализ 5 кандидатных протеиновых последовательностей более 100 штаммов и эпизоотических изолятов вируса бешенства, полученных из депозитария Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США), осуществляли с использованием общепринятых методов биоинформатики [15, 16]. Поиск антигенных детерминант проводили при помощи методов *in silico* прогнозирования по базе данных иммуногенных эпитопов The Immune Epitope Database (IEDB) (НИН, США). Поиск трансмембранных доменов и сигнальных пептидов осуществляли при помощи онлайн-ресурсов ТМНММ 2.0 и SignalP 5.0 (DTU Health Tech, Дания). Прогнозирование сайтов N- и O-гликозилирования осуществляли при помощи сервисов NetNGlyc-1.0 и DictyOGlyc-1.1 (DTU Health Tech, Дания) при установленных стандартных параметрах. Физико-химические свойства протеинов определяли при помощи онлайн-ресурса Peptide Property Calculator – www.perpcalc.com (Innovagen AB, Швеция).

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что каждый вирусный белок имеет в своем составе T- и B-клеточные эпитопы, значительно различающиеся по своим иммуногенным свойствам, а также варьирующие по скорости изменчивости, для разработки эффективных антирабических вакцин и оценки иммуногенности вакцин-кандидатов целесообразно прогнозировать антигенные детерминанты и возможные иммунные ответы. В результате анализа

первичных аминокислотных последовательностей, проведенного с использованием наиболее часто применяемых инструментов биоинформатики, установлены количество иммуногенных эпитопов и тип выявленного иммунного ответа для каждого вирусного белка (табл. 1); в качестве примера использована последовательность вакцинного штамма Pasteur RIV.

Гликопротеин. Аминокислотная структура гликопротеина содержит 80 иммуногенных эпитопов; к антигену зарегистрировано 207 иммунных ответов, из которых 87 – T-клеточных, 113 – B-клеточных, 7 – к МНС I класса. Позитивный иммунный ответ зафиксирован к 32 эпитопам. Определено 5 сайтов N-гликозилирования в позициях 56, 177, 266, 338 и 484-й аминокислоты, а также O-гликозилирования – в позиции 501-й аминокислоты. Расположение трансмембранных доменов подразумевает наличие внешней части белка в позиции до 477-й аминокислоты, соответственно, возможность N-гликозилирования возможна во всех указанных случаях, кроме позиции 484-й аминокислоты.

Нуклеопротеин. В аминокислотной последовательности нуклеопротеина определен 61 иммуногенный эпитоп; к антигену выявлено 246 иммунных ответов, из которых 215 – T-клеточных, 29 – B-клеточных, 2 – к МНС I класса. Наиболее выраженный иммунный ответ зафиксирован к 23 эпитопам. Определено 3 сайта N-гликозилирования в позициях: 250, 326 и 443-й аминокислоты, 1 сайт O-гликозилирования – в позиции 401-й аминокислоты, сигнальных пептидов не выявлено. Отсутствие выраженных трансмембранных доменов подразумевает возможность N-гликозилирования.

Таблица 1 / Table 1

Наличие иммуногенных эпитопов в структуре протеинов вируса бешенства штамма Pasteur RIV
Presence of immunogenic epitopes in the structure of rabies virus proteins

Протеин, позиция в геноме Protein, position in genome	Выявленные эпитопы по типу иммунного ответа * Identified epitopes by type of immune response *		
	T-клеточный ответ T-cell response	B-клеточный ответ B-cell response	Ответ к МНС I класса Response to МНС I
G (гликопротеин / glycoprotein) (3291-4964) protein ID NP_056796.1	30-44, 37-63, 48-60, 70-84, 80-94, 89-97, 90-101, 51-63, 140-154, 171-198, 220-233, 263-310, 271-279, 297-311, 300-313, 302-342, 304-318, 311-342, 311-327, 333-341, 364-378	20-43, 31-42, 58-62, 209-222, 245-250, 268-287, 272-294, 279-286, 280-283, 333-341, 337-343	48-60, 304-318
N (нуклеопротеин / nucleoprotein) (59-1482) protein ID NP_056793.1	11-25, 89-103, 91-105, 121-135, 177-191, 201-214, 281-289, 284-292, 313-337, 317-325, 374-383, 402-416, 404-418, 406-420	1-42, 32-72, 89-103, 152-164, 313-337, 358-367, 359-366, 374-383, 388-407, 404-418	404-418
M (матричный белок / matrix protein) (2481-3285) protein ID NP_056795.1	–	25-30, 42-46	–
P (фосфопротеин / phosphoprotein) (1485-2475) protein ID NP_056794.1	90-109, 101-120, 113-132, 191-206	37-66, 47-52, 82-113, 154-171, 256-297, 262-266	101-120
L (РНК-направленная РНК-полимераза / RNA-directed RNA polymerase) (5388-11863) protein ID NP_056797.1	–	1479-1484, 1659-1663, 1724-1728	–

