

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 578.74

©Коллектив авторов

### АНТИГЕННОСТЬ И В-ЭПИТОПНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА E2 ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Т.И. Кузьмина<sup>1</sup>, Л.В. Оленина<sup>2</sup>, М.А. Санжаков<sup>1</sup>, Т.Е. Фарафонова<sup>1</sup>,  
Т.В. Абрамихина<sup>1</sup>, Ж. Дюбюиссон<sup>3</sup>, Б.Н. Соболев<sup>1</sup>, Е.Ф. Колесанова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10; тел.: 8-495-246-33-75; факс: 8-495-245-08-57, эл. почта: ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Москва;

<sup>3</sup>Институт биологии/Институт Пастера, Лилль, Франция  
(Institut de biologie de Lille/Institut Pasteur, Lille, France)

Данная работа посвящена изучению иммуногенности оболочечных белков вируса гепатита С в целом и высококонсервативных участков, а также гипервариабельного участка HVR1 в составе этих белков, для лабораторных животных (кроликов и мышей). Показано, что иммунный ответ кроликов на оболочечные белки (как E2 в отдельности, так и гетеродимер E1E2) ВГС значительно эффективней, чем иммунный ответ мышей. При иммунизации кролика белком E2 образовывались антитела к ряду высококонсервативных линейных В-эпитопов в составе этого белка, а также к N-концевому фрагменту гипервариабельного участка HVR1. Эпитопы в составе участка CR2 были выявлены впервые. Обнаружена перекрестная иммунореактивность между N-концевым фрагментом гипервариабельного участка HVR1 белка E2 и октапептидным фрагментом участка CR1 белка E1 ВГС, имеющим четыре идентичных аминокислотных остатка.

**Ключевые слова:** вирус гепатита С, оболочечные белки, иммунный ответ, антитела, В-эпитопы.

**ВВЕДЕНИЕ.** Оболочечные белки E1 и E2 вируса гепатита С (ВГС), образующие гетеродимер на поверхности вириона, играют важную роль в инфекционном процессе. Они отвечают за взаимодействие с рецепторами и участвуют в процессах слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны. Оболочечные белки первыми из антигенов ВГС контактируют с иммунной системой инфицированного организма, и самые первые анти-ВГС антитела образуются именно против этих белков [1]. В ряде экспериментов продемонстрирована вируснейтрализующая активность некоторых поликлональных и моноклональных антител к оболочечным белкам ВГС [2-11]. Показано, что концентрация антител к оболочечным белкам у больных гепатитом С находится в обратной зависимости от концентрации вируса в плазме крови [5-8]. Можно полагать, что присутствие у больных острым гепатитом С антител против определенных эпитопов оболочечных белков будет хорошим прогностическим признаком, указывающим на высокую вероятность реконвалесценции [5-8, 12-14]. Однако оболочечные белки ВГС E1 и E2 отличаются чрезвычайной вариабельностью первичной структуры, а в процессе развития ВГС-инфекции в них ещё и происходят мутации [15]. В результате вирусу удается избежать

\* - адресат для переписки

воздействия иммунной системы, ибо к моменту развития иммунного ответа, то есть появления антивирусных антител, структура иммуногенных участков изменяется. Чрезвычайно высокая изменчивость – основная причина недостаточной изученности антигенных свойств оболочечных белков ВГС. В то же время вируснейтрализующие моноклональные антитела против оболочечных белков ВГС могут оказаться эффективным терапевтическим средством при ВГС-инфекции [11, 12]. С помощью антител против оболочечных белков можно выявлять вирусные частицы в крови и тканях больных гепатитом С, что крайне важно для ранней диагностики ВГС-инфекции во время так называемого серонегативного “окна” и для подтверждения элиминации вируса, поскольку метод ПЦР из-за трудоемкости и ненадежности получаемых результатов не пригоден для скрининговых анализов. Используемые в этих случаях антитела должны обладать специфичностью к оболочечным белкам из различных изолятов ВГС, то есть должны быть направлены против высококонсервативных В-эпитопов. Интерес представляют и эпитопы гипервариабельного участка 1 (HVR1) белка Е2, поскольку антитела против них могут обладать протективным действием [12]; кроме того, HVR1 имеет высокую иммуногенность, а различные его варианты проявляют перекрестную иммунореактивность [16].

