Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 2, с. 254-264.

УДК 615.371
©Коллектив авторов

ПУТЬ К ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЕ ПРОТИВ ГЕПАТИТА С

Е.Ф. Колесанова*, Б.Н. Соболев, А.А. Мойса, Е.А. Егорова, А.И. Арчаков

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: (499)246-33-75;
эл. почта: ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru

Чтобы обойти проблему генетической вариабельности и изменчивости оболочечных белков ВГС при создании вакцины, нами был использован подход, называемый “обратная вакцинология” – “от генома к вакцине”. В рамках этого подхода была создана база данных последовательностей белков ВГС, проведён анализ генома вируса и выявлены несколько высококонсервативных участков в составе оболочечных белков ВГС. В составе целых белков и вирусных частиц эти участки проявляли невысокую антигенную активность: антитела против данных участков обнаруживались далеко не у всех больных гепатитом С. Однако среди высококонсервативных участков были выявлены два таких, которые содержали широкий набор потенциальных мотивов Т-хелперных эпитопов. Нами были разработаны и получены методом твердофазного пептидного синтеза несколько искусственных пептидных конструкций, состоящих из двух высококонсервативных участков оболочечного белка Е2 ВГС, соединенных линкером; один из этих участков содержал набор Т-хелперных эпитопных мотивов. В опытах на лабораторных животных полученные пептидные конструкции проявляли иммуногенность, сравнимую с иммуногенностью белковых молекул, и были способны вызывать образование антител, специфично связывающих оболочечные белки ВГС. При иммунизации некоторыми конструкциями удалось получить антитела, связывающие ВГС из плазмы крови больных гепатитом С. На основе указанных пептидных конструкций разрабатывается оригинальный препарат синтетической пептидной вакцины против гепатита С.

Ключевые слова: гепатит С, вакцина, вирус, оболочечные белки, антигены, пептиды.
DOI: 10.18097/PBMC20156102254

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что возбудитель гепатита С – вирус, принадлежащий к семейству *Flaviviridae* и роду вирусов гепатита С, – был выявлен в 1988 году, до сих пор не созданы лекарственные средства, обеспечивающие полное излечение всех инфицированных. Последние три года ознаменовались появлением на рынке прямых антивирусных препаратов для лечения гепатита С – ингибиторов протеазы NS3/NS4A вируса гепатита С (ВГС) телапревира и боцепревира; вторую-третью фазу клинических испытаний проходят ингибиторы вспомогательного белка NS5A, РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B, новые ингибиторы протеазы вируса. По данным испытаний, новые лекарственные средства обеспечивают в сочетании со стандартной терапией альфа-интерфероном и рибавирином излечение не менее 70% инфицированных ВГС генотипа 1 в хронической стадии заболевания [1-3]. Однако эффективность действия новых лекарств зависит от генотипа вируса (доля излеченных больных гепатитом С, заражённых иным, чем 1, генотипом ВГС, значительно ниже), не отменяется терапия интерфероном и рибавирином. Всё это значит, что к побочным действиям и противопоказаниям интерферона и рибавирина добавляются побочные действия и противопоказания новых соединений, и, наконец, обнаружены уже избегающие действия ингибиторов мутантные формы ВГС [3, 4].

Таким образом, создание вакцин против ВГС остаётся насущной потребностью. От профилактической вакцины против гепатита С ожидают предотвращения развития инфекции при попадании вируса в организм или хотя бы предотвращения хронизации заболевания, от терапевтической – стимуляции вируснейтрализующего ответа [5-8]. Разработка вакцин против гепатита С оказалась чрезвычайно сложным делом, поскольку традиционный путь создания вакцины (культивирование вируса, выявление протективных иммуногенов, получение аттенуированного или инактивированного вируса либо протективного иммуногена, разработка состава вакцины и технологии её производства, проверка

* - адресат для переписки

эффективности вакцины на животных) невозможен. Во-первых, до настоящего времени не создана система репликации ВГС, пригодная для получения вируса в препаративных количествах. Во-вторых, ВГС обладает чрезвычайно высокой генетической изменчивостью, что особенно характерно для белков его оболочки, ответственных за проникновение вируса в клетку-мишень. Это приводит к тому, что вакцина, разработанная на основе целого вируса или его полноразмерных оболочечных белков, эффективна только против того субтипа или даже генетического варианта вируса, который был использован для разработки вакцины. В-третьих, проникновение вируса в клетку представляет собой сложный, не до конца изученный процесс, в котором участвуют несколько рецепторов (см. обзор [9]), и блокирование связывания вируса только с одним из них может не повлиять на инфицирование [10]. В-четвёртых, белки ВГС могут проникать в клетки иммунной системы и воздействовать на них, приводя в результате к торможению развития иммунного ответа и направления его по аберрантному пути (развитие аутоиммунных реакций, выработка криоглобулинов, злокачественное перерождение лимфоцитов) (см. обзор [11]). Следует отметить также отсутствие доступной лабораторной модели ВГС-инфекции на мелких животных (гепатитом С болеют только человек и шимпанзе), что затрудняет доклиническую проверку эффективности вакцины [12-14]. Единственной лабораторной моделью ВГС-инфекции является модель инфицирования ВГС клеток гепатомы Huh 7.5 и последующей репликации вируса в этих клетках [15-17], но эта модель основана на использовании вируса с модифицированным геномом, да и клетки гепатомы не являются полностью адекватной моделью ткани печени.

Несмотря на трудности, в мире идёт работа по созданию вакцин против гепатита С с использованием различных подходов: 1) получение профилактических рекомбинантных белковых вакцин и вакцин на основе вирусоподобных частиц, направленных на выработку специфических антител к оболочечным белкам вируса, 2) разработка терапевтических ДНК-вакцин на основе вирусных векторов, содержащих в своём составе гены белков-антигенов ВГС, 3) создание пептидных цитотоксических Т-эпитопных вакцин, состоящих из синтетических фрагментов белков ВГС, проявляющих активность цитотоксических и хелперных Т-эпитопов. Два последних подхода направлены на стимуляцию цитотоксического Т-клеточного ответа: пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов, специфично разрушающих клетки, инфицированные ВГС. Однако пока ни одна вакцина не прошла все стадии клинических испытаний и не была выведена на рынок.

1. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА С

Для разработки эффективной вакцины против гепатита С необходимо было знать, какие белки ВГС могут служить протективными антигенами, какой механизм иммунного ответа играет определяющую роль в нейтрализации вируса и как этот ответ формируется.