Примечание: * указаны эпитопы, на которые зарегистрирован положительный иммунный ответ.

Note: * epitopes for which a positive immune response has been registered are indicated.

Матричный протеин. В аминокислотной последовательности матричного протеина выявлено 2 иммуногенных эпитопа в позициях 25-29 (PPDDD), 25-30 (PPYDDD).

Фосфопротеин. В аминокислотной последовательности фосфопротеина выявлено 11 иммуногенных эпитопов с преимущественно В-клеточным типом иммунного ответа, к 9 из которых зафиксирован позитивный иммунный ответ. Определен один сайт N-гликозилирования в позиции 7-й аминокислоты, сигнальных пептидов не выявлено.

РНК-полимераза (L). В аминокислотной последовательности РНК-зависимой РНК-полимеразы выявлено 3 иммуногенных эпитопа с зафиксированным позитивным В-клеточным иммунным ответом. Определено 8 сайтов N-гликозилирования в позициях 68, 111, 135, 241, 1499, 1788, 1981 и 2055-й аминокислоты, отсутствие сигнальных пептидов подтверждено. Отсутствие выраженных трансмембранных доменов подразумевает возможность N-гликозилирования.

Из представленных данных видно, что все рассматриваемые протеины обладают потенциалом для формирования иммунного ответа. Последовательности нуклеопротеина, фосфопротеина и РНК-полимеразы представлены экзогенной структурой, без трансмембранных доменов и сигнальных пептидов. Последовательности гликопротеина и матричного протеина характеризуются наличием трансмембранного домена и, в случае гликопротеина, наличием внутренней части белковой молекулы и сигнального пептида. Карты аминокислотных последовательностей анализируемых протеинов с указанием локализации Т- и В-клеточных эпитопов, эпитопов связывания с МНС I класса, сигнальных пептидов, сайтов N- и O-гликозилирования и трансмембранных доменов, составленные на основе первичной последовательности штамма вируса бешенства Pasteur RIV, представлены в табл. 2.

На следующем этапе исследования для прогнозирования безопасности и эффективности применения белков в качестве компонентов вакцин проведена оценка их физико-химических свойств. Известно, что конформация синтезируемого рекомбинантного белка может отличаться от той, которую он имеет в клетке, что может приводить к изменению его свойств и влиять на эффективность конъюгации с адъювантами. Нами рассчитаны физико-химические параметры отобранных протеинов, влияющие на их стабильность и растворимость при экспрессии *in vitro* и применении *in vivo*: молекулярная масса, коэффициент экстинкции, суммарный заряд при нейтральном рН, изоэлектрическая точка (pI) и степень растворимости в воде. Обобщенная пептидная калькуляция анализируемых аминокислотных последовательностей представлена в табл. 3.

Представленные в табл. 3 данные характеризуют основные физико-химические свойства протеинов

вируса бешенства, спрогнозированные на основании их аминокислотных последовательностей, однако для конструирования новых протеинов с заданными свойствами необходимо учитывать не только первичную структуру, но и пространственную организацию эпитопов, что достигается их экспериментальным изучением.