Настоящая работа посвящена изучению антигенности оболочечных белков ВГС у экспериментальных животных и картированию В-эпитопов в составе консервативных и гипервариабельного участков полноразмерного оболочечного белка ВГС Е2.

## МЕТОДИКА.

*Очистка препаратов оболочечных белков Е2 и Е1Е2 ВГС.* Лизаты клеток HepG2, экспрессировавших полноразмерные белки Е2 или Е1 и Е2 (в виде гетеродимера) изолята Н(1а) ВГС, были получены, как описано ранее [17]. Лизаты концентрировали полиэтиленгликолем (PEG 20000, “Merck”, Германия) и подвергали высокоэффективной гель-фильтрации на колонке TSKG2000SW (0,75×60 см, “Agilent”, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, 0,01 М фосфат калия-натрия, 0,14 М NaCl, pH 7,2), содержащем 0,5% Nonidet P40 (“Sigma”, США); объем наносимого образца 100-150 мкл (2,0-2,5 мг белка); скорость элюции 0,4 мл/мин (хроматографическая рабочая станция Agilent 1100, США). Оболочечный белок Е2 и гетеродимер Е1Е2 выявляли во фракциях (по 0,2 мл) методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител (МАТ) против Е2: чувствительных к нативной конформации белка Н48 и конформационно нечувствительных Н52 [18] (методику см. ниже). Оболочечные белки ВГС элюировались в виде смешанных мицелл детергент-белок в свободном объеме колонки (6,4-8,6 мл), суммарный объем иммунореактивных фракций 2,0-2,2 мл. Полученные фракции концентрировали PEG 20000. Концентрацию белка определяли по методу Hartree [19]. По данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и иммуоблоттинга [17, 18], полученные препараты оболочечных белков содержали не более 5-7% примесного белка, не реагирующего с МАТ Н52.

*Иммунизация животных.* Кроликов породы шиншилла (самцов весом 2 кг) иммунизировали препаратом белка Е2 или гетеродимера Е1Е2, 0,5 мг/животное, подкожно четыре раза с интервалом 2 недели между иммунизациями. Первая иммунизация - смесью 0,5 мл препарата белка в ФСБ с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ, “Calbiochem”, Швейцария), последующие – смесью 0,5 мл препарата белка с 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда (НАФ, “Calbiochem”). Каждым препаратом (Е2 или Е1Е2) иммунизировали одно животное. Кровь брали из ушной вены за 7 дней до первой иммунизации (для получения преиммунной сыворотки) и через 10 дней после последней иммунизации. Сыворотку крови получали, как описано ранее [20].

Мышей (белых беспородных, самцов, 18-20 г) иммунизировали по той же схеме смесями препаратов белков в ФСБ с ПАФ или НАФ (1:1), 25 мкг белка

в 100 мкл эмульсии/мышь, внутрибрюшинно. Каждый препарат вводили одной группе из 5 животных. Контрольной группе (5 мышей) вводили смесь ПАФ или НАФ с ФСБ. Тотальный забор крови путем декапитации проводили через 7 дней после последней иммунизации. Титры антител против Е2 или Е1Е2 в сыворотках крови определяли ИФА.

*ИФА.* Для определения оболочечных белков ВГС во фракциях после гель-фильтрации в лунки полистирольных планшетов с высокой сорбционной емкостью ("Costar", США), перед опытом 20 мин облученных УФ-светом бактерицидной лампы, вносили по 100 мкл раствора лектина подснежника (10 мкг/мл, "Sigma", США) в 0,05 М Na-карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5 (КББ) и инкубировали в течение ночи при 20°C. Лунки промывали 3 раза ФСБ, содержащим 0,05% (по объему) твина-20 ("Merck") (ФСБТ). Вносили в лунки по 100 мкл ФСБТ, содержащего 50% (по объему) молока 0,5%-ной жирности ("Пармалат", Россия) (ФСБТМ), и инкубировали 1 ч при 37°C. После удаления буфера вносили в лунки по 100 мкл разведенного в 10 раз ФСБТ элюата из фракций после гель-фильтрации и инкубировали 1 ч при 37°C. Лунки промывали 4 раза ФСБТ, вносили в них по 100 мкл раствора МАТ Н52 или Н48 (5 мкг/мл) в ФСБТМ и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее проводили ИФА, как описано ранее [21]. Препарат антивидовых антител - меченные пероксидазой антитела кролика против иммуноглобулинов G мыши ("Sigma"), рабочее разведение 1:1000. Оптическую плотность (ОП) растворов в лунках измеряли при 405 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan Spectrum ("Thermo Labsystems", Финляндия). Аналогично определяли титры антител против оболочечных белков в сыворотках крови иммунизированных животных, используя в качестве источника антигена лизат клеток HepG2, экспрессировавших Е2 или Е1Е2 ВГС (концентрация белка 100 мкг/мл), а вместо МАТ против Е2 – исследуемые сыворотки животных в соответствующих разведениях. Для детекции связавшихся с антигеном антител кролика применяли антитела козы к иммуноглобулинам G кролика, меченные пероксидазой хрена ("Имтек", Россия), в разведении 1:2000. Нулевым стандартом служил лизат клеток HepG2, не экспрессировавших Е2 или Е1Е2 ВГС, разведенный КББ (а) или ФСБТМ (б) до концентрации белка 100 мкг/мл и сорбированный прямо в лунки планшета (а) или на предварительно адсорбированный лектин подснежника (б); в качестве контрольных сывороток использовали сыворотки крови кроликов до иммунизации либо сыворотки крови мышей контрольной группы.