Из литературы известно, что при инфекции ВГС у пациентов формируется как гуморальный (образование специфичных антител), так и цитотоксический (появление и пролиферация специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов) иммунный ответ (см. обзор [11]). Из-за медленной репликации вируса в клетках печени и отсутствия у него цитотоксической активности оба типа иммунного ответа развиваются достаточно медленно, и интенсивность их невелика. Так, титры антител против белков ВГС у пациентов обычно составляют максимум 1:5000 [18], для сравнения – титры антител к коровому белку вируса гепатита В у больных гепатитом В могут составлять 1:1000000 [19]. Низкая интенсивность иммунного ответа может быть одной из основных причин хронизации заболевания: иммунная система не успевает запустить механизм, обеспечивающий полную элиминацию вируса [20-22]. Ещё одной важной причиной неэффективности иммунного ответа организма-хозяина на ВГС является высокая вариабельность белков ВГС и мутационная активность вируса, позволяющие ему избегать иммунного ответа. Репликация геномной РНК ВГС осуществляется под действием РНК-зависимой РНК-полимеразы, у которой отсутствует 3′-5′–экзонуклеазная проверяющая активность, и потому скорость накопления мутаций в геноме ВГС очень высока: 10^{-2}-10^{-3} пар оснований на нуклеотидную позицию в год [22-24], что соответствует аналогичным оценкам для других РНК-содержащих вирусов с положительной полярностью и в 10^{3}-10^{6} раз превосходит скорость появления мутаций для ДНК-содержащих вирусов [25]. Мутации, происходящие в антигенно активных участках молекул белков ВГС и изменяющие структуру антигенных детерминант и Т-эпитопов, позволяют вирусу уходить от нейтрализации антителами, специфичными к ранее существовавшим генетическим вариантам ВГС [22, 25-28]. Возможность повторного заражения выздоровевших после гепатита С другим изолятом ВГС была продемонстрирована у шимпанзе и человека, при этом у шимпанзе детектировались антитела против оболочечных белков вируса [29, 30]. Аналогично клетки, в которых идёт репликация вируса, избегают разрушения под действием ранее сформировавшихся цитотоксических Т-лимфоцитов [27, 28]. Пока развивается иммунный ответ новой специфичности, вирус успевает снова мутировать, и этот процесс может продолжаться бесконечно долго. Наиболее вариабельной структурой отличаются оболочечные белки ВГС, которые как раз и являются первыми компонентами вируса, распознаваемыми иммунной системой человека как чужеродные [31, 32].

Тем не менее, примерно у 20-30% больных ВГС-инфекция заканчивается выздоровлением с элиминацией вируса [33]. Кроме того, ещё в первое десятилетие исследования ВГС были получены результаты, указывающие на возможность

образования вируснейтрализующих антител и защиту организма с их помощью от инфицирования вирусом. Так, шимпанзе, имевшие высокий титр антител к оболочечным белкам ВГС после иммунизации этими белками, были полностью защищены от последующего инфицирования гомологичным изолятом ВГС [34]. Также наблюдали и нейтрализацию *in vitro* гомологичного изолята ВГС в результате инкубации его с сывороткой крови пациента с хроническим гепатитом С [35]. У выздоровевших пациентов обнаруживали цитотоксические Т-лимфоциты, специфично активировавшиеся фрагментами белков ВГС [27, 29, 36, 37]. Таким образом, в ответ на ВГС-инфекцию в организме может формироваться иммунный ответ, направленный на элиминацию вируса, но этот ответ во многих случаях оказывается слабым, изолят-специфичным и отстающим по времени от скорости мутаций в геноме ВГС. Это указывает на возможность разработки как протективной, так и терапевтической вакцин против гепатита С, с одной стороны, и неприменимость традиционного подхода к её созданию, с другой.

Для создания вакцин против инфекционных агентов с высоковариабельными и изменчивыми антигенами разработан подход, называемый "обратной вакцинологией" [38] (рис. 1). Этот подход предусматривает разработку вакцин на основе принципиально новых искусственных синтетических и рекомбинантных иммуногенных конструкций, составленных с использованием методов биоинформатики и способных вызывать эффективный, стабильный и широкоспецифичный иммунный ответ против генетически изменчивого возбудителя [38, 39]. В рамках применения концепции "обратной вакцинологии" к разработке вакцины против гепатита С нами были запланированы следующие исследования: поиск высококонсервативных антигенных детерминант потенциально вируснейтрализующих антител, консервативных мотивов Т-хелперных эпитопов в составе белков ВГС, составление из этих фрагментов искусственных антигенных конструкций с последующей проверкой их иммуногенности и разработка препарата вакцины в виде смеси либо конъюгата этих конструкций с адъювантом.

Рисунок 1. Путь разработки вакцин с использованием подхода "обратной вакцинологии" (схема).

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ ВГС, СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ HCVmap

Первыми компонентами вируса, распознаваемыми иммунной системой человека как чужеродные, являются его оболочечные белки Е1 и Е2. Одновременно эти белки ответственны за взаимодействие с рецепторами клеток-мишеней и за проникновение в них [40]. Антитела против оболочечных белков ВГС могут проявлять (и в ряде случаев действительно проявляют) вируснейтрализующее и протективное действие [34, 35, 41-52]. Однако оболочечные белки отличаются наибольшим генетическим разнообразием в зависимости от субтипа ВГС и наибольшей изменчивостью аминокислотных последовательностей в ходе многократных репликаций вируса в организме хозяина [31, 32]. Это является одной из основных причин избегания ВГС иммунного ответа организма хозяина и проявления у подавляющего большинства антител, полученных против целых оболочечных белков ВГС, вирионов или вирусоподобных частиц вируснейтрализующей и протективной активности в отношении только того генетического варианта ВГС, против которого выработаны антитела [22, 25-28, 53, 54]. Тем не менее, оболочечные белки ВГС являлись и до сих пор остаются объектом пристального внимания иммунохимиков и вирусологов. Важная роль на начальных стадиях инфицирования делает оболочечные белки привлекательными объектами вакцинологии, но высокая вариабельность их структуры ставит задачу поиска консервативных антигенных детерминант в этих белках и конструирование на основе этих детерминант искусственных иммуногенных конструкций, способных вызывать вируснейтрализующий и протективный иммунный ответ широкой специфичности в отношении различных изолятов ВГС.

Нами были собраны из разных источников (публикации, включая патенты, национальные и международные базы данных первичных структур белков и нуклеиновых кислот) полноразмерные и фрагментарные аминокислотные последовательности белков ВГС и нуклеотидные – генома вируса. Нуклеотидные последовательности были транслированы в аминокислотные. Была сформирована и зарегистрирована база данных HCVmap, содержавшая информацию об аминокислотных последовательностях структурных и неструктурных белков ВГС, их антигенных детерминантах и Т-эпитопах, а также библиографические ссылки на представленную информацию [55, 56]. В процессе создания этой базы данных аминокислотные последовательности

