

## Supplementary information

### Genome-wide analysis of evolutionary markers of human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses may guide selection of vaccine strain candidates

Sergei S. Belanov<sup>1</sup>, Dmitrii Bychkov<sup>1</sup>, Christian Benner<sup>1</sup>, Samuli Ripatti<sup>1,2,3</sup>, Teija Ojala<sup>4</sup>, Matti Kankainen<sup>1</sup>, Hong Kai Lee<sup>5</sup>, Julian Wei-Tze Tang<sup>6</sup>, Denis E. Kainov<sup>1</sup>

The supplementary file includes: **Table S1, Table S2, Table S3, Table S4, Table S5, Figure S1, References.**

**Table S1.** Influenza A virus proteins, protein data bank IDs (PDB ID), and references.

Influenza protein	PDB ID	Reference
HA (H1)	3LZG	(Xu et al. 2010)
HA (H3)	4FNK	(Ekiert et al. 2012)
NA (N1)	4B7N	(van der Vries et al. 2012)
NA (N2)	1IVG	(Jedrzejewski et al. 1995)
M2	2LY0	(Wang et al. 2013)
M1	3MD2	n.a.
Pol	4WSB	(Reich et al. 2014)
NP	4IRY	(Ye et al. 2012)
NS1	3F5T	(Bornholdt and Prasad 2008)
PB2:m(7)GTP	4CB6	(Pautus et al. 2013)
HA:CR8020	3SDY	(Ekiert et al. 2011)
HA:39.29	3ZTJ	(Corti et al. 2011)
HA:CR6261	3GBN	(Ekiert et al. 2009)
HA:F10	3FKU	(Sui et al. 2009)
HA:HC45	1QFU	(Fleury et al. 1999)
HA:HC19	2VIR	(Fleury et al. 1998)
HA:HC63	1KEN	(Barbey-Martin et al. 2002)
HA:2D1	3LZG	(Xu et al. 2010)
HA:FI6V3	3ZTN	(Corti et al. 2011)
HA:S139/1	4GMS	(Lee et al. 2012)
HA:CH65	3SM5	(Whittle et al. 2011)
HA:F-HB80.4	4EEF	(Whitehead et al. 2012)
HA:HB36.3	3R2X	(Fleishman et al. 2011)
HA:C05	4FP8	(Ekiert et al. 2012)
HA:F045-92	4O58	(Lee et al. 2014)
HA:FLD194	5A3I	(Xiong et al. 2015)
HA:C179	5C0R	(Yassine et al. 2015)
NA:Mem5	2AEP	(Venkatramani et al. 2006)
NA:CD6	4QNP	(Wan et al. 2015)
NA:NC41	1NMB	(Malby et al. 1994)

n.a. – not available.

**Table S2.** Frequencies of selected mutations in A(H1N1)pdm09 strains are shown (in HA-gene numbers of residues are shown without 16 amino acids of signal peptide). The evolutionary markers were subdivided into drivers and passengers based on their time of appearance.

<b>Viral protein</b>	<b>Mutation site</b>	<b>R</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>2009/ 2010</b>	<b>2010/ 2011</b>	<b>2011/ 2012</b>	<b>2012/ 2013</b>	<b>2013/ 2014</b>	<b>2014/ 2015</b>	<b>ΔF</b>	<b>Drivers</b>
HA	98	D	N*		0,04	0,31	0,25	0,85	0,99	1,00	0,96	group 4 driver
HA	164	K	Q*		0,00	0,00	0,00	0,12	0,98	0,99	0,99	group 7 driver
HA	186	S	T		0,00	0,63	0,88	0,97	0,99	1,00	1,00	--
HA	235	V	I		0,01	0,00	0,00	0,59	0,01	0,00	0,59	--
HA	257	A	T*		0,00	0,00	0,00	0,12	0,96	0,99	0,99	group 7 passenger
HA	284	K	E*		0,01	0,02	0,02	0,95	0,99	0,97	0,98	--
HA	322	I	V		0,96	0,99	0,99	0,96	0,82	1,00	0,18	--
HA	375	E	K*		0,54	0,84	0,99	0,99	1,00	0,99	0,46	--
HA	452	S	N		0,03	0,29	0,88	0,98	1,00	0,99	0,97	--
HA	475	T	M*		0,00	0,00	0,01	0,01	0,13	0,00	0,13	--
HA	500	E	K*		0,01	0,13	0,10	0,83	0,99	1,00	0,99	group 4 passenger
NA	34	I	V		0,00	0,00	0,00	0,05	0,88	0,96	0,96	group 8 passenger
NA	44	N	S		0,00	0,30	0,65	0,86	0,99	1,00	1,00	--
NA	82	S	P*		0,02	0,02	0,00	0,01	0,47	0,06	0,47	--
NA	106	V	I		0,88	0,99	0,93	0,14	0,00	0,00	0,99	--
NA	200	N	S		0,00	0,00	0,05	0,82	0,98	1,00	1,00	group 5 passenger
NA	241	V	I		0,12	0,68	0,98	0,98	1,00	1,00	0,88	--
NA	321	I	V		0,11	0,00	0,01	0,12	0,90	1,00	1,00	--
NA	369	N	K*		0,11	0,69	0,98	0,97	1,00	1,00	0,89	--
NA	386	N	K*		0,01	0,01	0,00	0,01	0,38	0,91	0,91	--
NA	432	K	E*		0,00	0,00	0,00	0,05	0,88	0,99	0,99	group 8 driver
NA	449	N	K*		0,00	0,00	0,00	0,01	0,18	0,00	0,18	--