Выявление пептид-реактивных антител проводили, как описано ранее [21]: к адсорбированному в лунках планшета стрептавидину ("ICN", США; 2 мкг/лунку) присоединяли биотинилированные пептиды (1 мкг/лунку), которые далее последовательно инкубировали с: 1) сывороткой крови иммунизированного животного, разведенной в 100, 250, 1250 или 3750 раз ФСБТМ, 2) антивидовыми антителами, меченными пероксидазой (см. выше), 3) раствором субстрата и косубстрата пероксидазы. В контрольные пробы ("фон") вносили все реагенты, кроме сыворотки крови (контроль 1), либо все реагенты, кроме пептидов (контроль 2).

*Синтез пептидов.* Биотинилированные додекапептиды структуры biotin-Ser-Gly-Ser-Gly-(целевой октапептидный фрагмент белка Е1 или Е2 ВГС) синтезировали на (Lys-Pro)-дикетопиперазин (DKP)-иглах ("Mimotopes", Австралия) по методике [21] с модификациями [22] и отщепляли с игл обработкой 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером, pH 8,4, содержащим 40% (по объему) ацетонитрила. Аминокислотные (а.к.) последовательности пептидов подтверждены времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активируемой лазерной десорбцией-ионизацией (масс-спектрометр MICROFLEX, "Bruker Daltonics", Германия), матрица -  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота.

Выравнивание а.к. последовательностей оболочечных белков ВГС и их фрагментов и расчет частот встречаемости отдельных октапептидных фрагментов проводили, как описано ранее [23].

## ИММУНОГЕННОСТЬ ОБОЛОЧЕЧОГО БЕЛКА ВГС

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В таблице 1 приведены титры антител в сыворотках крови животных, иммунизированных оболочечными белками ВГС E2 и E1E2, экспрессированными в клетках гепатомы HepG2 в виде полностью гликозилированных молекул [17]. Прочие белки лизата клеток HepG2, адсорбированные как прямо в лунки планшета, так и на лектин подснежника, не взаимодействовали с антителами против оболочечных белков ВГС (табл. 1). Видно, что иммунный ответ кроликов на оболочечные белки ВГС значительно эффективней, чем иммунный ответ мышей. Это согласуется с результатом других авторов, показавших слабую иммуногенность различных препаратов оболочечных белков ВГС для мышей по сравнению с морскими свинками [24], а также из невозможности получения высокоавидных мышиных моноклональных антител против этих белков в исследовательских целях [17, 18]. Оболочечный белок E2 сам по себе обладает большей иммуногенностью как для мышей, так и для кроликов, чем гетеродимер E1E2: титры антител против E2 у мышей достоверно ( $p < 0,01$ ) выше, чем титры антител против E1E2. Поскольку титры антител против E2 в сыворотках мышей, иммунизированных E1E2, почти совпадают с титрами антител против E1E2 (табл. 1), можно полагать, что основной иммунный ответ у мышей при введении гетеродимера E1E2 направлен против E2. У кролика же при иммунизации гетеродимером E1E2 образовывались антитела в основном против целого гетеродимера и/или белка E1. Сопоставляя титры антител против E2 и E1E2 в анти-E2-сыворотке, можно сделать вывод, что в гетеродимере E1E2 большинство антигенных детерминант E2 остаются доступными для взаимодействия с антителами.

