

На правах рукописи

Фарафонова Татьяна Евгеньевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И АНТИГЕННАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНЫХ
ФРАГМЕНТОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ E1 И E2 ВИРУСА
ГЕПАТИТА С**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2007

Работа выполнена в Государственном Учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Колесанова Екатерина Федоровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Шумянцева Виктория Васильевна

кандидат биологических наук, доцент
Ильина Елена Николаевна

Ведущая организация: Центр «Биоинженерия» РАН

Защита диссертации состоится «28» июня 2007 года в 12:30 часов на заседании Диссертационного совета Д.001.010.01 при ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

Автореферат разослан « » мая 2007 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Е.А. Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Вирус гепатита С (ВГС) является основной причиной парентерального (трансфузионного) гепатита, ранее называвшегося гепатитом ни А ни В. У большинства инфицированных (80%) гепатит С протекает в хронической форме и может вызывать цирроз и первичный рак печени. В настоящее время вакцина, предотвращающая заражение вирусом гепатита С, не разработана, а лечение α -интерфероном (в комбинации с рибавирином или без него) эффективно только лишь для ~40% больных хроническим гепатитом С и имеет в большинстве случаев серьезные побочные эффекты [Bartenschlager et al., 2000].

Оболочечные белки ВГС играют важную роль на ранних стадиях жизненного цикла вируса. Эти белки отвечают за взаимодействие с рецепторами и участвуют в процессах слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны, сборки вирусной частицы в клетке и высвобождения из клетки. Несмотря на накопленные сведения о свойствах и функциях оболочечных белков и возможных рецепторах для ВГС, механизмы связывания вируса с поверхностью клетки, проникновения вирусной частицы в клетку-хозяина, а также сборки и высвобождения вирусной частицы из клетки все еще не установлены. Имеется крайне мало информации об участках оболочечных белков ВГС, ответственных за эти процессы. По этой причине изучение структуры и функций оболочечных белков ВГС и их фрагментов остается актуальной проблемой.

Особенностью ВГС является чрезвычайно высокая вариабельность его оболочечных белков. Выделяют два гипервариабельных участка оболочечного белка E2 (HVR1 и HVR2), которые являются иммунодоминантными; антитела против них способны нейтрализовать проникновение вируса в клетку. Однако эти антитела специфичны лишь к одному или нескольким квазивидам вируса и не обеспечивают защиту организма от иных генетических вариантов ВГС. Существование эпитопов вируснейтрализующих антител вне гипервариабельных участков подтверждают многочисленные экспериментальные данные [Farci et al., 1996; Shimizu et al., 1994; Mario et al.,

1996; Rodda et al., 1996], однако ни в одной работе структуры таких эпитопов не были определены. По этой причине необходим поиск эпитопов оболочечных белков ВГС вне гипервариабельных участков.

Наибольший интерес представляют участки оболочечных белков, являющиеся консервативными для большинства квазивидов вируса. Такие участки могут быть ответственными за взаимодействие вируса с клеточными рецепторами и проникновение вируса внутрь клетки, и потому могут вызвать выработку вируснейтрализующих антител для различных генетических вариантов ВГС.

Таким образом, структурно-функциональная и антигенная характеристика высококонсервативных фрагментов оболочечных белков ВГС является актуальной задачей. Информация о функционально значимых и антигенно активных фрагментах оболочечных белков ВГС необходима для разработки иммуногенных конструкций, способных вызывать выработку вируснейтрализующих антител.

Цель работы - структурная характеристика функционально значимых участков оболочечных белков ВГС и определение антигенности высококонсервативных участков этих белков в составе искусственных конструкций.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) провести поиск и анализ описанных в литературе функционально значимых участков оболочечных белков и составить структурно-функциональную карту оболочечных белков ВГС;
- 2) выявить высококонсервативные фрагменты оболочечных белков ВГС, способные взаимодействовать с гепарином – предполагаемым рецептором ВГС;
- 3) синтезировать пептиды, соответствующие высококонсервативным участкам оболочечных белков ВГС, и получить пептидные иммуногенные конструкции;
- 4) получить антипептидные антитела и тестировать их на взаимодействие с оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2.