<b>M1</b>	80	V	I	0,00	0,55	0,84	0,91	1,00	0,99	0,99	--
<b>M1</b>	192	M	V	0,00	0,00	0,00	0,76	0,99	1,00	1,00	--
<b>M1</b>	230	K	R	0,00	0,00	0,07	0,87	1,00	1,00	1,00	group 5 passenger
<b>M2</b>	12	R	K	0,00	0,01	0,00	0,03	0,55	0,00	0,55	--
<b>M2</b>	21	D	G*	0,00	0,01	0,10	0,89	0,99	0,40	0,99	group 5 passenger
<b>M2</b>	21	D	V*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,58	0,58	--
<b>NS1</b>	55	E	K*	0,00	0,01	0,00	0,04	0,74	0,92	0,92	group 9 driver
<b>NS1</b>	90	L	I	0,00	0,15	0,46	0,87	1,00	1,00	1,00	group 2 passenger
<b>NS1</b>	131	K	E*	0,00	0,00	0,07	0,05	0,76	0,92	0,92	--
<b>NS2</b>	29	N	S	0,00	0,00	0,00	0,04	0,73	0,84	0,84	group 9 passenger
<b>NS2</b>	48	T	A*	0,01	0,08	0,19	0,83	0,94	1,00	0,99	group 3 driver
<b>NS2</b>	89	A	V	0,00	0,00	0,00	0,12	0,50	0,01	0,50	--
<b>NP</b>	373	T	A*	0,03	0,00	0,01	0,02	0,68	0,00	0,68	group 6 passenger
<b>NP</b>	425	V	I	0,04	0,04	0,00	0,02	0,64	0,55	0,64	group 6 driver
<b>NP</b>	498	S	N	0,03	0,01	0,08	0,90	0,97	1,00	0,99	group 5 passenger
<b>PA</b>	100	V	I	0,01	0,00	0,07	0,05	0,90	0,98	0,98	--
<b>PA</b>	321	N	K*	0,04	0,60	0,76	0,97	0,99	1,00	0,96	group 1 driver
<b>PA</b>	330	I	V	0,00	0,21	0,27	0,06	0,92	0,94	0,94	--
<b>PA</b>	343	A	T*	0,76	0,83	0,57	0,91	0,08	0,01	0,90	--
<b>PA</b>	361	K	R	0,00	0,00	0,00	0,04	0,89	0,98	0,98	group 8 passenger
<b>PA</b>	441	M	K*	0,00	0,00	0,00	0,09	0,01	0,00	0,09	--
<b>PA</b>	459	I	T	0,00	0,00	0,00	0,02	0,68	0,00	0,68	--
<b>PA</b>	615	K	R	0,01	0,00	0,00	0,02	0,55	0,00	0,55	--

<b>PA-X</b>	100	V	I	0,03	0,00	0,08	0,06	0,93	na	0,93	--
<b>PA-X</b>	221	R	Q*	0,01	0,65	0,76	0,96	1,00	na	0,99	group 1 passenger
<b>PA-X</b>	229	L	S*	0,00	0,16	0,27	0,07	0,94	na	0,94	--
<b>PB1</b>	154	G	D*	0,01	0,04	0,25	0,93	0,97	1,00	0,99	--
<b>PB1</b>	397	I	M	0,01	0,15	0,47	0,91	0,99	0,91	0,98	group 2 driver
<b>PB1</b>	375	S	N	0,04	0,01	0,00	0,02	0,68	0,06	0,68	group 6 passenger
<b>PB1</b>	435	I	T*	0,10	0,27	0,68	0,96	1,00	1,00	0,90	--
<b>PB1</b>	646	M	I	0,00	0,00	0,00	0,01	0,62	0,00	0,62	--
<b>PB2</b>	54	R	K	0,01	0,02	0,08	0,92	0,97	0,99	0,98	group 5 passenger
<b>PB2</b>	66	M	I	0,01	0,00	0,05	0,95	1,00	0,99	0,99	group 5 driver
<b>PB2</b>	195	D	N*	0,00	0,03	0,19	0,97	1,00	0,99	0,99	group 3 passenger
<b>PB2</b>	293	R	K	0,00	0,05	0,17	0,96	1,00	0,99	0,99	group 3 passenger
<b>PB2</b>	344	V	M	0,01	0,62	0,75	0,97	1,00	1,00	0,99	group 1 passenger
<b>PB2</b>	354	I	L	0,00	0,62	0,75	0,98	1,00	1,00	1,00	group 1 passenger
<b>PB2</b>	389	R	K	0,00	0,00	0,00	0,02	0,68	0,00	0,68	--
<b>PB2</b>	731	V	I	0,01	0,03	0,17	0,94	0,99	0,98	0,98	group 3 passenger

na - not available; R- amino acid in reference reference sequence; A1 – amino acid in analysed sequences; A2 – another amino acid in analysed sequences;  $\Delta F$  – difference between minimal and maximal frequencies of amino acid change during 5 years period; \* - possibly radical amino acid change.