Таблица 1. Титры антител в сыворотках крови лабораторных животных, иммунизированных оболочечными белками E2 и E1E2 ВГС.

Иммунизация белком	№ животного	1/Титр антител		
		К белкам ВГС		К лизату НерG2*
		E2	E1E2	
		Кролики		
E2	1	200000	100000	<100
E1E2	2	10000	50000	<100
		Мыши		
E2	1	27000	27000	<100
	2	1000	500	<100
	3	9000	9000	<100
	4	27000	9000	<100
	5	9000	3000	<100
	X±x **	3,95±0,26	3,70±0,29	<2
E1E2	1	9000	9000	<100
	2	100	100	<100
	3	100	500	<100
	4	3000	1000	<100
	5	500	500	<100
	X±x**	2,83±0,39	2,87±0,31	<2

Примечание: \* - лизат контрольной культуры клеток, не экспрессировавших E2 или E1E2;

\*\* - логарифм величины, обратной средней геометрической титров антител в сыворотках крови данной группы мышей,  $\pm$  среднеквадратичное отклонение.

Для сравнительной характеристики специфичности иммунного ответа кроликов и мышей на оболочечные белки в составе гетеродимера E1E2 и белок E2 в отдельности было проведено В-эпитопное картирование методом пептидного сканирования с использованием перекрывающихся октапептидов, охватывающих высококонсервативные участки а.к. последовательностей оболочечных белков ВГС и участок HVR1 белка E2. Октапептиды высококонсервативных участков перекрывались на 7, а октапептиды участка HVR1 – на 6 а.к. остатков.



Высококонсервативными считали участки, перекрывающиеся октапептидные фрагменты которых имели частоту встречаемости в различных генетических вариантах а.к. последовательностей оболочечных белков E1 и E2 ВГС более 60%. Эти участки вместе с номерами соответствующих им синтезированных перекрывающихся октапептидных фрагментов приведены в таблице 2. Для высококонсервативных участков, выявленных ранее, сохранены их обозначения [23]. Кроме октапептидов для эпитопного картирования были использованы также три более протяженных консервативных участка. В исследование не включены высококонсервативные гидрофобные участки из трансмембранного домена белка E2 (как не доступного для взаимодействия с антителами). Пептиды для синтеза выбирали исходя из консенсусной а.к. последовательности оболочечных белков ВГС. Видно, что отличия соответствующих участков оболочечных белков ВГС генотипа 1a изолята Н от консенсусной последовательности невелики и не могут кардинально сказаться на результатах эпитопного картирования. Кроме того, важно было оценить возможность перекрёстной иммунореактивности фрагментов консенсусной последовательности при выявлении антител против оболочечных белков в сыворотках крови больных гепатитом С, инфицированных различными изолятами ВГС.

Таблица 2. Участки оболочечных белков E1 и E2 ВГС, исследованные на наличие В-эпитопной активности.

Белок	Локализация в а.к. последовательности полипротеина ВГС	Обозначение участка [23]	А.к. последовательность*	Номера синтезированных пептидов
			<b>Высококонсервативные участки</b>	
E1	224-232	CR1	PGCVPCVRE	1-2
E1	276-286		YVGDLGGSVFL	3-6
E1	289-296		QLFTFSPR	7
E1	302-312		QDCNCSIYPGH	8-10
E1	311-329		GHVTGHRMAWDMMMNWSPT	11-21
E1	349-358	GLR	AGAHWGVLAG	22-24
E1	363-372		SMVGNWAKVL	25-27
E2	414-433		INTNGSWHINRTALNCNDSL	28-39
			<i>INTNGSWHINRTALNCNESL</i>	
E2	481-491	PRR1	DQRPYCWHYPP	40-43
			<i>EQRPYCWHYPP</i>	
E2	502-521	CR2	VCGPVYCFTSPVVVGTTDR	44-56
E2	529-536	PRR2	WGENETDV	57
			<i>WGANDTDV</i>	
E2	547-557		GNWFGCTWMNS	58-61
E2	558-565	CR3	TGFTKTCG	62
E2	580-596		TCPTDCFRKHPEATYTK	63-77
			<i>LCPTDCFRKYPEATYTK</i>	
E2	596-607	CR4	KCGSGPWLTPRC	78-82
			<i>KCGSGPRIIPRC</i>	
E2	609-624		VDYPYRLWHYPCTVNF	83-92
			<i>VDIPIRLWHYPCTINY</i>	
E2	626-640	CHR	IFKVRMYVG, MYVGGVEHRL	93-97
E2	642-652		AACNWTIRGERC	98-101
E2	653-666		DLEDNRSELSPLL	102-109
E2	679-704	CR5	FTTLPALSTGLIHLHQNVQYL YQ	110-129
E2	481-491	PRR1	DQRPYCWHYAP	N1
E2	610-621	CR4	DYPYRLWHYPCT	N2
E2	648-65		RGERCDLEDNRDS	N3
			<b>Гипервариабельный участок: HVR1</b>	
E2	389-416	HVR1	ETHVTGGSAARTTSGLTSLFSPGAKQN	185
			<i>ETHVTGGNAGRTTAGLVGLIPGAKQN</i>	