белков ВГС были подвергнуты выравниванию для того, чтобы обеспечить единую нумерацию аминокислотных остатков в них для всех генотипов, субтипов и генетических вариантов (“квазивидов”) вируса. Это выравнивание позволило нам сравнить аминокислотные последовательности оболочечных белков ВГС и выявить в них высококонсервативные аминокислотные остатки и целые участки [32]. Оказалось, что гипервариабельный участок HVR1 оболочечного белка E2 ВГС содержит несколько высококонсервативных аминокислотных остатков, а в ряде позиций репертуар аминокислотных замен строго ограничен набором сходных по физико-химическим свойствам остатков, что обеспечивает сохранность пространственной структуры этого участка несмотря на вариабельность аминокислотной последовательности. Анализ 827 полноразмерных и фрагментарных аминокислотных последовательностей оболочечных белков ВГС, включая 517 аминокислотных последовательностей участка HVR1, известных к 2000 году, позволил выявить 8 высококонсервативных участков в составе оболочечных белков E1 и E2. Мы предположили, что эти высококонсервативные участки могут быть ответственны за взаимодействие вируса с рецепторами и иными молекулами клеток организма-хозяина, поскольку, несмотря на различия первичных структур белков разных генотипов, субтипов и “квазивидов” ВГС, все генетические разновидности ВГС обладают одинаковым видовым и клеточным тропизмом – заражают только человека и шимпанзе и эффективно реплицируются только в гепатоцитах. С момента публикации данной работы было получено несколько подтверждений того, что выявленные нами в 2000 году высококонсервативные участки действительно ответственны за взаимодействие с рецепторами ВГС либо за слияние мембраны вируса и эндосомы клетки-хозяина [57-60]. Позднее, в 2007 г., было проанализировано большее количество полноразмерных и фрагментарных аминокислотных последовательностей оболочечных белков ВГС, найдены дополнительные высококонсервативные участки, составлена структурно-функциональная карта этих белков [61] (рис. 2).

Логично было использовать данные участки для конструирования вакцины против гепатита С. Однако к 2000 г. данных о функциональной значимости найденных высококонсервативных участков не было; антигенная активность этих участков также была исследована фрагментарно. Поэтому следующими этапами нашей работы были исследование эпитопной специфичности иммунного ответа на оболочечные белки ВГС и картирование участков, ответственных за взаимодействие с одним из корецепторов вируса, гепарансульфатом.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНЫЕ УЧАСТКИ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ ВГС

Исследование специфичности иммунного ответа на высококонсервативные участки оболочечных белков ВГС проводили методом пептидного

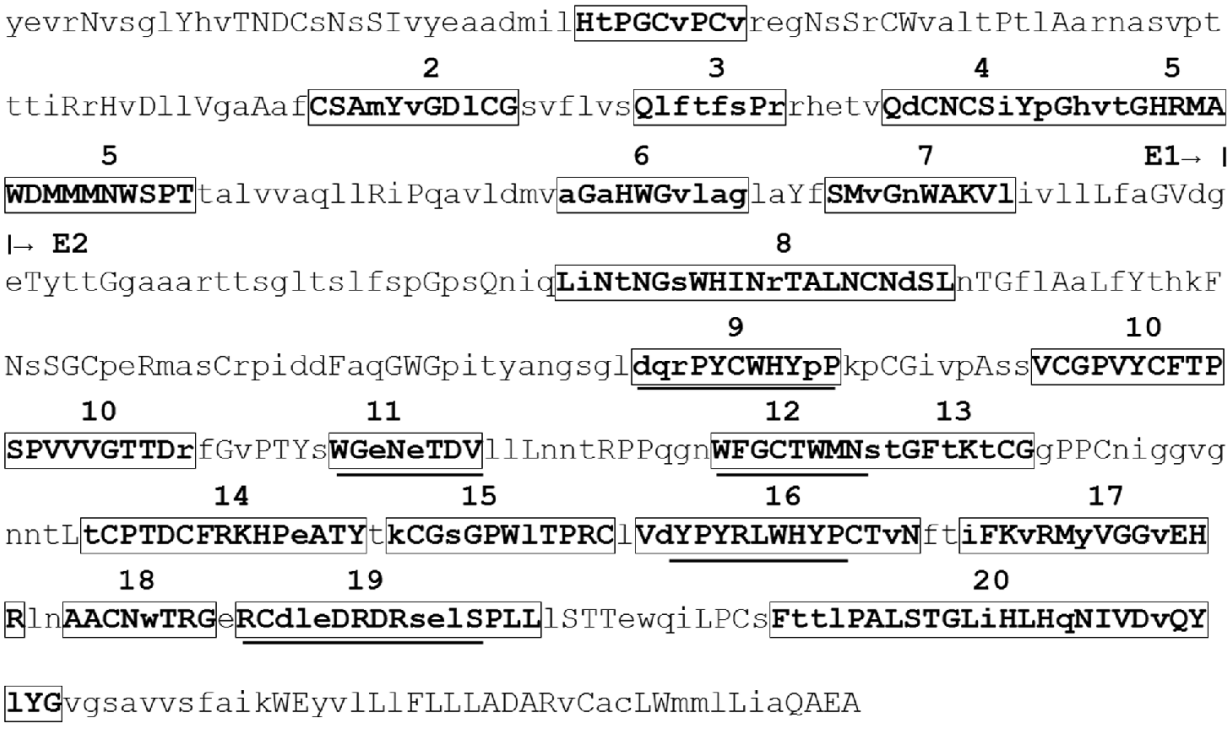

Рисунок 2. Консенсусная аминокислотная последовательность оболочечных белков E1 и E2 ВГС. Заглавными буквами обозначены аминокислотные остатки с частотой встречаемости свыше 95%. Серым цветом отмечены высококонсервативные участки последовательностей, подчеркнуты участки, ответственные за взаимодействие с рецепторами ВГС.

сканирования с использованием биотинилированных пептидов [62]. В этой работе в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С были выявлены антитела, специфично взаимодействующие с некоторыми высококонсервативными участками. Наиболее высокую антигенность проявили консервативные участки №5 в белке Е1 и №20 в белке Е2 (рис. 2), антитела против октапептидных фрагментов из этих участков были обнаружены соответственно в 50% и 33% образцов сывороток крови больных гепатитом С. Антитела, взаимодействующие с октапептидными фрагментами из других консервативных участков, были выявлены в единичных образцах сывороток крови. Недавно, в связи с обнаружением новых высококонсервативных участков в составе оболочечных белков ВГС, описанный выше эксперимент повторили с использованием большего количества пептидных фрагментов и сывороток крови других пациентов с гепатитом С [63]. Новое исследование продемонстрировало антигенную активность практически у всех высококонсервативных участков, однако авидность образующихся против них антител невысока, специфичность антител сильно варьирует от пациента к пациенту, а сам иммунный ответ развивается довольно медленно [63]. Следует, однако, отметить выявленную тенденцию к увеличению разнообразия специфичностей антител против консервативных участков оболочечных белков ВГС у больных хроническим гепатитом С с низким уровнем виремии или даже её отсутствием по сравнению с пациентами с высоким уровнем виремии. По-видимому, наличие антител против высококонсервативных участков ВГС вносит вклад в негативную регуляцию виремии, но из-за медленного развития иммунного ответа и низкой концентрации, а также сохранения популяции вируса в клетках и прямой его передачи через межклеточные контакты [64] эти антитела не способны обеспечить полную элиминацию вируса. Медленное развитие иммунного ответа связано с тем, что ВГС весьма медленно реплицируется в инфицированных клетках и не обладает цитопатичностью [65]; поступление в кровь больших количеств вирусных частиц, что приводило бы к формированию эффективного антитело-опосредованного ответа иммунной системы, является редким событием. Следует отметить, что интенсивность антитело-опосредованного иммунного ответа при принудительной иммунизации препаратом оболочечного белка Е2 достаточно высока и у кроликов и мышей [66], и у шимпанзе [35, 42]; однако титры антител против высококонсервативных областей и в этом случае невелики [66]. Таким образом, иммуноген для вакцины необходимо было сконструировать так, чтобы обеспечить эффективное формирование иммунного ответа, включая иммунологическую память, на высококонсервативные участки оболочечных белков ВГС, ответственные за взаимодействие с компонентами клетки-хозяина.