**Table S3.** Frequencies of selected mutations in A(H3N2) strains (in HA-gene numbers of residues are shown without 16 amino acids of signal peptide). The evolutionary markers were subdivided into drivers and passengers based on their time of appearance.

<b>Viral protein</b>	<b>Mutation site</b>	<b>R</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>2009/2010</b>	<b>2010/2011</b>	<b>2011/2012</b>	<b>2012/2013</b>	<b>2013/2014</b>	<b>2014/2015</b>	<b><math>\Delta F</math></b>	<b>Drivers</b>
<b>HA</b>	3	L	I		0,08	0,01	0,04	0,06	0,21	0,68	0,67	--
<b>HA</b>	33	Q	R*		0,00	0,00	0,18	0,74	0,97	0,99	0,99	group 4 passenger

HA	45	S	N	0,02	0,07	0,26	0,84	1,00	1,00	0,98	group 5 driver
HA	48	T	I*	0,00	0,02	0,24	0,85	1,00	0,99	0,99	group 5 passenger
HA	53	D	N*	0,06	0,39	0,33	0,14	0,06	0,02	0,37	group 3 driver
HA	62	E	K*	0,48	0,05	0,02	0,00	0,01	0,14	0,48	--
HA	94	Y	H*	0,02	0,39	0,31	0,14	0,06	0,03	0,37	group 3 passenger
HA	122	N	D*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,14	0,14	--
HA	128	T	A*	0,00	0,00	0,00	0,36	0,69	0,33	0,69	--
HA	138	A	S*	0,00	0,01	0,00	0,01	0,11	0,10	0,11	--
HA	142	R	G*	0,00	0,04	0,09	0,38	0,69	0,33	0,38	--
HA	144	N	K*	0,41	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,41	--
HA	144	N	S	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,70	0,70	group 9 driver
HA	145	N	S	0,00	0,04	0,49	0,81	1,00	1,00	1,00	group 6 passenger
HA	157	L	S*	0,01	0,00	0,00	0,03	0,13	0,18	0,18	--
HA	159	F	Y*	0,00	0,00	0,02	0,00	0,16	0,70	0,70	group 7 driver
HA	160	K	T*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,69	0,69	group 7 passenger
HA	198	A	S*	0,00	0,74	0,64	0,83	1,00	0,99	1,00	--
HA	223	V	I	0,01	0,09	0,63	0,86	1,00	1,00	1,00	group 6 driver
HA	225	N	D*	0,01	0,03	0,03	0,02	0,31	0,79	0,79	--
HA	278	N	K*	0,00	0,01	0,19	0,81	0,99	1,00	1,00	group 4 passenger
HA	311	Q	H*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,65	0,65	group 9 passenger
HA	312	N	S	0,24	0,27	0,63	0,83	0,99	1,00	0,76	--
HA	347	V	M	0,00	0,11	0,02	0,16	0,24	0,04	0,24	--
HA	347	V	K*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,16	0,16	--

<b>HA</b>	487	D	N*	0,00	0,07	0,41	0,03	0,00	0,00	0,41	--
<b>HA</b>	489	D	N*	0,19	0,04	0,02	0,23	0,31	0,66	0,64	--
<b>NA</b>	81	L	P*	0,00	0,00	0,67	0,95	0,99	1,00	1,00	--
<b>NA</b>	93	D	G*	0,00	0,02	0,18	0,83	0,99	0,99	0,99	group 4 driver
<b>NA</b>	221	E	D	0,00	0,00	0,03	0,04	0,50	0,93	0,93	--
<b>NA</b>	267	T	K*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,69	0,69	group 8 driver
<b>NA</b>	380	I	V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	0,65	--
<b>NA</b>	392	I	T*	0,00	0,00	0,01	0,00	0,31	0,13	0,31	--
<b>M2</b>	54	L	V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,06	0,17	--
<b>NP</b>	217	S	G	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01	0,10	0,10	--
<b>NP</b>	421	E	D*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,16	0,16	group 10 driver
<b>NS1</b>	26	E	K*	0,06	0,14	0,31	0,87	0,97	1,00	0,94	--
<b>NS1</b>	124	M	I	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,11	0,11	--
<b>NS1</b>	129	M	T*	0,05	0,53	0,49	0,14	0,00	0,00	0,53	group 2 driver
<b>NS1</b>	135	S	N	0,49	0,42	0,45	0,92	0,99	1,00	0,58	group 1 passenger
<b>NS1</b>	139	D	G*	0,48	0,42	0,45	0,92	0,99	0,99	0,57	group 1 passenger
<b>NS1</b>	229	K	E*	0,00	0,00	0,09	0,89	1,00	1,00	1,00	group 5 passenger
<b>NS2</b>	27	D	G*	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05	0,18	0,18	--
<b>NS2</b>	88	K	R	0,49	0,42	0,44	0,85	0,99	1,00	0,58	group 1 passenger
<b>NS2</b>	92	N	S	0,04	0,51	0,49	0,13	0,03	0,00	0,51	group 2 passenger
<b>PA</b>	256	Q	K*	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,10	0,10	--
<b>PA</b>	272	N	S	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,69	0,69	group 8 driver
<b>PA</b>	308	I	V	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,11	0,11	--
<b>PA</b>	396	D	E*	0,97	0,99	0,95	0,98	0,99	0,84	0,15	--