Примечание: \*- Обычным шрифтом обозначены фрагменты консенсусной а.к. последовательности оболочечных белков ВГС. Курсивом показаны а.к. последовательности соответствующих фрагментов оболочечных белков E1 и E2 изолята Н(1a); жирным шрифтом в них обозначены а.к. остатки, отличающиеся от остатков консенсусной последовательности.

### ИММУНОГЕННОСТЬ ОБОЛОЧЕЧОГО БЕЛКА ВГС

В экспериментах по антигенному картированию использовали только антисыворотки животных с титрами анти-E2 или -E1E2 антител не менее 1:1000. Ни в одной из сывороток крови мышей, иммунизированных E2 или E1E2, а также в сыворотке крови кролика, иммунизированного E1E2, не было выявлено антител, взаимодействовавших с пептидами (ОП<sub>405</sub> всех проб при ИФА антисывороток в разведении 1:100 за вычетом величины фона (проба без антисыворотки) превышали нулевой стандарт менее чем два раза). В сыворотке крови кроликов до начала иммунизации и в сыворотках крови контрольных мышей также не было пептид-реактивных антител. Лишь в сыворотке крови кролика, иммунизированного белком E2 ВГС, были выявлены антитела, специфически взаимодействовавшие с фрагментами этого белка E2 и одним фрагментом белка E1; определены титры этих пептид-реактивных антител (табл. 3).

Таблица 3. В-эпитопы в составе оболочечного белка ВГС E2, выявленные с помощью антисыворотки кролика против E2, и титры антител к ним.

№ пептида	А.к последовательность пептида	Участок	Белок	Взаимодействие антител сыворотки кролика к E2 с иммунореактивными пептидами	
				ОП <sub>405</sub> *	1/титр антител
11	GHVTGHRM	CR1	E1	0,45±0,05	250
40	DQRPYCWH	PRR1	E2	0,70±0,06	250
41	QRPYCWHY	PRR1	E2	0,49±0,04	250
42	KPYCWHYP	PRR1	E2	0,80±0,09	250
N1	DQRPYCWHYPP	PRR1	E2	1,44±0,20	1250
44	VCGPVYCF	CR2	E2	0,99±0,04	250
45	CGPVYCFI	CR2	E2	0,84±0,08	250
55	PVVVGTTD	CR2	E2	1,80±0,30	1250
56	VVVGTIDR	CR2	E2	2,62±0,26	3750
64	CPTDCFRK	CR3	E2	1,47±0,15	1250
93	IFKVRMYV		E2	0,29±0,03	100
130	ETHVTGGS	HVR1	E2	2,56±0,18	3750
131	HVTGGSAA	HVR1	E2	1,32±0,14	1250

Примечание: \* - Результаты пяти независимых экспериментов, получены при использовании в ИФА сыворотки кролика против E2 в 100-кратном разведении. Величина ОП<sub>405</sub> при ИФА взаимодействия пептидов с антителами контрольных сывороток крови составляла 0,045±0,003.

Два В-эпитопа участка CR2 - в N- и C-концевых областях - выявлены в данной работе впервые, причём C-концевой В-эпитоп VVVGTIDR обладал наиболее высокой иммуногенностью из высококонсервативных участков белка E2, судя по величине титра антипептидных антител. К В-эпитопам участков PRR1 и CR3, взаимодействующим с антителами кролика против E2, были ранее обнаружены антитела у больных хроническим гепатитом С [21]. Кроме того, участки PRR1, CR3, IFKVRMYV входят в состав протяженных иммунореактивных фрагментов, антитела к которым также выявлялись в сыворотках крови больных гепатитом С [2, 13, 25]. Можно полагать, что В-эпитопу антител, взаимодействующих с участком PRR1, наиболее соответствует а.к.