4. КАРТИРОВАНИЕ УЧАСТКОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ ВГС, СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С ГЕПАРАНСУЛЬФАТАМИ

В конце 1990-х – начале 2000-х годов в ряде работ появились первые сведения о рецепторах ВГС на мембранах инфицируемых клеток (см. обзор [9]). Это позволило начать картирование участков оболочечных белков вируса, ответственных за проникновение его в клетку. Нас заинтересовали сайты связывания оболочечных белков ВГС с гепарансульфатами мембран гепатоцитов. Во-первых, гепарансульфаты гепатоцитов сильно сульфатированы в своих дистальных, удалённых от поверхности мембраны клетки, участках, что отличает их от гепарансульфатов других типов клеток и делает специфичным рецептором, обеспечивающим тропизм ВГС к клеткам печени [67]. Учитывая этот факт, гепарин вполне может служить экспериментальной моделью гепарансульфатов гепатоцитов. Во-вторых, в аминокислотных последовательностях оболочечных белков ВГС не выявлялись общепринятые структурные мотивы гепарансульфат-связывающих участков.

Для выявления гепарансульфат-связывающих участков в составе высококонсервативных фрагментов оболочечных белков ВГС нами было использовано пептидное сканирование со специально разработанным методом детекции взаимодействия биотинилированных пептидов с ковалентно связанными с подложкой гепарином или гепарансульфатом с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой. Были найдены три основных участка взаимодействия с гепарансульфатами в белке Е2 ВГС: высококонсервативные участки №№ 9, 16 и 19 (рис. 2). Гепарин-связывающая активность этих фрагментов была такой же, как и известных из литературы гепарин-связывающих фрагментов других белков: фибронектина, аполипопротеина Е, тромбоспондина и белка кальциевых каналов L-типа [68].

Выявленные участки связывания оболочечного белка Е2 с гепарансульфатами были далее использованы в конструировании пептидных антигенов для синтетической пептидной вакцины против гепатита С.

5. КОНСТРУИРОВАНИЕ И СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА С

Низкая интенсивность, медленное формирование и быстрое угасание иммунного ответа на высококонсервативные фрагменты в составе целых оболочечных белков ВГС могут быть вызваны следующими причинами: (а) расположением рядом с иммунодоминантными В-эпитопами с вариабельной первичной структурой или имеющими конформационную природу; (б) неоптимальной локализацией относительно Т-хелперных эпитопов с широкой специфичностью в отношении главного комплекса гистосовместимости II класса (MHC II); (в) кратковременной доступностью для взаимодействия

с иммуноглобулинами и рецепторами В-лимфоцитов, что характерно, в частности, для пептидов слияния вирусов (фрагментов оболочечных белков, ответственных за слияние мембраны вируса с мембраной эндосомы клетки-хозяина). Задача состояла в получении такой антигенной конструкции, в которой высококонсервативные участки оболочечного белка ВГС, выбранные в качестве В-эпитопов, оптимальным образом презентировались бы иммунной системе (В- и Т-хелперным лимфоцитам), что обеспечивало бы формирование интенсивного и длительного антитело-опосредованного иммунного ответа. Для решения такой задачи предполагаемые В-эпитопы соединяют в единую конструкцию с известными Т-хелперными эпитопами с широкой специфичностью в отношении аллельных вариантов MHC II (например, с Т-хелперным эпитопом из столбнячного токсина) [39, 69]. Однако, путём анализа аминокислотных последовательностей оболочечных белков ВГС с помощью программного продукта SYFPEITHI, позволяющего проводить поиск мотивов Т-эпитопов в первичных структурах белков [70], в составе белка Е2 были выявлены два высококонсервативных участка, содержащие каждый набор Т-хелперных эпитопных мотивов с разнообразной специфичностью в отношении аллельных вариантов MHC II, а также несколько участков с меньшим разнообразием мотивов Т-хелперных эпитопов. Таким образом, появилась возможность составить антигенные конструкции только из фрагментов оболочечного белка Е2 ВГС, что позволило бы активировать ВГС-специфичный как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ. Нами были составлены несколько таких антигенных конструкций длиной от 30 до 40 аминокислотных остатков; каждая состояла из двух высококонсервативных фрагментов оболочечного белка ВГС, соединенных гибким линкером. Такие конструкции можно получать методом твёрдофазного пептидного синтеза с последующей очисткой ВЭЖХ.

Конструкции были синтезированы с использованием 9-флуоренил(метоксикарбонил)(Fmoc)-защищённых производных аминокислот в виде ацетилированных по N-концевой аминогруппе и амидированных по С-концевой карбоксильной группе пептидов. Все конструкции содержали склонные к межмолекулярной агрегации фрагменты последовательности, что потребовало применения более эффективных, чем при стандартном автоматическом пептидном синтезе, реагентов для удаления защитных Fmoc-групп и активации присоединяемых аминокислот [71]. Часть конструкций содержала остатки цистеинов, которые в составе оболочечных белков образуют S-S-мостики, что потребовало дополнительной стадии окисления пептидов для их формирования. А в четырёх конструкциях, содержавших два S-S-мостика, были использованы два вида удаляемых в разных условиях защитных групп для SH-групп цистеинов. После снятия с носителя пептидные конструкции были очищены с помощью ВЭЖХ на обращённой фазе до степени чистоты не ниже 80%.

6. ПРОВЕРКА ИММУНОГЕННОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ И СПОСОБНОСТИ ВЫЗЫВАТЬ АНТИ-ВГС АНТИТЕЛА

Иммуногенность сконструированных и полученных химическим синтезом оригинальных пептидных конструкций проверяли на лабораторных животных – мышах и крысах. Мышам препараты пептидных конструкций вводили внутрибрюшинно, крысам – подкожно. Препараты содержали либо только одни пептиды в физиологическом растворе, либо пептиды в водном растворе, смешанном с адъювантом Фрейнда (полным или неполным). В таблице 1 представлены результаты исследования иммуногенности антигенных пептидных конструкций на лабораторных животных. Практически все пептидные конструкции проявляли иммуногенность в присутствии адъюванта [72, 73]. Иммуногенность без адъюванта проявила одна конструкция в опытах на мышах, возможно, из-за использования внутрибрюшинного пути введения, как одного из наиболее эффективных при вакцинации. Однако антитела, взаимодействующие с оболочечными белками ВГС, удалось получить только при иммунизации с адъювантом, причём наилучший результат был достигнут при введении смеси конструкций, что обеспечило формирование более широкого репертуара специфичностей антител. Как показало линейное В-эпитопное картирование образовавшихся против конструкций антител, В-эпитопную активность во всех случаях проявили оба входящих в каждую конструкцию высококонсервативных фрагмента белка Е2.