<b>PA</b>	407	I	M	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,11	0,11	--
<b>PA</b>	409	N	S	0,40	0,22	0,43	0,84	0,99	1,00	0,78	--
<b>PA</b>	554	I	V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,11	0,11	--
<b>PA</b>	605	K	R	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,11	0,11	--
<b>PA</b>	668	V	I	0,00	0,00	0,05	0,12	0,13	0,39	0,39	--
<b>PA</b>	669	V	I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,11	0,11	--
<b>PA</b>	675	N	K*	0,00	0,00	0,00	0,12	0,12	0,61	0,61	--
<b>PB1</b>	331	E	D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,14	0,14	group 10 passenger
<b>PB1</b>	587	A	T*	0,50	0,45	0,44	0,94	0,99	0,98	0,55	group 1 passenger
<b>PB1</b>	745	K	R	0,43	0,77	0,52	0,15	0,00	0,00	0,77	--
<b>PB2</b>	63	I	V	0,47	0,42	0,43	0,85	0,97	0,34	0,63	group 1 driver
<b>PB2</b>	81	M	I	0,04	0,52	0,53	0,13	0,01	0,00	0,53	group 2 passenger
<b>PB2</b>	221	A	S*	0,06	0,53	0,54	0,13	0,01	0,00	0,54	group 2 driver
<b>PB2</b>	293	R	K	0,06	0,53	0,55	0,13	0,00	0,00	0,55	group 2 passenger
<b>PB2</b>	353	K	R	0,94	0,44	0,40	0,88	0,99	1,00	0,60	--
<b>PB2</b>	461	I	V	0,48	0,42	0,44	0,85	1,00	1,00	0,58	group 1 passenger
<b>PB2</b>	560	V	I	0,07	0,56	0,55	0,14	0,00	0,00	0,56	group 2 passenger
<b>PB2</b>	588	I	T*	0,00	0,00	0,03	0,06	0,07	0,35	0,35	--
<b>PB2</b>	613	T	A*	0,00	0,11	0,39	0,80	0,39	1,00	1,00	--

na - not available; R- amino acid in reference sequence; A1 – amino acid in analysed sequences; A2 – another amino acid in analysed sequences;  $\Delta F$  – difference between minimal and maximal frequencies of amino acid change during 5 years period; \* - possibly radical amino acid change.

**Table S4.** The prevalence of evolutionary markers in A(H1N1)pdm09 vaccine strain candidates recommended by WHO for previous influenza seasons (in HA-gene numbers of residues are shown without 16 amino acids of signal peptide).

<b>2010/2011</b>			
<b>Vir al prot ein*</b>	<b>Mut atio n site</b>	<b>R</b>	<b>A1 (A/Californi a/07/2009 )</b>
<b>HA</b>	186	T	S

<b>HA</b>	322	V	I
<b>HA</b>	375	K	E
<b>NA</b>	106	I	V
<b>NA</b>	241	I	V
<b>NA</b>	369	K	N
<b>M1</b>	80	I	V
<b>PA</b>	321	K	N
<b>PA</b>	343	T	A
<b>PB2</b>	344	M	V
<b>PB2</b>	354	L	I
<b>Matches (total)</b>			<b>0(11)</b>

**2011/2012**

<b>Vir al prot ein*</b>	<b>Mut atio n site</b>	<b>R</b>	<b>A1 (A/Californi a/07/2009 )</b>
<b>HA</b>	186	T	S
<b>HA</b>	322	V	I
<b>HA</b>	375	K	E
<b>HA</b>	452	N	S
<b>NA</b>	44	S	N
<b>NA</b>	106	I	V
<b>NA</b>	241	I	V
<b>NA</b>	369	K	N
<b>M1</b>	80	I	V
<b>PA</b>	321	K	N
<b>PA</b>	343	T	A
<b>PB1</b>	435	T	I
<b>PB2</b>	344	M	V
<b>PB2</b>	354	L	I
<b>Matches (total)</b>			<b>0(14)</b>

**2012/2013**

<b>Vir al prot ein*</b>	<b>Mut atio n site</b>	<b>R</b>	<b>A1 (A/Californi a/07/2009)</b>	<b>A2 (A/Christchu rch/16/2010)</b>	<b>A3 (A/Brisban e/10/2010)</b>	<b>A4 (A/Californ ia/04/2009)</b>	<b>A5 (A/Texas/ 05/2009)</b>	<b>A6 (A/England /195/2009)</b>	<b>A7 (A/New York/1 8/2009)</b>
<b>HA</b>	93	N	D	D	D	D	D	D	D
<b>HA</b>	186	T	S	S	S	S	S	S	S
<b>HA</b>	235	I	V	V	V	V	V	V	V
<b>HA</b>	284	E	K	K	K	K	K	K	K
<b>HA</b>	322	V	I	V	V	I	V	V	V
<b>HA</b>	375	K	E	K	K	E	E	E	E
<b>HA</b>	452	N	S	S	S	S	S	S	S
<b>HA</b>	500	K	E	E	E	E	E	E	E
<b>NA</b>	44	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	200	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	241	I	V	V	V	V	V	V	V
<b>NA</b>	369	K	N	N	N	N	N	N	N
<b>M1</b>	80	I	V	V	V	V	V	V	V
<b>M1</b>	192	V	M	M	M	M	M	M	M
<b>M1</b>	230	R	K	K	K	K	K	K	K
<b>M2</b>	21	G	D	D	D	D	D	D	D