Вакцинный потенциал большинства рассматриваемых эпитопов был раскрыт многими исследователями. Так, первые успешные попытки конструирования рекомбинантных вакцин были основаны на доставке посредством вирусного вектора цельного гена *G* штамма ERA [17]; полученные поксвирусные рекомбинанты активно использовались для борьбы с бешенством диких животных на территории США и некоторых европейских стран, демонстрируя выраженный протективный эффект [18]. В дальнейшем возникло предположение о способности рекомбинантных G- и N-антигенов синергически индуцировать иммунный ответ, что могло бы расширить спектр продуцируемых лиссавируснейтрализующих антител [19]; более того, ранее были получены сведения о протективном эффекте нуклеопротеина, отдельно экспрессируемого рекомбинантами вируса оспы енота [20], в связи с чем коэкспрессия генов *G* и *N* стала одной из приоритетных стратегий в разработке кандидатных вакцин. Сведения о первичной структуре белков Р и М, в свою очередь, были использованы для получения живых аттенуированных вакцинных штаммов, лишенных нейровирулентности: было показано, что делеции одноименных генов позволяют достичь апатогенности вируса бешенства [21]. Если первые попытки создания рекомбинантных вакцин были основаны на экспрессии цельных генов, то в последние годы обозначилась тенденция к созданию мультиэпитопных вакцин. Так, Y. Niu *et al.* представлена кандидатная вакцина на основе наиболее антигенных и консервативных эпитопов белка *G* штамма CVS с защитной эффективностью не менее 70 %: CLKLCGVLG (242-250), LVNLHDFR (276-283), LGPWSPIDINHLSC (30-43), CTKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEE (268-294) [22]. Также была предпринята попытка конструирования мультиэпитопной пептидной вакцины, включающей В- и Т-клеточные эпитопы гликопротеина: GCTNLSGFS (34-42), KRA (199-201), KLCGVL (226-231), W (251), HDFR (261-264), KSVRTWNEI (330-338), KG (342-343) – и демонстрирующей стабильность, безопасность и эффективность по результатам *in silico* прогнозирования [23]. Пристальный интерес исследователей к белку *G* как к единственной мишени для всех известных нейтрализующих антител обусловлен тщательно изученной структурой антигенных сайтов I, II, III, «а», однако в данных сайтах некоторых эскейп-мутантов вируса бешенства часто возникают аминокислотные замены, что не только предотвращает связывание антител с конкретным эпитопом, но и влияет на другие сайты связывания антител из-

Таблица 2 / Table 2

Карты аминокислотных последовательностей протеинов вируса бешенства
Amino acid sequence maps of rabies virus proteins