Научная новизна. В работе впервые:

- a. проведен поиск и анализ структурно- и функционально значимых аминокислотных остатков и целых фрагментов оболочечных белков ВГС и составлена структурно-функциональная карта оболочечных белков ВГС;
- b. картированы сайты специфического взаимодействия с гепарином в составе четырех высококонсервативных участков оболочечного белка E2 ВГС;
- c. показана антигенность четырех (CR1, CR4, CR5 и CHR) высококонсервативных фрагментов оболочечных белков ВГС в составе конъюгатов с белками-носителями и одного фрагмента (CR5), конъюгированного с полимером - полиосидонием, получены гипериммунные сыворотки, содержащие антипептидные антитела против этих фрагментов;
- d. показана способность антипептидных антител, специфичных к фрагментам CHR и CR5, взаимодействовать с оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2 ВГС;
- e. получены высокоантигенные синтетические Т-В-эпитопные пептидные конструкции, содержащие в своем составе высококонсервативные фрагменты оболочечного белка E2 ВГС и способные вызывать образование антител, взаимодействующих с полноразмерным оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2 ВГС.

Практическая значимость исследования

Составленная структурно-функциональная карта может быть использована при изучении структурно-функциональных взаимоотношений оболочечных белков ВГС, взаимодействия оболочечных белков с молекулами поверхности клетки, эпитопном картировании, конструировании синтетических вакцинных конструкций. Карта позволяет установить функциональную значимость того или иного фрагмента или аминокислотного остатка (а.к.о.) для жизнедеятельности ВГС, его консервативность, возможные аминокислотные замены в пределах данного фрагмента (позиции), а также функции и консервативность близлежащих а.к.о. или участков оболочечных белков.

Картированные в оболочечных белках ВГС участки взаимодействия с гепарином могут быть использованы для поиска лигандов, блокирующих

взаимодействие вирусной частицы ВГС с клеткой-хозяином, и разработки терапевтических средств против ВГС.

Обладающие антигенностью высококонсервативные фрагменты (ВКФ) оболочечных белков, исследованные в данной работе, могут быть использованы в разработке синтетической пептидной конструкции для кандидатной вакцины против ВГС. Проявление антигенных свойств у фрагмента CR5 в конъюгате с полиоксидонием свидетельствует о возможности применения синтетических фрагментов оболочечного белка ВГС и полиоксидония (в качестве эффективного адъюванта) в разработке вакцины против ВГС.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были доложены на следующих симпозиумах и конференциях: 5-ой научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2001» (Санкт-Петербург, 2001), 6-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2002), 3rd International and 28th European Peptide Symposium «Bridges Between Disciplines» (Prague, 2004), International Conference “Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine” (Moscow, 2004). Апробация диссертации состоялась на межлабораторном семинаре ГУ НИИ БМХ РАМН 5 апреля 2006 года.

Публикации

Материалы диссертационной работы опубликованы в 4 статьях и 6 публикациях сборников докладов научных конференций.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 178 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы, включающего 272 источника, приложения. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 15 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Составлена структурно-функциональная карта оболочечных белков ВГС, которая может быть использована в дальнейшем изучении этих белков.
- 2) ВКФ CR3, CR4, PRR1 и CHR оболочечного белка E2 могут быть ответственными за взаимодействие с гепарином - представителем гликозаминогликанов (ГАГ) – одним из предполагаемых рецепторов ВГС.
- 3) ВКФ в составе синтетических конструкций способны стимулировать образование антител, взаимодействующих с оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды с последовательностями NH₂-CPTDCFRKH-CONH₂ и NH₂-LPALSTGLIHLHQNIVDVQ-CONH₂ были синтезированы в лаборатории химии пептидов Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова) РАН. Конъюгат пептида NH₂-LPALSTGLIHLHQNIVDVQ-CONH₂ с полиоксидонием получен и любезно предоставлен ведущим научным сотрудником ГНЦ РФ Института иммунологии ФМБА С.А. Медведевым. Препараты оболочечных белков E1E2 и E2 любезно предоставлены доктором J. Dubuisson, Институт Биологии, Лилль, Франция.

Программное обеспечение. Профили физико-химических и антигенных свойств оболочечного белка E2 ВГС строили при помощи программного пакета ANTHEPROT 2000 V5.2 (http://antheprot-pbil.ibcp.fr/Documentation_antheprot.html). Т-хелперные эпитопные мотивы выявляли с использованием обновленного программного обеспечения SYFPEITHI (<http://syfpeithi.bmiheidelberg.com/Scripts/MHCServer.dll/-EpitopePrediction.htm>). Обработку данных проводили с помощью программного продукта «Microsoft Excel 2003».