<b>NS1</b>	90	I	L	na	na	L	L	L	L
<b>NS2</b>	48	A	T	na	na	T	T	T	T
<b>NP</b>	498	N	S	na	na	S	S	S	S
<b>PA</b>	321	K	N	na	na	N	N	N	N
<b>PA</b>	343	T	A	na	na	A	A	A	A
<b>PB1</b>	154	D	G	na	na	G	G	G	G
<b>PB1</b>	397	M	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB1</b>	435	T	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB2</b>	54	K	R	na	na	R	R	R	R
<b>PB2</b>	66	I	M	na	na	M	M	M	M
<b>PB2</b>	195	N	D	na	na	D	D	D	D
<b>PB2</b>	293	K	R	na	na	R	R	R	R
<b>PB2</b>	344	M	V	na	na	V	V	V	V
<b>PB2</b>	354	L	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB2</b>	731	I	V	na	na	V	V	V	V
<b>Total matches</b>			<b>0(31)</b>	<b>≥2(31)</b>	<b>≥2(31)</b>	<b>0(31)</b>	<b>1(31)</b>	<b>1(31)</b>	<b>1(31)</b>

### 2013/2014

Vir al prot ein*	Mut atio n site	R	A1 (A/Californi a/07/2009)	A2 (A/Christchu rch/16/2010)	A3 (A/Brisban e/10/2010)	A4 (A/Californ ia/04/2009)	A5 (A/Texas/ 05/2009)	A6 (A/England /195/2009)	A7 (A/New York/1 8/2009)
<b>HA</b>	93	N	D	D	D	D	D	D	D
<b>HA</b>	186	Q	K	K	K	K	K	K	K
<b>HA</b>	235	T	S	S	S	S	S	S	S
<b>HA</b>	257	T	A	A	A	T	T	T	T
<b>HA</b>	284	E	K	K	K	K	K	K	K
<b>HA</b>	322	V	I	V	V	I	V	V	V
<b>HA</b>	375	K	E	K	K	E	E	E	E
<b>HA</b>	452	N	S	S	S	S	S	S	S
<b>HA</b>	500	K	E	E	E	E	E	E	E
<b>NA</b>	34	V	I	I	I	I	I	I	I
<b>NA</b>	44	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	82	P	S	S	S	S	S	S	S
<b>NA</b>	200	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	241	I	V	V	V	V	V	V	V
<b>NA</b>	321	V	I	I	I	I	I	I	I
<b>NA</b>	369	K	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	432	E	K	K	K	K	K	K	K
<b>M1</b>	80	I	V	V	V	V	V	V	V
<b>M1</b>	192	V	M	M	M	M	M	M	M
<b>M1</b>	230	R	R	K	K	K	K	K	K
<b>M2</b>	12	K	R	R	R	R	R	R	R
<b>M2</b>	21	G	D	D	D	D	D	D	D
<b>NS1</b>	55	K	E	na	na	E	E	E	E
<b>NS1</b>	90	I	L	na	na	L	L	L	L
<b>NS1</b>	131	E	K	na	na	K	K	K	K
<b>NS2</b>	29	S	N	na	na	N	N	N	N
<b>NS2</b>	48	A	T	na	na	T	T	T	T
<b>NS2</b>	89	V	A	na	na	A	A	A	A
<b>NP</b>	373	A	T	na	na	T	T	T	T
<b>NP</b>	425	I	V	na	na	V	V	V	V
<b>NP</b>	498	N	S	na	na	S	S	S	S
<b>PA</b>	100	I	V	na	na	V	V	V	V

<b>PA</b>	321	K	N	na	na	N	N	N	N
<b>PA</b>	330	V	I	na	na	I	I	I	I
<b>PA</b>	361	R	K	na	na	K	K	K	K
<b>PA</b>	459	T	I	na	na	I	I	I	I
<b>PA</b>	615	R	K	na	na	K	K	K	K
<b>PB1</b>	154	D	G	na	na	G	G	G	G
<b>PB1</b>	397	M	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB1</b>	375	N	S	na	na	S	S	S	S
<b>PB1</b>	435	T	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB1</b>	646	I	M	na	na	M	M	M	M
<b>PB2</b>	54	K	R	na	na	R	R	R	R
<b>PB2</b>	66	I	M	na	na	M	M	M	M
<b>PB2</b>	195	N	D	na	na	D	D	D	D
<b>PB2</b>	293	K	R	na	na	R	R	R	R
<b>PB2</b>	344	M	V	na	na	V	V	V	V
<b>PB2</b>	354	L	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB2</b>	389	K	R	na	na	R	R	R	R
<b>PB2</b>	731	I	V	na	na	V	V	V	V
<b>Matches (total)</b>			<b>0(50)</b>	<b>≥2(50)</b>	<b>≥2(50)</b>	<b>0(50)</b>	<b>1(50)</b>	<b>1(50)</b>	<b>1(50)</b>