Таблица 1. Титры антител в сыворотках крови крыс и мышей после введения синтетических антигенных конструкций.

№	Пептид	Титры антител		
		к пептиду	к белку Е2	к димеру Е1Е2
1(к)	№10-GG-№14	1:32000	1:50-1:100	1:50-1:100
2(к)	№14-GG -№10	1:8100	1:50-1:100	1:50-1:100
3(к)	№10-GG-№9	1:9200	1:50	1:50
4(к)	№9-GG-№10	1:900	1:50	1:50
5(м)	№10-GG-№19	1:64000	1:200	1:150
6(м)	№10-GG-№19 без адъюв.	1:2000	-	-
7(к)	№10-GG-№19	1:2700	1:50	1:50
8(к)	№19-GG-№10	1:5600	1:50	1:50
9(к)	Смесь пептидов №№1-4,7,8	1:30000-1:1900	1:150	1:100

Примечание: (к) - иммунизация крыс, (м) - иммунизация мышей. -GG- - диглициновый линкерный участок.

Полученные в ответ на введение синтетических пептидных антигенных конструкций антитела были проверены на способность связывать частицы вируса гепатита С из плазмы крови больных. Связывавшийся антителами вирус детектировали с помощью определения вирусной РНК методом ПЦР после обратной транскрипции. Продукты ПЦР-анализа выявляли методом электрофореза в агарозном геле либо количественным методом ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов (ПЦР "в реальном времени"). На рисунке 3 показано выявление связавшегося с антителами против соответствующих пептидных конструкций ВГС из плазмы крови больного гепатитом С с подтверждённой виремией. Видно, что конструкции 1-4, а также смесь всех 6 конструкций, использовавшихся для иммунизации крыс, вызывают образование антител, эффективно связывающих ВГС. Количественный ПЦР-анализ подтвердил наибольшую эффективность связывания ВГС из плазмы крови пяти больных гепатитом С антителами, полученными в ответ на иммунизацию смесью синтетических пептидных антигенных конструкций [74]. Таким образом, данные пептидные конструкции были взяты за основу при разработке препарата вакцины против гепатита С.

7. СРАВНЕНИЕ РАЗРАБАТЫВАЕМОЙ В ИБМХ ВАКЦИНЫ С ДРУГИМИ ПРЕПАРАТАМИ КАНДИДАТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГЕПАТИТА С

Разработку вакцины против гепатита С первой начала компания Chiron (в настоящее время – подразделение Novartis), сотрудники которой обнаружили вирус гепатита С, выделили его генетический материал и секвенировали геном [34]. Однако по прошествии уже свыше 20 лет вакцины пока ещё нет. Попытки разработать вакцину против гепатита С предпринимали и другие компании, и работа в этом направлении продолжается с использованием различных подходов. В таблице 2 суммированы данные об основных разрабатываемых вакцинах против гепатита С. Возможно, эта таблица неполная, так как не все коммерческие компании открыто сообщают о проведении ими исследований в области разработки вакцины против гепатита С, особенно на начальных стадиях, когда разрабатываются идеи.

Как следует из таблицы 2, работа по созданию средств вакцинопрофилактики и вакцинотерапии гепатита С ведётся в следующих направлениях: 1) рекомбинантные вакцины, содержащие рекомбинантные белки вируса либо их слитые фрагменты [75-79], а также системы их доставки, которыми могут быть липопротеиновые вирусоподобные частицы, например, виросомы, а также сапонин-содержащие мицеллы [78-80]; 2) ДНК-вакцины – плазмиды, несущие один или несколько генов белков ВГС, вместе с системой доставки этих генов, которой может быть другой аттенуированный вирус, например, вирус осповакцины или аденовирус [5-7, 81, 82]; 3) пептидные вакцины – полученные химическим синтезом Т-эпитопы консервативной структуры из белков ВГС, снабженные системой доставки и стимуляции иммунного ответа [83-85]. Первый тип направлен на формирование гуморального протективного ответа против ВГС, второй – на формирование и гуморального, и цитотоксического ответа. Ответ на третий тип вакцин зависит от типа использованных эпитопов.

Следует отметить, что генно-инженерные вакцины, разработанные на основе целых оболочечных белков ВГС и вирусоподобных частиц, показывают свою эффективность только против тех генетических вариантов ВГС, которые использовались для выделения соответствующих генов, или против близкородственных им вариантов, но не защищают организм от других вариантов вируса. ДНК-вакцины и пептидные Т-эпитопные

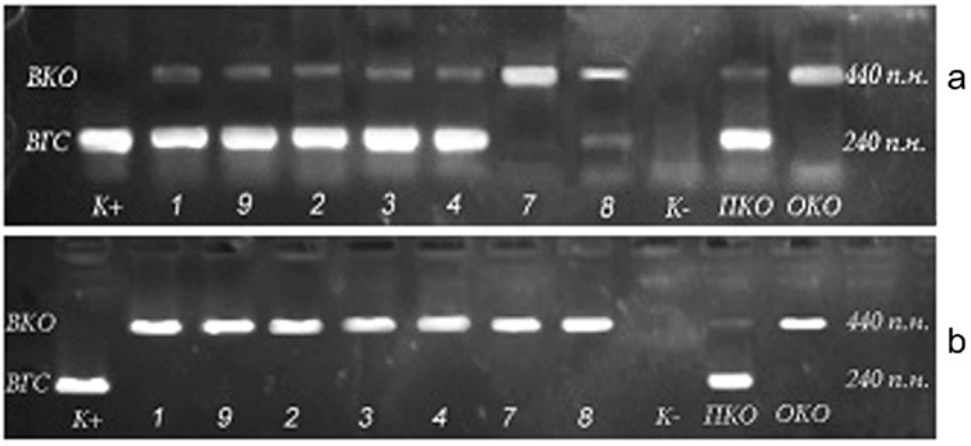

Рисунок 3. Связывание ВГС с антителами против синтетических пептидных антигенов (а), состоящих из высококонсервативных фрагментов оболочечного белка Е2, детекция методом ПЦР. Номера внизу рисунка соответствуют номерам пептидных антигенов (см. табл. 1). (б) - эксперимент с иммуноглобулинами из преиммунных сывороток крови. K+ и K- - положительная и отрицательная контрольные пробы; ПКО и ОКО - положительный и отрицательный контроли; ВКО - внутренний контроль опыта; ВГС - ПЦР-продукт генома ВГС.