Протеин Protein	Последовательность Sequence
Нуклеопротеин (N) / Nucleoprotein (N) protein ID NP_056793.1	MDADKIVFKVNNQVVSLSKPEIIVDQYEQYKYPAIKDLKKPCITLGGKAPDLNKAAYSVLSCMSAAKLDPPDDVCSYLA AMQFEFGTCPEWTSYGIIVARKGDKITPGSLVEIKRTDVEGNWAL TGGMELTRDPTVPEHASLVGLLLSLYRLSKIS GQSTGNKYKTNADRIEQIFETAPFVKIVEHHTLMTTHKMCANWSTIPNFRFLAGTYDMFFSRIEHLYSAIRVGTVVTA YEDCSGLVSTGFIKQINLTAREAILYFFHKNFEEIIRRMFEPGQETA VPHSYFIHFRSLGLSGKSPYSSNAVGHVFNLI HFVGCYMGQVRSNLATVIAACAPHEMSVLGGYLGEFFFGKGTFFERRFRDEKELQEYEAELTKTDVALAD DGTV NSDDEDFYSGETRSPEAVYTRIIMNGGRLKRSHIRRYVSVSSNHQARPNSFAEFLNKTYSSDS
Фосфопротеин (P) / Phosphoprotein (P) protein ID NP_056794.1	MSKIFVNSAIRAGLADLEMAEETVDLNRNIEDNQAHLQGEPIEV DNLPEDMGRLLHDDGKSPNPGEMAKVGEK YREDFQMDGEDP SLLFQSYLDNVGVQIVRQIRSGNERFLKIQSQTVEEIIISYVAVN FPNPPGKSSSEDKSTQTTGRELK KETTPTPSQRESQSSKARMAAQTASGPPALEWSATNEEDDL SVEAEIAHQIAESFSKKYKPSRS S GILLYNFELQKLM NLDDIVLKEAKNVPGVTRLARDGSKLPLRCVLGWVALANSKKFQLLVESNKL SKIMQDDLNRYTSC
Матричный протеин (M) / Matrix protein (M) protein ID NP_056795.1	MNFLRKIVKNCREDDTQKPSVSAPLDDDDDLWLPPEYVPLKELTSSKNRRNFCINGGVKVCSPNGYSFGILRHILRS FDEIYSGNHRMVGLVKVVIKGLALSGAPVPEGMNVVYKLRRTLIFQWADSRGPLEGEELEYSQEITWDDNTEFVGLQ IRVSAKQCHIRGRIWCINMNSRAGQLWSDMSLQTRSEEDKDSLLLE
Гликопротеин (G) / Glycoprotein (G) protein ID NP_056796.1	MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPFIYTIPTD KLGWPWSPIDIHHLSCPNL VVEDEGCT NLSGFSYMELVKGYISAIKMNGFT CTGVVTEAETYTNFVGYVITTFKRKHFRPTDACCRAAYNWK MAGDP RYEESLHNPYPDYHWLRTVKTTKESLVIIS PSVADLDPYDRSLHSRVFPGGNSCGVAVSSTY CSTNHDIYTIWMPENPRLGMSCDFITNSRGKRASKGSETCGFVDER GLYKSLKGACKL KLCGVLGLRLMDGTWVAMQTSNE TKWCPPGQLVNLHDFRSDEIHLVVEELVKKREECLEDALE SIMITTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIIPSKGC LRVGGRRCHPHVNGVFNIGIILG PDGNVLIPEMQSLLQQHMEELLVSSVIPLMHPLADPSTVFKNGDEAEDFVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGKYVLL SAGALTALMLIIFLMTCWRRVNRSEPTQHNLRGTGREVS VTPQSGKIISWESYKSGGETGL
РНК-полимераза (L) / RNA polymerase (L) protein ID NP_056797.1	MLDPGEVYDDPIDPIELEAEPRGTPVNPILRNSDYNLSPLIEDPARLMLEWLKTGNRPYRMTLTDNCSRSFRVLKD YFKKVDLGLSKVGGMAAQSMISLWLYGAHSESNSRRRCITDLAHFYSSKSPIEKLLNLTLGNRGLRIPPEGVLSCLER VDYDNAGRYLANTYSSYLFFHVITLYMNALDWDEEKTILAKWDLTSVDIGKDLVKFKDQIWGLLIVTKDFVYSQ SSNCLFDRNYTLMLKDLFLSRFNSLMVLLSPPPEPRYSDDLISQLCQLYIAGDQVLSMCGNSGYEVKILEPYVNSLV QRAEKFRPLIHSGLDFPVFIKDKVSQLEETFGSCARRFRALDQFDNIHDLVVFYGCYRHWGHPYIDYRKGLSKLYD QVHIKKVIDKSYQECLASDLARRILRWGFDKYSKWYLSRFLARDHPLTPYIKTQTWPPKHIVDLVGDWHLKLPITQ IFEIPESMDPSEILDDKSHSFTTRTLASWLSENRGGVPSEKVIITALS KPPVNPREFLKSIDLGLPDEDLIIGLKP KERE LKIEGRFALMSWNLRLRYFVITEKLLANYILPLFDAL TMDNLNKVFKKIDRVTGQGLLDYSRVYAFHLDYKWK NNHQRESTEDVFSVLDQVFGKLRVFSRTEHFFQKSWIYSDRSDLIGLREDQIYCLDASNGPTCWNGQDGGLEGLR KQGWLSVLLMIDRESQIRNTRTKVLAQGDQVLCPTMYSPLSGLSQEGLLYELESISRNAFSIYRAVEEGASKLGLII KKEETMCSYDFLIYGKTPFRGNILVPESKRWARVSCVSNQIVNLANIMSTVSTNALTVAQHSQSLIKPMRDFLLM SVQAVFHRNYTLMLKDLFLSRFNSLMVLLSPPPEPRYSDDLISQLCQLYIAGDQVLSMCGNSGYEVKILEPYVNSLV SWIHALCQEAGNPD LGERTLESFTRLLEDPTTLNIRGGASPTILLKDAIRKALYDEVKDVENSEFREAILLSKTHRDNF ILFLTSVEPLFRFLSELFSSSLGIPESIGLIQNSRITRQFRKLSKTLSEESFYNSEIHGISRMTQTPTQRVGGVWPCSS RADLLREISWGRKVVGTTPHPSEMLGLLPKSSISCTCGATGGGNPRVSVSVLPSFDQSFCTGPLKGYLGSSTSMST QLFHAWEKVTNVHVVKRALSLKESINWFITRDSNLAQTLIRNLSLTGPDFLEEAPVFKRTGSALHRFKSARYSEG YSSVCPNLLSHISVTD TMSDLTQDGKNYDFMFQPLMLYAQTWSELVQRDTRLRDSTFHWHLQCNRCVRPIDDVT LETSQIFEPDVSKRISRMVSGAVPHFQRLPDIRLPGDFESLSGREKSHHIGSAQGLLYSILVAIHDSGYNDGTIFPVNI YGVKSPRDYLRGLARGVLIGSSICFLTRMTNINRPLELISGVISYILRLDNHPSLYIMLREPSFREEIFSIPQKIPAA PTTMKEGNSILCYLQHVLR YEREVITASPENWLVWFSDFRS AKMTYLTILITYQSHLLLQRVERNLKSKSMRDNLRQ LSSLMRQVLGGHGEDTLESDDNIQRLLKDSLRRTRWVDQEVRAARTMTGDYSPNKKVSRKVGCEWVCSAQV AVSTANPAPVSELDI RALSKRFQNP LIGSLRVVQWATGAHYKLPILDDLNVFSPCLVVGDGSGGISRAVLNMF DAKL VFNLSLEVN DLMASGTHPLPPSAIMRGGNDIVSRVIDFDSIW EKPSDLRNLATWKYFQSVQKQVMSYDLIC DAEVTDIASINRITLLMSDFALSIDGPLYLVFKTYGTMVNPNYKAIQHL SRAFPSTVGFITQVTSFSELYLRFSKRG KFFRDAEYLTSSTLREMSLVLFNCSSPKSEMQRARSLNYQDLVRGFPEEIIISPNYEMITLIDSDVESFLVHKMVDL ELQRGTLSKVAIIAIMIVFSNRVFN VSKPLTDPLFYPPSPDKILRHFNICSTMMYLSTALGDVPSFARLHDLYNRPIT YYFRKQVILGNVYLSWSWSNDTSVFKRVACNSSLSLSSH WIRLIYKIVKTRTLVSGIKDLSGEVERHLHRYNRWITL NIRSRSSLLDYSCLCIGYSWKPAAHAKTLV