#### 2014/2015

<b>Vir al prot ein*</b>	<b>Mut atio n site</b>	<b>R</b>	<b>A1 (A/Californi a/07/2009)</b>	<b>A2 (A/Christchu rch/16/2010)</b>	<b>A3 (A/Brisban e/10/2010)</b>	<b>A4 (A/Californ ia/04/2009)</b>	<b>A5 (A/Texas/ 05/2009)</b>	<b>A6 (A/England /195/2009)</b>	<b>A7 (A/New York/1 8/2009)</b>
<b>HA</b>	93	N	D	D	D	D	D	D	D
<b>HA</b>	186	Q	K	K	K	K	K	K	K
<b>HA</b>	235	T	S	S	S	T	T	T	T
<b>HA</b>	257	T	A	A	A	A	A	A	A
<b>HA</b>	284	E	E	E	E	K	K	K	K
<b>HA</b>	322	V	I	V	V	I	V	V	V
<b>HA</b>	375	K	E	K	K	E	E	E	E
<b>HA</b>	452	N	S	S	S	S	S	S	S
<b>HA</b>	500	K	E	E	E	E	E	E	E
<b>NA</b>	34	V	I	I	I	I	I	I	I
<b>NA</b>	44	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	200	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	241	I	V	V	V	V	V	V	V
<b>NA</b>	321	V	I	I	I	I	I	I	I
<b>NA</b>	369	K	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	386	K	N	N	N	N	N	N	N
<b>NA</b>	432	E	K	K	K	K	K	K	K
<b>M1</b>	80	I	V	V	V	V	V	V	V
<b>M1</b>	192	V	M	M	M	M	M	M	M
<b>M1</b>	230	R	R	K	K	K	K	K	K
<b>M2</b>	21	V	D	G	D	D	D	D	D
<b>NS1</b>	55	K	E	na	na	E	E	E	E
<b>NS1</b>	90	I	L	na	na	L	L	L	L
<b>NS1</b>	131	E	K	na	na	K	K	K	K
<b>NS2</b>	29	S	N	na	na	N	N	N	N
<b>NS2</b>	48	A	T	na	na	T	T	T	T
<b>NP</b>	425	I	V	na	na	V	V	V	V
<b>NP</b>	498	N	S	na	na	S	S	S	S
<b>PA</b>	100	I	V	na	na	V	V	V	V

<b>PA</b>	321	K	N	na	na	N	N	N	N
<b>PA</b>	330	V	I	na	na	I	I	I	I
<b>PA</b>	361	R	K	na	na	K	K	K	K
<b>PB1</b>	154	D	G	na	na	G	G	G	G
<b>PB1</b>	397	M	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB1</b>	435	T	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB2</b>	54	K	R	na	na	R	R	R	R
<b>PB2</b>	66	I	M	na	na	M	M	M	M
<b>PB2</b>	195	N	D	na	na	D	D	D	D
<b>PB2</b>	293	K	R	na	na	R	R	R	R
<b>PB2</b>	344	M	V	na	na	V	V	V	V
<b>PB2</b>	354	L	I	na	na	I	I	I	I
<b>PB2</b>	731	I	V	na	na	V	V	V	V
<b>Matches (total)</b>			<b>0(42)</b>	<b>≥2(42)</b>	<b>≥2(42)</b>	<b>0(42)</b>	<b>1(42)</b>	<b>1(42)</b>	<b>1(42)</b>

na - not available; R- amino acid in reference reference sequence; A1-7 – amino acid in corresponding vaccine strains. PA-X was excluded from the analysis.

**Table S5.** The prevalence of evolutionary markers in A(H3N2) vaccine strain candidates recommended by WHO for previous influenza seasons (in HA-gene numbers of residues are shown without 16 amino acids of signal peptide).

**2010/2011**

<b>Viral protein*</b>	<b>Mutation site</b>	<b>R</b>	<b>A1 (A/Perth/16/2009)</b>	<b>A2 (A/Wisconsin/15/2009)</b>
<b>HA</b>	198	S	A	A
<b>NS1</b>	129	T	M	M
<b>NS2</b>	92	S	S	na
<b>PA</b>	396	E	D	na
<b>PB1</b>	745	R	K	na
<b>PB2</b>	81	I	M	na
<b>PB2</b>	221	S	A	na
<b>PB2</b>	293	K	R	na
<b>PB2</b>	560	I	V	na
<b>Matches (total)</b>			<b>1(9)</b>	<b>≥0(9)</b>