Таблица 2. Кандидатные вакцины против гепатита С, разрабатываемые за рубежом.

Иммуноген	Клиническая цель	Разработчик	Эффекты	Стадия клинических испытаний
Слитый рекомбинантный белок E1E2 с адъювантом MF59	Профилактика	Нац. институты здоровья США	Вызывает образование нейтрализующих изолят-специфичных антител у шимпанзе	Фаза 1
ДНК, кодирующая структурные белки ВГС, в модиф. аденовирусе или вирусе осповакцины	Профилактика	Chiron/Novartis; Okairos	Индукция гуморального и клеточного иммунного ответа, защита от персистирования ВГС шимпанзе	Фаза 1b
E1 с адъювантом alum	Терапия	Innogenetics	Индуцирует гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ у людей, но не уменьшает степень поражения печени у больных с ХГС	Прекращены после фазы 1b
Рекомбинантный кор-белок в ISCOMATRIX	Терапия	Chiron/Novartis и CSL	Вызывает Т-клеточный ответ у макак и шимпанзе	Фаза 1
Кор+ липиды+ДНК ВГС субтипа 1b (гены кор- и оболоч. белков)	Терапия	Куба	Индуцирует гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ у людей, у 50% больных содержание РНК ВГС снижается	Фаза 1b
ДНК Chronvac-C (кодирующая слитые Т-эпитопы неструктурных белков ВГС)	Терапия	Tripep и Inovio	Нет данных	Фаза 1
Модиф. вирус осповакцины или аденовирус, экспрессирующий NS3, NS4, NS5	Профилактика	Transgene, Okairos	Индуцирует Т-клеточный иммунный ответ у мышей	Фаза 1
Т-эпитопы ВГС в виросомах гриппа	Терапия	Pevion Biotech	Вызывают Th- и CTL-иммунный ответ у мышей	Фаза 1
Пептиды (Т-эпитопы) кор, NS3, NS4 с поли-Arg и Монтанидом MF59 (IC41)	Терапия	Intercell	Индуцирует Т-клеточный ответ у ВГС-инфицированных лиц с HLA-A2, улучшает состояние 30% больных. Элиминации ВГС нет	Фаза 2

вакцины требуют специальных механизмов доставки вакцинных конструкций к клеткам иммунной системы; кроме того, до настоящего времени нет доказательств невозможности включения вводимого в составе вакцины генетического материала в геном человека. Следует отметить, что разработанная в Европейском Союзе Т-эпитопная вакцина против гепатита С не приводит к элиминации вируса, а лишь снижает вирусную нагрузку у части инфицированных пациентов и улучшает общее состояние больных. Пассивная иммунизация обеспечивает лишь кратковременную защиту организма (от нескольких недель до нескольких месяцев) и также не решает проблемы профилактики инфекционного заражения вирусом.

Одним из перспективных вариантов является создание вакцин на основе синтетических пептидов, аминокислотная последовательность которых соответствует высококонсервативным участкам белков ВГС. Преимущества пептидных вакцин по сравнению с традиционными на основе живых или убитых патогенов, субъединичных, а также рекомбинантных вакцин [86, 87] заключаются в следующем: 1) относительно недорогие и безопасные технологии производства; 2) высокая степень стандартизации препаратов антигенов, получаемых путём химического синтеза; 3) формирование иммунного ответа на те элементы структуры белка-антигена, которые в составе целой молекулы антигена обладают слабой иммуногенностью; 4) отсутствие компонентов, обладающих высокой реактогенностью (липополисахаридов, токсинов); 5) возможность исключения фрагментов антигена, обладающих аллергенностью и перекрестной иммунореактивностью с собственными молекулами вакцинируемого организма; 6) возможность присоединения к носителю нескольких разных пептидов из различных антигенов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая особенности распределения субтипов ВГС в России и в странах Западной Европы, Америки, где идут разработки вакцин против гепатита С, следует отметить, что вакцины против гепатита С, созданные в других странах, могут в России демонстрировать низкую протективность из-за различий в структуре вирусных антигенов, циркулирующих в России, с одной стороны, и использованных в вакцине, с другой. Разработка российской вакцины против гепатита С базируется на нескольких высококонсервативных участках белков ВГС, чтобы эта вакцина могла вызвать широкоспецифичный иммунный ответ на различные изоляты ВГС и обеспечить изолят-неспецифичную защиту от инфекции.