Примечания: XXXXXX – иммуногенные эпитопы (при условии 100% идентичности)*; XXXXXX – сайты N-гликозилирования; XXXXXX – сайты O-гликозилирования; XXXXXX – сигнальные пептиды; XXXXXX – трансмембранные домены.
* Для большинства иммуногенных эпитопов в аминокислотных последовательностях вирусов бешенства 1-го генотипа (классического бешенства) уровень гомологии составляет 88–100%.

Notes: XXXXXX – immunogenic epitopes (provided 100% identity)*; XXXXXX – N-glycosylation sites; XXXXXX – O-glycosylation sites; XXXXXX – signal peptides; XXXXXX – transmembrane domains.
* For most immunogenic epitopes in the amino acid sequences of rabies viruses of the 1st genotype (classical rabies) the homology level is 88–100%.

за конформационных изменений в общей структуре белка [24]. Большинство конформационных эпитопов белка N, напротив, отличаются высокой консервативностью у различных штаммов вируса бешен-

ства и родственных лиссавирусов, однако антитела к этим эпитопам не обладают нейтрализующим действием, ввиду чего отдельные эпитопы белка N используются для создания вакцинных конструкций

Таблица 3 / Table 3

Физико-химические свойства протеинов вируса бешенства
Physico-chemical properties of rabies virus proteins

Название Name	Молекулярная масса, г/моль Molecular weight, g/mol	Коэффициент экстинкции, M ⁻¹ × см ⁻¹ Extinction coefficient, M ⁻¹ × cm ⁻¹	Суммарный заряд при нейтральном pH Total charge at neutral pH	Изоэлектрическая точка, pH Isoelectric point, pH	Растворимость в воде Solubility in water
G (505 а.о.) / (505 a.r.)	58534,77	78660	0,7	7,12	Плохая Poor
N (450 а.о.) / (450 a.r.)	50604,93	43950	-5,2	6,15	Хорошая Good
M (202 а.о.) / (202 a.r.)	23157	40540	-1	6,36	Хорошая Good
P (297 а.о.) / (297 a.r.)	33165,91	24750	-10,8	4,69	Хорошая Good
L (2142 а.о.) / (2142 a.r.)	244484	319900	18,6	8,06	Плохая Poor

существенно реже [25]. Роль обнаруженных вариативных эпитопов белков М, Р и L в транскрипции и репликации вируса до сих пор не ясна, однако известно, что антитела к данным эпитопам могут быть использованы в дифференциации штаммов вируса бешенства и, как следствие, в разработке профилактических препаратов [24].