**2011/2012**

<b>Viral protein*</b>	<b>Mutation site</b>	<b>R</b>	<b>A1 (A/Perth/16/2009)</b>
<b>HA</b>	198	S	A
<b>HA</b>	223	I	V
<b>HA</b>	312	S	N
<b>NA</b>	81	P	L
<b>PA</b>	396	E	D
<b>PB1</b>	745	R	K
<b>PB2</b>	81	I	M
<b>PB2</b>	221	S	A
<b>PB2</b>	293	K	R
<b>PB2</b>	560	I	V
<b>Matches (total)</b>			<b>0(10)</b>

**2012/2013**

<b>Viral protein*</b>	<b>Mutation site</b>	<b>R</b>	<b>A2</b>
-----------------------	----------------------	----------	-----------

			(A/Victoria/361/2011)
HA	33	R	Q
HA	45	N	N
HA	48	I	I
HA	145	S	N
HA	198	S	S
HA	223	I	I
HA	278	K	N
HA	312	S	S
NA	81	P	P
NA	93	G	G
NS1	26	K	E
NS1	135	N	N
NS1	139	G	G
NS1	229	E	K
NS2	88	R	R
PA	396	E	D
PA	409	S	S
PB1	587	T	T
PB2	63	V	V
PB2	353	R	R
PB2	461	V	V
PB2	613	A	A
<b>Matches (total)</b>			<b>16(22)</b>

**2013/2014**

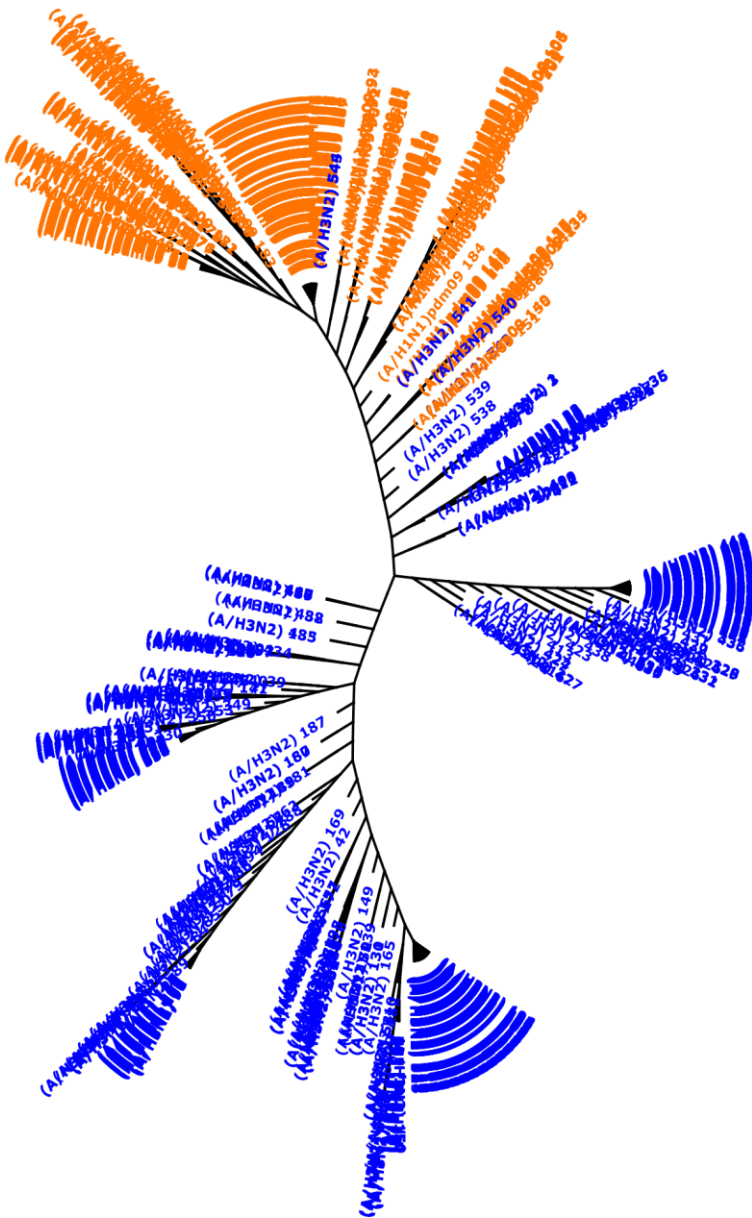
Viral protein*	Mutation site	R	A1 (A/Texas/50/2012)
HA	33	R	R
HA	45	N	N
HA	48	I	I
HA	128	A	N
HA	142	G	R
HA	145	S	N
HA	198	S	S
HA	223	I	I
HA	278	K	K
HA	312	S	S
NA	81	P	P
NA	93	G	G
NA	221	D	E
NS1	26	K	E
NS1	135	N	N
NS1	139	G	G
NS1	229	E	E
NS2	88	R	R
PA	396	E	E

<b>PA</b>	409	S	S
<b>PB1</b>	587	T	T
<b>PB2</b>	63	V	V
<b>PB2</b>	353	R	R
<b>PB2</b>	461	V	V
<b>Matches (total)</b>			<b>19(24)</b>