Однако разработка только антигена или нескольких антигенов – только начало создания вакцины. Для обеспечения эффективного иммунного ответа на ВГС и формирования иммунологической памяти крайне важно выбрать соответствующий адъювант, дозу антигена, путь и схему введения. Следующими задачами, решаемыми в настоящее время, являются разработка препарата вакцины и технологии его производства, проведение доклинических и клинических испытаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pawlotzky J.-M.* (2013) Curr. Top. Microbiol. Immunol. **369**, 321-342.
2. *Tran T.T.* (2012) Am. J. Man. Care, **18(14 Suppl)**, S340-S349.
3. *Schneider M.D., Sarrazin C.* (2014) Antiviral Res., **105**, 64-71.
4. *Poveda E., Wyles D.L., Mena A., Pedreira J.D., Castro-Iglesias A., Cachay E.* (2014) Antiviral Res., **108**, 181-191.
5. *Swadling L., Klenerman P., Barnes E.* (2013) Exp. Opin. Biol. Ther., **13**, 1109-1124.
6. *Feinstone S.M., Hu D.J., Major M.E.* (2012) Clin. Infect. Dis., **55(S1)**, S25-S32.
7. *Liang T.J.* (2013). Nat. Med., **19**, 869-878.
8. *Zeisel M.B., Felmlee D.J., Baumert T.F.* (2013) Curr. Top. Microbiol. Immunol., **369**, 87-112.
9. *Фарафонова Т.Е., Оленина Л.В., Колесанова Е.Ф.* (2008) Биомед. химия, **54**, 184-191.
10. *Heo T.-H., Chang J.-H., Lee J.-W., Foung S.K.H., Dubuisson J., Kang C.-Y.* (2004) J. Immunol., **173**, 446-455.
11. *Nikolaeva L.I., Olenina L.V., Kolesanova E.F.* (1999) Russ. J. Immunol., **4**, 91-112.
12. *Kolykhalov A.A., Agapov E.V., Blight K.J., Mihalik K., Feinstone S.M., Rice C.M.* (1997) Science, **277**, 570-574.
13. *Bukh J.* (2012) Gastroenterology, **142**, 1279-1287.
14. *Verstrepen B.E., Boonstra A., Koopman G.* (2015) World J. Hepatol. **7**, 53-69.
15. *Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A., Rice C.M.* (2005) Science, **309**, 623-626.
16. *Keck Z.Y., Xia J., Cai Z., Li T.K., Owsianka A.M., Patel A.H., Luo G., Foung S.K.* (2007) J.Virol., **81**, 1043-1047.
17. *Lavie M., Sarrazin S., Montserret R., Descamps V., Baumert T.F., Duverlie G., Seron K., Penin F., Dubuisson J.* (2014) J. Virol., **88**, 10584-10597.
18. *Chen M., Sällberg M., Sönnerborg A., Weiland O., Mattsson L., Jin L., Birkett A., Peterson D., Milich D.R.* (1999) Gastroenterology, **116**, 135-143.
19. *Maruyama T., Schödel F., Iino S., Koike K., Yasuda K., Peterson D., Milich D.R.* (1994) Gastroenterology, **106**, 1006-1015.
20. *Netski D.M., Mosbruger 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.
21. *Prince A.M., Brotman B., Lee D.H., Ren L., Moore B.S., Scheffel J.W.* (1999) J. Infect. Dis., **180**, 987-991.
22. *McAllister J., Casino C., Davidson F., Power J., Lawlor E., Yap P.L., Simmonds P., Smith D.B.* (1998) J. Virol., **72**, 4893-4905.
23. *Ogata N., Alter H.J., Miller R.H., Purcell R.H.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 3392-3396.
24. *Rispeter K., Lu M., Behrens S.E., Fumiko C., Yoshida T., Roggendorf M.* (2000) Virus Genes, **21**, 179-188.
25. *Farci P., Bukh J., Purcell R.H.* (1997) Springer Semin. Immunopathol., **19**, 5-26.
26. *Van Doorn L.J., Capriles I., Maertens G., DeLeys R., Murray K., Kos T., Schellekens H., Quint W.* (1995) J. Virol., **69**, 773-778.
27. *Chang K.-M., Rehermann B., McHutchison J., Pasquinelli C., Southwood S., Sette A., Chisari F.V.* (1997) J. Clin. Invest., **100**, 2376-2385.
28. *Forns X., Purcell R.H., Bukh J.* (1999) Tr. Microbiol., **7**, 402-410.
29. *Farci P., Alter H.J., Govindarajan S., Wong D.C., Engle R., Lesniewski R.R. Mushahwar I.K., Desai S.M., Miller R.H., Ogata N.* (1992) Science, **258**, 135-140.
30. *Lai M.E., Mazzoleni A.P., Argiolu F., De Virgilis S., Balestrieri A., Purcell R.H.* (1994) Lancet, **343**, 388-390.
31. *Vizmanos J.L., Gonzalez-Navarro C.J., Novo F.J., Civeira M.P., Prieto J., Gullon A., Garcia-Delgado M.* (1998) J. Viral Hepat., **5**, 227-240.
32. *Sobolev B.N., Poroikov V.V., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Archakov A.I.* (2000) J. Viral Hepat., **7**, 368-374.
33. *Seeff L., Hoofnagle J.H.* (2002) Clinics in Liver Disease, №7, 261-287.
34. *Choo Q.L., Kuo G., Ralston R., Weiner A., Chien D., Van Nest G., Han J., Berger K., Thudium K., Kuo C. et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 1294-1298.
35. *Farci P., Alter H.J., Wong D.C., Miller R.H., Govindarajan S., Engle R., Shapiro M., Purcell R.H.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 7792-7796.
36. *Thimme R., Oldach D., Chang K.M., Steiger C., Ray S.C., Chisari F.V.* (2001) J. Exp. Med., **194**, 1395-1406.
37. *Takaki A.M., Wiese M., Maertens G., Depla E., Seifert U., Liebetrau A., Miller J.L., Manns M.P., Rehermann B.* (2000) Nat. Med., **6**, 578-582.
38. *Rappuoli R.* (2001) Vaccine, **19**, 2688-2691.
39. *Соболев Б.Н., Поройков В.В., Оленина Л.В., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И.* (2003) Биомед. химия, **49**, 309-332.
40. *Flint M., McKeating J.A.* (2000) Rev. Med. Virol., No.10, 101-117.
41. *Zibert A., Schreier E., Roggendorf M.* (1995) Virology, **208**, 653-661.
42. *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.
43. *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.
44. *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.
45. *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.
46. *Keck Z.Y., Op de Beeck A., Hadlock K.G., Xia J., Li T.-K., Dubuisson J., Foung S.K.H.* (2004) J. Virol., **78**, 9224-9232.
47. *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.
48. *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.