последовательность DQRPYCWNYAP (пептид N1), поскольку ОП<sub>405</sub> при взаимодействии антител к E2 с этим пептидом достоверно превышает ОП<sub>405</sub> для более коротких пептидов 40-42 ( $p < 0,001$ ). Титр антител против N1 также выше титров антител против перекрывающих его октапептидных фрагментов. Хороший иммунный ответ против двух N-концевых октапептидов HVR1 (табл. 3) не был неожиданным, поскольку, как сказано выше, многие исследователи отмечали высокую иммуногенность данного участка белка E2 ВГС [12, 13]. По-видимому, наличие во фрагменте GHVTGHRM участка CR1 белка E1 ВГС тетрапептида HVTG, присутствующего в выявленных нами антигенных пептидах из HVR1 белка E2, объясняет взаимодействие антител против E2 с фрагментом CR1 белка E1. Можно полагать, что тетрапептид HVTG является основной частью N-концевого В-эпитопа HVR1 белка E2 ВГС.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Слабый иммунный ответ мышей на оболочечные белки ВГС делает данный вид животных неоптимальным объектом для выработки диагностических либо терапевтических антител против ВГС. В противоположность мышам, кролики могут быть использованы для наработки антител против оболочечных белков ВГС, особенно против белка E1 и целого гетеродимера E1E2, иммунный ответ на которые у мышей крайне слабый. При иммунизации белком E2 у кроликов могут весьма эффективно образовываться антитела к ряду высококонсервативных линейных фрагментов этого белка, в том числе и к тем, которые ранее не выявлялись как В-эпитопы, в частности, фрагменты участка CR2 [14, 21]. Структурная основа перекрестной иммунореактивности между N-концевым октапептидом HVR1 белка E2 и октапептидным фрагментом участка CR1 белка E1 – наличие четырех одинаковых а.к. остатков – может оказаться и структурной основой описанной ранее перекрестной иммунореактивности между пептидами, моделирующими различные варианты HVR1 [16], однако это предположение требует дальнейшего исследования.

Авторы благодарят н.с. О.Н. Харыбина (ГУ НИИ БМХ РАМН) за помощь в масс-спектрометрическом анализе пептидов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 04-07-01080 и № 06-03-33033.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Farci P., Bukh J., Purcell R.H. (1997) Springer Semin. Immunopathol., **19**, 5-26.
2. Zibert A., Schreier E., Roggendorf M. (1995) Virology, **208**, 653-661.
3. Bartosch B., Bukh J., Meunier J.-C., Granier C., Engle R.E., Blackwelder W.C., Emerson S.U., Cosset F.-L., Purcell R.H. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 14199-14204.
4. Keck Z.Y., Op de Beeck A., Hadlock K.G., Xia J., Li T.-K., Dubuisson J., Founk S.K.H. (2004) J. Virol., **78**, 9224-9232.
5. Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Harada H., Wyatt C., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., Miyamura T. (1998) Hepatology, **28**, 1117-1120.
6. Yu M., Bartosch B., Zhang P., Guo P., Renzi P.M., Shen L., Granier C., Feinstone S.M., Cosset F.-L., Purcell R.H. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 7705-7710.
7. Lavillette D., Morice Y., Germanidis G., Donot P., Soulier A., Pagkalos E., Sakellariou G., Intrator L., Bartosch B., Pawlotsky J.-M., Cosset F.-L. (2005) J. Virol., **79**, 6023-6034.
8. Netski D.M., Mosbrugger T., Depla E., Maertens G., Ray S.C., Hamilton R.G., Roundtree S., Thomas D.L., McKeating J., Cox A. (2005) Clin. Infect. Dis., **41**, 667-675.