На наш взгляд, наиболее перспективными для конструирования антирабических вакцин являются фрагменты гликопротеина в позициях с 29-го по 158-й а.о. и с 205-го по 378-й а.о., так как в них сосредоточено наибольшее количество спрогнозированных иммуногенных эпитопов. Для этого необходимо осуществлять подбор различных комбинаций данных эпитопов и анализ прототипных конструкций с применением методов структурной и функциональной протеомики. Решение проблемы достижения протективного антирабического иммунитета однократной иммунизацией, столь актуальной для эндемичных по бешенству стран, возможно путем подбора безопасных векторных систем, способных обеспечить длительную (до нескольких месяцев) экспрессию трансгенов в клетках организма-хозяина и, таким образом, формировать полноценный иммунный ответ.

Вышеизложенное подчеркивает необходимость дальнейшего анализа нейтрализующих антигенных участков. Подобные исследования приведут к более целенаправленному подходу в новой парадигме разработки вакцин с гарантированной стабильностью против мутационных изменений вирусных штаммов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках темы НИР 04.10.2021.03/03.4-2.

Список литературы

1. Taylor L.H., Hampson K., Fahrion A., Abela-Ridder B., Nel L.H. Difficulties in estimating the human bur-

den of canine rabies. *Acta Trop.* 2017; 165:133–40. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.12.007.

2. Hampson K., Coudeville L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Atlan M., Barrat J., Blanton J.D., Briggs D.J., Cleaveland S., Costa P., Freuling C.M., Hiby E., Knopf L., Leanes F., Meslin F.-X., Metlin A., Miranda M.E., Müller T., Nel L.H., Recuenco S., Rupprecht C.E., Schumacher C., Taylor L., Vigilato M.A.N., Zinsstag J., Dushoff J. Global alliance for rabies control partners for rabies prevention. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4):e0003709. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003709.

3. Ghai S., Hemachudha T. Continued failure of rabies elimination – Consideration of challenges in applying the one health approach. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9:847659. DOI: 10.3389/fvets.2022.847659.

4. Kessels J., Tarantola A., Salahuddin N., Blumberg L., Knopf L. Rabies post-exposure prophylaxis: A systematic review on abridged vaccination schedules and the effect of changing administration routes during a single course. *Vaccine.* 2019; 37 Suppl 1:A107–A117. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.01.041.

5. Елаков А.Л. Антирабические вакцины, применяемые в Российской Федерации, и перспективы их совершенствования. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(2):107–14. DOI: 10.36233/0507-4088-102.

6. Метлин А.Е. Современные аспекты классификации лиссавирусов. *Ветеринария сегодня.* 2017; 3:52–7.

7. Seif I., Coulon P., Rollin P.E., Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 1985; 53(3):926–34. DOI: 10.1128/JVI.53.3.926-934.1985.

8. Prehaud C., Coulon P., LaFay F., Thiers C., Flamand A. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol.* 1988; 62(1):1–7. DOI: 10.1128/JVI.62.1.1-7.1988.

9. Hicks D.J., Fooks A.R., Johnson N. Development in rabies vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 169(3):199–204. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x.

10. Abedi M., Haftcheshmeh S.M., Bashar R., Kesharwani P., Samadi M., Sahebkar A. Rabies vaccine: Recent update and comprehensive review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Process Biochem.* 2023; 124:201–20. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.11.011.

11. Смолоногина Т.А., Исакова-Сивак И.Н., Котомина Т.С., Евсина А.С., Степанова Е.А., Прокопенко П.И., Леонтьева Г.Ф., Суворов А.Н., Руденко Л.Г. Конструирование векторной вакцины на основе холодо-адаптированного вируса гриппа для защиты от бактериальной инфекции, вызываемой стрептококками группы В. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2019; 37(1):25–34. DOI: 10.17116/molgen20193701125.

12. Буданова А.А., Шуковская Т.Н. Исследования *in silico* на этапах конструирования современных средств иммунопрофилактики чумы (на примере субъединичных вакцин). *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 3:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13.