**2014/2015**

<b>Viral protein*</b>	<b>Mutation site</b>	<b>R</b>	<b>A1 (A/New York/39/2012)</b>	<b>A2 (A/Almaty/2958/2013)</b>
<b>HA</b>	3	I	L	L
<b>HA</b>	33	R	R	R
<b>HA</b>	45	N	N	N
<b>HA</b>	48	I	I	I
<b>HA</b>	144	S	N	N
<b>HA</b>	145	S	S	S
<b>HA</b>	159	Y	F	F
<b>HA</b>	160	T	K	K
<b>HA</b>	198	S	S	S
<b>HA</b>	223	I	I	I
<b>HA</b>	225	D	N	N
<b>HA</b>	278	K	K	K
<b>HA</b>	311	H	Q	Q
<b>HA</b>	312	S	S	S
<b>HA</b>	489	N	D	D
<b>NA</b>	81	P	P	P
<b>NA</b>	93	G	G	G
<b>NA</b>	221	D	E	E
<b>NA</b>	267	K	T	T
<b>NA</b>	380	V	V	I
<b>NS1</b>	26	K	K	K
<b>NS1</b>	135	N	N	N
<b>NS1</b>	139	G	G	G
<b>NS1</b>	229	E	E	E
<b>NS2</b>	88	R	R	R
<b>PA</b>	272	S	N	N
<b>PA</b>	396	E	E	E
<b>PA</b>	409	S	S	S
<b>PA</b>	675	K	N	N
<b>PB1</b>	587	T	T	T
<b>PB2</b>	353	R	R	R
<b>PB2</b>	461	V	V	V
<b>PB2</b>	613	A	A	A
<b>Matches (total)</b>			<b>20(33)</b>	<b>20(33)</b>

na - not available; R- amino acid in reference reference sequence; A1-7 – amino acid in corresponding vaccine strains. PA-X was excluded from the analysis.



**Fig S1.** Reassortment of PB1 segments between human influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 viruses which were circulating in the world in 2013. Phylogenetic tree was built using 277 influenza A(H1N1)pdm09 (colored orange) and 548 influenza A(H3N2) (colored blue) PB1 protein sequences available in public databases.

**References**

Barbey-Martin C *et al.* 2002. An antibody that prevents the hemagglutinin low pH fusogenic transition. *Virology* 294, 70-74.

Bornholdt ZA, and Prasad, BV. 2008. X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Nature* 456, 985-988.

Corti D *et al.* 2011. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850-856.

Ekiert DC *et al.* 2009. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324, 246-251.

Ekiert DC *et al.* 2011. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333, 843-850.

Ekiert DC *et al.* 2012. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature* 489, 526-532.

Fleishman SJ *et al.* 2011. Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Science* 332, 816-821.

Fleury D *et al.* 1999. A complex of influenza hemagglutinin with a neutralizing antibody that binds outside the virus receptor binding site. *Nat Struct Biol* 6, 530-534.

Fleury D *et al.* 1998. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat Struct Biol* 5, 119-123.

Jedrzejewski MJ *et al.* 1995. Structures of aromatic inhibitors of influenza virus neuraminidase. *Biochemistry* 34, 3144-3151.

Lee PS *et al.* 2014. Receptor mimicry by antibody F045-092 facilitates universal binding to the H3 subtype of influenza virus. *Nat Commun* 5, 3614.

Lee PS *et al.* 2012. Heterosubtypic antibody recognition of the influenza virus hemagglutinin receptor binding site enhanced by avidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 17040-17045.

Malby RL *et al.* 1994. The structure of a complex between the NC10 antibody and influenza virus neuraminidase and comparison with the overlapping binding site of the NC41 antibody. *Structure* 2, 733-746.

Pautus S *et al.* 2013. New 7-methylguanine derivatives targeting the influenza polymerase PB2 cap-binding domain. *J Med Chem* 56, 8915-8930.

Reich S *et al.* 2014. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature* 516, 361-366.

Sui J *et al.* 2009. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol* 16, 265-273.

van der Vries E *et al.* 2012. H1N1 2009 pandemic influenza virus: resistance of the I223R neuraminidase mutant explained by kinetic and structural analysis. *PLoS pathogens* 8, e1002914.

Venkatramani L *et al.* 2006. An epidemiologically significant epitope of a 1998 human influenza virus neuraminidase forms a highly hydrated interface in the NA-antibody complex. *J Mol Biol* 356, 651-663.

Wan H *et al.* 2015. Structural characterization of a protective epitope spanning A(H1N1)pdm09 influenza virus neuraminidase monomers. *Nat Commun* 6, 6114.

Wang J *et al.* 2013. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1315-1320.

Whitehead TA *et al.* 2012. Optimization of affinity, specificity and function of designed influenza inhibitors using deep sequencing. *Nat Biotechnol* 30, 543-548.

Whittle JR *et al.* 2011. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 14216-14221.

Xiong X *et al.* 2015. Structures of complexes formed by H5 influenza hemagglutinin with a potent broadly neutralizing human monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 9430-9435.

Xu R *et al.* 2010. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* 328, 357-360.

Yassine HM *et al.* 2015. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat Med* 21, 1065-1070.

Ye Q *et al.* 2012. Biochemical and structural evidence in support of a coherent model for the formation of the double-helical influenza A virus ribonucleoprotein. *mBio* 4, e00467-00412.