9. Farci P., Shimoda A., Wong D., Cabezon T., De Gioannis D., Strazzera A., Shimizu Y., Shapiro M., Alter H.J., Purcell R.H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15394-15399.
10. Habersetzer F., Fournillier A., Dubuisson J., Rosa D., Abrignani S., Wychowski C., Nakano I., Trepo C., Desgranges C., Inchauspe G. (1998) *Virology*, **249**, 32-41.
11. Eren R., Landstein D., Terkieltaub D., Nussbaum O., Zauberman A. et al. (2006) *J. Virol.*, **80**, 2654-2664.
12. Rosa D., Campagnoli S., Moretto C., Guenzi E., Cousens L., Chin M., Dong C., Weiner A.J., Lau J.Y., Choo Q.L., Chien D., Pileri P., Houghton M., Abrignani S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1759-1763.
13. Zibert A., Kraas W., Ross R.S., Meisel H., Lechner S., Jung G., Roggendorf M. (1999) *J. Hepatol.*, **30**, 177-184.
14. Carlos M.P., Yamamura Y., Vu Q., Conzen K., Anderson D.E., Torres J.V. (2004) *Clin. Immunol.*, **111**, 22-27.
15. Pawlotsky J.M. (2003) *Clin. Liver Dis.*, **7**, 45-66.
16. Puntoriero G., Meola A., Lahm A., Zucchelli S., Ercole B.B., Taft R., Pezzanera M., Mondelli M.U., Cortese R., Tramontano A., Galfre' G., Nicosia A. (1998) *EMBO J.*, **17**, 3521-3533.
17. Cocquerel L., Meunier J.-C., Pillez A., Wychowski C., Dubuisson J. (1998) *J. Virol.*, **72**, 2183-2191.
18. Cocquerel L., Op De Beeck A., Lambot M., Roussel J., Delgrange D., Pillez A., Wychowski C., Penin F., Dubuisson J. (2002) *EMBO J.*, **21**, 2893-2902.
19. Hartree E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.
20. Колесанова Е.Ф., Козин С.А., Арчаков А.И. (1998) *Биоорган. химия*, **24**, 747-755.
21. Olenina L.V., Nikolaeva L.I., Sobolev B.N., Blokhina N.P., Archakov A.I., Kolesanova E.F. (2002) *J. Viral Hepat.*, **9**, 174-182.
22. Алешина Е.Ю., Пындык Н.В., Мойса А.А., Санжаков М.А., Харыбин О.Н., Николаев Е.Н., Колесанова Е.Ф. (2008) *Биомед. химия*, **54**, 184-191.
23. Sobolev B.N., Poroikov V.V., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Archakov A.I. (2000) *J. Viral Hepat.*, **7**, 368-374.
24. Stamataki Z., Coates S., Evans M.J., Wininger M., Crawford K., Dong C., Fong Y.L., Chien D., Abrignani S., Balfe P., Rice C.M., McKeating J.A., Houghton M. (2007) *Vaccine*, **25**, 7773-7784.
25. Zhang Z.X., Sonnenborg A., Sallberg M. (1994) *Clin. Exp. Immunol.*, **98**, 382-387.

Поступила: 06. 03. 2008.



**ANTIGENICITY AND B-EPITOPE MAPPING OF HEPATITIS C VIRUS ENVELOPE  
PROTEIN E2**

**T.I. Kuzmina<sup>1</sup>, L.V. Olenina<sup>2</sup>, M.A. Sanzhakov<sup>1</sup>, T.E. Farafonova<sup>1</sup>, T.V. Abramihina<sup>1</sup>, J. Dubuisson<sup>3</sup>,  
B.N. Sobolev<sup>1</sup>, E.F. Kolesanova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10,  
Moscow, 119121 Russia; tel: +7-495-246- 33-75; fax: +7-499-245-58-07;  
e-mail: [ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru](mailto:ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru);

<sup>2</sup>Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Institut de biologie de Lille/Institut Pasteur, Lille, France.

Immunogenicity for laboratory animals (rabbits and mice) of the whole hepatitis C virus envelope proteins and their conserved as well as hypervariable HVR1 sites has been investigated. Rabbit immune responses to HCV envelope proteins (both single E2 and E1E2 heterodimer) were shown to be much more efficient than murine immune responses. Upon the immunization of the rabbit with E2 protein, antibodies to several highly conserved linear B-epitopes of this protein as well as to the N-terminal fragment of the hypervariable region HVR1 were formed. Epitopes in the CR2 region were determined for the first time. Cross-reactivity was revealed between the N-terminal fragment of the protein E2 hypervariable region HVR1 and the octapeptide fragment of the protein E1 conserved region CR1, which shared four identical amino acid residues.

**Key words:** hepatitis C virus, envelope proteins, immune response, antibodies, B-epitopes.