13. 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, Asfvirus, Asfarviridae*). *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2):103–12. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-103-112.

14. Дятлова В.И. Применение методов обратной вакцинологии для разработки вакцин против бруцеллеза. *Бактериология.* 2021; 6(4):16–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29.

15. Bayat A. Science, medicine and the future: Bioinformatics. *BMJ*. 2002; 324(7344):1018–22. DOI: 10.1136/bmj.324.7344.1018.
16. Nandy A., Basak S.C. Bioinformatics in design of antiviral vaccines. In: Encyclopedia of Biomedical Engineering. 2018; 1-3:280–90. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.10878-5.
17. Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Bauduin B., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Afiademanyo K. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature*. 1991; 354(6354):520–2. DOI: 10.1038/354520a0.
18. Pastoret P.P., Brochier B. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol. Infect.* 1996; 116(3):235–40. DOI: 10.1017/s0950268800052535.
19. Drings A., Jallet C., Chambert B., Tordo N., Perrin P. Is there an advantage for including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine*. 1999; 17(11-12):1549–57. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00357-0.
20. Lodmell D.L., Sumner J.W., Esposito J.J., Bellini W.J., Ewalt L.C. Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protects mice against lethal rabies virus infection. *J. Virol.* 1991; 65(6):3400–5. DOI: 10.1128/JVI.65.6.3400-3405.1991.
21. Ertl H.C.J. New rabies vaccines for use in humans. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(2):54. DOI: 10.3390/vaccines7020054.
22. Niu Y., Liu Y., Yang L., Qu H., Zhao J., Hu R., Li J., Liu W. Immunogenicity of multi-epitope-based vaccine candidates administered with adjuvant Gp96 against rabies. *Virol. Sin.* 2016; 31(2):168–75. DOI: 10.1007/s12250-016-3734-4.
23. Odhar H.A., Hashim A.F., Humadi S.S., Ahjel S.W. Design and construction of multi epitope-peptide vaccine candidate for rabies virus. *Bioinformation*. 2023; 19(2):167–77. DOI: 10.6026/97320630019167.
24. Shi C., Sun P., Yang P., Liu L., Tian L., Liu W., Wang M., Zheng X., Zheng W. Research progress on neutralizing epitopes and antibodies for the Rabies virus. *Infectious Medicine*. 2022; 1(4):262–71. DOI: 10.1016/j.imj.2022.09.003.
25. Goto H., Minamoto N., Ito H., Ito N., Sugiyama M., Kinjo T., Kawai A. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 1):119–27. DOI: 10.1099/0022-1317-81-1-119.
11. Smolonogina T.A., Isakova-Sivak I.N., Kotomina T.S., Evsina A.S., Stepanova E.A., Prokopenko P.I., Leontieva G.F., Suvorov A.N., Rudenko L.G. [Generation of a vector vaccine against group B streptococcal infection on the base of a cold-adapted influenza A virus]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(1):25–34. DOI: 10.17116/molgen2019370112512.
12. Budanova A.A., Shchukovskaya T.N. [In silico research at the stages of designing modern means for prevention of plague (by the example of subunit vaccines)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (3):6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13.
13. 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, *Asfivirus, Asfarviridae*)]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2020; 65(2):103–12. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-103-112.
14. Dyatlova V.I. [Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2021; 6(4):16–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29.
15. Bayat A. Science, medicine and the future: Bioinformatics. *BMJ*. 2002; 324(7344):1018–22. DOI: 10.1136/bmj.324.7344.1018.
16. Nandy A., Basak S.C. Bioinformatics in design of antiviral vaccines. In: Encyclopedia of Biomedical Engineering. 2018; 1-3:280–90. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.10878-5.
17. Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Bauduin B., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Afiademanyo K. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature*. 1991; 354(6354):520–2. DOI: 10.1038/354520a0.
18. Pastoret P.P., Brochier B. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol. Infect.* 1996; 116(3):235–40. DOI: 10.1017/s0950268800052535.
19. Drings A., Jallet C., Chambert B., Tordo N., Perrin P. Is there an advantage for including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine*. 1999; 17(11-12):1549–57. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00357-0.
20. Lodmell D.L., Sumner J.W., Esposito J.J., Bellini W.J., Ewalt L.C. Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protects mice against lethal rabies virus infection. *J. Virol.* 1991; 65(6):3400–5. DOI: 10.1128/JVI.65.6.3400-3405.1991.
21. Ertl H.C.J. New rabies vaccines for use in humans. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(2):54. DOI: 10.3390/vaccines7020054.
22. Niu Y., Liu Y., Yang L., Qu H., Zhao J., Hu R., Li J., Liu W. Immunogenicity of multi-epitope-based vaccine candidates administered with adjuvant Gp96 against rabies. *Virol. Sin.* 2016; 31(2):168–75. DOI: 10.1007/s12250-016-3734-4.
23. Odhar H.A., Hashim A.F., Humadi S.S., Ahjel S.W. Design and construction of multi epitope-peptide vaccine candidate for rabies virus. *Bioinformation*. 2023; 19(2):167–77. DOI: 10.6026/97320630019167.
24. Shi C., Sun P., Yang P., Liu L., Tian L., Liu W., Wang M., Zheng X., Zheng W. Research progress on neutralizing epitopes and antibodies for the Rabies virus. *Infectious Medicine*. 2022; 1(4):262–71. DOI: 10.1016/j.imj.2022.09.003.
25. Goto H., Minamoto N., Ito H., Ito N., Sugiyama M., Kinjo T., Kawai A. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 1):119–27. DOI: 10.1099/0022-1317-81-1-119.