49. *Eren R., Landstein D., Terkieltaub D., Nussbaum O., Zauberman A., Ben-Porath J., Gopher J., Buchnick R., Kovjazin R., Rosenthal-Galili Z. et al.* (2006) J. Virol., **80**, 2654-2664.
50. *Wang Y., Keck Z.-Y., Foung S.K.H.* (2011) Viruses, **3**, 2127-2145.
51. *Vanwolleghem T., Bukh J., Meuleman P., Desombere I., Meunier J.C., Alter H., Purcell R.H., Leroux-Roels G.* (2008) Hepatology, **47**, 1846-1855.
52. *Wahid A., Dubuisson J.* (2013) J.Viral Hepat., **20**, 369-376.
53. *von Hahn T., Yoon J.C., Alter H., Rice C.M., Rehermann B., Balfe P., McKeating M.A.* (2007) Gastroenterology, **132**, 667-678.
54. *Di Lorenzo C., Angus A.G.N., Patel A.H.* (2011) Viruses, **3**, 2280-2300.
55. *Соболев Б.Н., Поройков В.В., Оленина Л.В., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И.* (2002) Биофизика, **47**, 204-210.
56. *Sobolev B.N., Kolesanova E.F., Olenina L.V., Kuraeva T.E., Rudik A.V., Poroikov V.V., Archakov A.I.* (2005) Peptides – Bridges between Disciplines. Proceedings of the 3rd International Peptide Symposium, pp. 21-22. ISBN: 965-090833-0-0.
57. *Owsianka A., Timms J.M., Tarr A.W., Juttla V.S., Lavillette D., Bartosch B., Cosset F.-L., Ball J.K., Patel A.H.* (2006) J. Virol., **80**, 8695-8704.
58. *Rothwangl K.B., Manicassamy B., Uprichard S.L., Rong L.* (2008) Virol. J., **5**, 46.
59. *Krey T., d'Alayer J., Kikuti C.M., Saulnier A., Damier-Piolle L., Petitpas I., Johansson D.X., Tawar R.G., Baron B., Robert B., England P., Persson M.A.A., Martin A., Rey F.A.* (2010) PLoS Pathog., **6**, e1000762.
60. *Lavie M., Sarrazin S., Montserret R., Descamps V., Baumert T.F., Duverlie G., Séron K., Penin F., Dubuisson J.* (2014) J. Virol., **88**, 10584-10597.
61. *Фарафонова Т.Е.* (2007) Структурно-функциональная и антигенная характеристика высококонсервативных фрагментов оболочечных белков Е1 и Е2 вируса гепатита С. Дисс. канд. наук. ГУ НИИ БМХ РАМН, Москва.
62. *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.
63. *Egorova E.A., Funikov S.Yu., Khropova I.V., Kolesanova E.F.* (2015) Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium (Naydenova E., Pajpanova T., eds.), European Peptide Society. In press.
64. *Timpe J.M., Stamataki Z., Jennings A., Hu K., Farquhar M.J., Harris H.J., Schwarz A., Desombere I., Roels G.L., Balfe P., McKeating J.A.* (2008) Hepatology, **47**, 17-24.
65. *Clarke B.* (1997) J. Gen. Virol., **78**, 2397-2410.
66. *Кузьмина Т.И., Оленина Л.В., Санжаков М.А., Фарафонова Т.Е., Абрамихина Т.В., Дюбюиссон Ж.., Соболев Б.Н., Колесанова Е.Ф.* (2009) Биомед. химия, **55**, 32-40.
67. *Lyon M., Deakin J.A., Gallagher J.T.* (1994) J. Biol. Chem., **269**, 208-215.
68. *Olenina L.V., Kuzmina T.I., Sobolev B.N., Kuraeva T.E., Kolesanova E.F., Archakov A.I.* (2005) J. Viral Hepat., **12**, 584-593.
69. *Sobolev B.N., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Poroikov V.V., Archakov A.I.* (2005) Curr. Comp.-Aid. Drug Des., **1**, 207-222.
70. *Schuler M.M., Nastke M.D., Stevanović S.* (2007) Methods Mol. Biol., **409**, 75-93.
71. *Kolesanova E.F., Sanzhakov M.A., Kharybin O.N.* (2013) Int. J. Pept., **2013**, Article ID 197317, 9 pp.
72. *Kolesanova E.F., Farafonova T.E., Moisa A.A., Aleshina E.Yu., Pyndyk N.V., Sobolev B.N., Archakov A.I.* (2010) Peptide Science 2010. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium, p. 33. ISBN 978-4-931541-11-5.
73. *Kolesanova E., Moisa A.A., Pyndyk N., Prozorovsky V., Funikov S., Thomas X., Dubuisson J., Dadayan A., Zolotarev Yu.* (2012) Peptides 2012. Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium, pp. 90-91. ISBN: 978-960-466-121-3.
74. *Ray R., Meyer K., Banerjee A., Basu A., Coates S., Abrignani S., Houghton M., Frey S.E., Belshe R.B.* (2010) J. Infect. Dis., **202**, 862-866.
75. *Verstrepen B.E., Depla E., Rollier C.S., Mares G., Drexhage J.A.R., Priem S., Verschoor E.J., Koopman G., Granier C., Dreux M., Cosset F.L., Maertens G., Heeney J.L.* (2011) J. Infect. Dis., **204,** 837-844.
76. *Law J.L.M., Chen C., Wong J., Hockman D., Santer D.M., Frey S.E., Belshe R.B., Wakita T., Bukh J., Jones C.T., Rice C.M., Abrignani S., Tyrrell D.L., Houghton M.* (2013) PLoS ONE, **8**, 59776.
77. *Alvarez-Lajonchere L., Shoukry N.H., Gra B., Amador-Canizares Y., Helle F., Bedard N., Guerra I., Drouin C., Dubuisson J., Gonzalez-Horta E.E., Martinez G., Marante J., Cinza Z., Castellanos M., Dueñas-Carrera S.* (2009) J. Viral Hepat., **16**, 156-167.
78. *Drane D., Maraskovsky E., Gibson R., Mitchell S., Barnden M., Moskwa A., Shaw D., Gervase B., Coates S., Houghton M., Basser R.* (2009) Human Vacc., **5**, 151-157.
79. *Мойса А.А.* (2011) Иммуногенные конструкции на основе фрагментов оболочечного белка Е2 вируса гепатита С. Дисс. канд. наук. ГУ НИИ БМХ РАМН, Москва.
80. *Amacker M., Engler O., Kammer A.R., Vadrucci S., Oberholzer D., Cerny A., Zurbriggen R.* (2005) Int. Immunol., **17**, 695-704.
81. *Fournillier A., Gerossier E., Evlashev A., Schmitt D., Simon B., Chatel L., Martin P., Silvestre N., Balloul J.M., Inchauspe G.* (2007) Vaccine, **25**, 7339-7353.
82. *Gal-Tanamy M., Walker C., Foung S., Lemon S.M.* (2009). Vaccines for Biodefence and Emerging and Neglected Diseases (Barrett A.T., Stanberry L.R., eds.). Academic Press, London-Amsterdam-Burlington-San Diego, pp. 413-440, ISBN 978-0-3-69408-9.
83. *Firbas C., Jilma B., Tauber E., Buerger V., Jelovcan S., Lingnau K., Buschle M., Frisch J., Klade C.S.* (2006) Vaccine, **24**, 4343-4353.
84. *Klade C.S., Wedemeyer H., Berg, T., Hinrichsen H., Cholewinska G, Zeuzem S., Blum H., Buschle M., Jelovcan S., Buerger V., Tauber E., Frisch J., Manns M.P.* (2008) Gastroenterology, **134**, 1385-1395.
85. *Wedemeyer H., Schuller E., Schlophoff V., Stauber R.E., Wiegand J., Schiefke I., Jilma B., Thursz M., Zeuzem S., Hofmann W.P., Hinrichsen H., Tauber E., Manns M.P., Klade C.S.* (2009) Vaccine, **27**, 5142-5151.
86. *Мойса А.А., Колесанова Е.Ф.* (2011) Биомед. химия, **57**, 14-30.
87. *Moisa A.A., Kolesanova E.F.* (2012) Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario (Roy P.K., ed.). InTech: Rijeka, pp. 201-228.

Поступила: 16. 02. 2015.

WAY TO THE PEPTIDE VACCINE AGAINST HEPATITIS C

E.F. Kolesanova, B.N. Sobolev, A.A. Moysa, E.A. Egorova, A.I. Archakov

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: (499)246-33-75;
e-mail: ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru

In order to surpass the problem of genetic variability of hepatitis C virus envelope proteins during vaccine development, we used the so-called "reverse vaccinology"approach – "from genome to vaccine". Database of HCV protein sequences was designed, viral genome analysis was performed, and several highly conserved sites were revealed in HCV envelope proteins in the framework of this approach. These sites demonstrated low antigenic activity in full-size proteins and HCV virions: antibodies against these sites were not found in all hepatitis C patients. However, two sites, which contained a wide set of potential T-helper epitope motifs, were revealed among these highly conserved ones. We constructed and prepared by solid-phase peptide synthesis several artificial peptide constructs composed of two linker-connected highly conserved HCV envelope E2 protein sites; one of these sites contained a set of T-helper epitope motifs. Experiments on laboratory animals demonstrated that the developed peptide constructs manifested immunogenicity compared with one of protein molecules and were able to raise antibodies, which specifically bound HCV envelope proteins. We succeeded in obtaining antibodies reactive with HCV from hepatitis C patient plasma upon the immunization with some constructs. An original preparation of a peptide vaccine against hepatitis C is under development on the basis of these peptide constructs.

Key words: hepatitis C, vaccine, virus, envelope proteins, antigens, peptides.