References

1. Taylor L.H., Hampson K., Fahrion A., Abela-Ridder B., Nel L.H. Difficulties in estimating the human burden of canine rabies. *Acta Trop.* 2017; 165:133–40. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.12.007.
2. Hampson K., Coudeville L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Atlan M., Barrat J., Blanton J.D., Briggs D.J., Cleaveland S., Costa P., Freuling C.M., Hiby E., Knopf L., Leanes F., Meslin F.-X., Metlin A., Miranda M.E., Müller T., Nel L.H., Recuenco S., Rupprecht C.E., Schumacher C., Taylor L., Vigilato M.A.N., Zinsstag J., Dushoff J. Global alliance for rabies control partners for rabies prevention. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4):e0003709. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003709.
3. Ghai S., Hemachudha T. Continued failure of rabies elimination—Consideration of challenges in applying the one health approach. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9:847659. DOI: 10.3389/fvets.2022.847659.
4. Kessels J., Tarantola A., Salahuddin N., Blumberg L., Knopf L. Rabies post-exposure prophylaxis: A systematic review on abridged vaccination schedules and the effect of changing administration routes during a single course. *Vaccine*. 2019; 37 Suppl 1:A107–A117. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.01.041.
5. Elakov A.L. [Anti-rabies vaccines applied in the Russian Federation and perspectives for their improvement]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2022; 67(2):107–14. DOI: 10.36233/0507-4088-102.
6. Metlin A.E. [Modern aspects of Lyssavirus classification]. *Veterinariya Segodnya [Veterinary Science Today]*. 2017; (3):52–7.
7. Seif I., Coulon P., Rollin P.E., Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 1985; 53(3):926–34. DOI: 10.1128/JVI.53.3.926-934.1985.
8. Prehaud C., Coulon P., LaFay F., Thiers C., Flamand A. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol.* 1988; 62(1):1–7. DOI: 10.1128/JVI.62.1.1-7.1988.
9. Hicks D.J., Fooks A.R., Johnson N. Development in rabies vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 169(3):199–204. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x.
10. Abedi M., Haftcheshmeh S.M., Bashar R., Kesharwani P., Samadi M., Sahebkar A. Rabies vaccine: Recent update and comprehensive review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Process Biochem.* 2023; 124:201–20. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.11.011.

Authors:

Galeeva A.G., Khammatov N.I. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety. Nauchny Gorodok-2, Kazan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

Efimova M.A. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; Nauchny Gorodok-2, Kazan, 420075, Russian Federation; e-mail: vnivi@mail.ru. Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman; 35, Sibirsky Trakt St., Kazan, 420029, Russian Federation; e-mail: kgavm_baumana@mail.ru.

Об авторах:

Галеева А.Г., Хамматов Н.И. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

Ефимова М.А. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075, Казань, Научный городок-2; e-mail: vnivi@mail.ru. Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана; Российская Федерация, 420029, Казань, ул. Сибирский Тракт, 35; e-mail: kgavm_baumana@mail.ru.