Для иммуноферментного анализа (ИФА) использовали полистирольные 96-луночные планшеты с плоским дном с высокой сорбционной емкостью фирмы «Costar» (США) и типа Covalink фирмы «Nunk» (Дания).

Синтез пептидов проводили твердофазным методом в ручном варианте путем наращивания цепи с С-конца. В качестве носителя использовали насадки для игл типа DKP (емкостью 1 мкмоль) с Lys-Pro-спейсером для синтеза

биотинилированных пептидов и насадки типа D-series Lantern Rink-amide (емкостью 8 мкмоль) фирмы “Mimotopes” (Австралия). В качестве конденсирующего реагента использовали либо диизопропилкарбодиимид в присутствии 1-оксибензотриазола, либо, на некоторых стадиях, соли фосфония или мочевины в присутствии 1-оксибензотриазола и диизопропилэтиламина. Реакции присоединения аминокислот проводили по стандартным протоколам [Atherton and Sheppard, 1989].

Выявление сайтов связывания гепарина в составе ВКФ оболочечных белков ВГС проводили методом пептидного сканирования с лиганд-ферментным анализом с использованием биотинилированных октапептидных, а также более длинных фрагментов ВКФ. Пептиды тестировали на взаимодействие с гепарином, присоединенным к поверхности лунок планшетов «Covalink-NH» с помощью 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимида (КД) и N-гидроксисукцинимидом (NHS). Реакцию проводили в PBST (0,01 М фосфат натрия, 0,8% хлорид натрия, 0,02% хлорид калия, 0,05% Tween 20, pH 7,2-7,4), неспецифическое взаимодействие блокировали добавлением в реакционную смесь 50% (по объему) молока 0,5%-ной жирности. Взаимодействующие с гепарином биотинилированные пептиды детектировали по связыванию их с конъюгатом стрептавидина и пероксидазы и образования окрашенного продукта пероксидазной реакции из косубстрата 2,2'-азино-бис(3-этилбензиазолин-6-сульфоната аммония (ABTS). Оптическую плотность измеряли при длине 405 нм на многоканальном фотометре Multiscan Plus (“Labsystems”, Финляндия).

Конъюгацию пептидов с бычьим сывороточным альбумином (БСА), овальбумином (ОВА) и миоглобином (МГ) проводили с использованием глутарового альдегида (ГА), N-гидроксисукцинимидного эфира 3-малеимидобензойной кислоты (МБС), диметилсуберимидата (ДМС) и КД по стандартным методикам [Van Regenmortel and Muller, 1999]. Электрофорез конъюгатов в полиакриламидном геле проводили по методу Laemmli (1970). Количество остатков пептидов в молекулах конъюгатов определяли методом SELDI-масс-спектрометрии.

Получение сывороток и препаратов иммуноглобулинов класса G (IgG) от иммунизированных животных. Кроликов (типа шиншилла, самцов в возрасте от 4 до 5 месяцев) иммунизировали путем 4х-кратного подкожного введения 0,8 мг конъюгата в смеси с полным (ПАФ) или неполным (НАФ) адъювантом Фрейнда (АФ) с интервалом в 2 недели между инъекциями. Повторный курс иммунизации проводили путем двукратного подкожного введения конъюгата с интервалом в 2 недели: первая иммунизация смесью 1 мг конъюгата в PBS (0,01 М фосфат натрия, 0,8% хлорид натрия, 0,02% хлорид калия, рН 7,2-7,4) с ПАФ, вторая – 0,5 мг конъюгата в PBS с НАФ. Забор крови проводили через две недели после последней иммунизации. Препарат IgG получали из сыворотки крови высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония. Осадок растворяли и диализовали в течение 48 часов против 4 смен раствора 0,15 М NaCl (рН 8,0).

Мышей (белых беспородных самцов в возрасте от 12 до 18 недель) иммунизировали путем 4-кратного внутрибрюшинного введения 20 мкг конъюгата или свободного пептида в смеси с ПАФ или НАФ с интервалом в 2 недели между инъекциями. Забор крови проводили методом декапитации через 14 дней после последней иммунизации.

Сыворотку крови кроликов и мышей хранили в виде аликвот при -20°C.

Тестирование сывороток крови и препаратов IgG на наличие специфических антител проводили методом ИФА. Для проведения анализов использовали полистирольные 96-луночные планшеты для ИФА с плоским дном с высокой сорбционной емкостью (“Costar”, США), облученные УФ-светом, и планшеты типа “Covalink-NH” со свободными NH-группами для ковалентного связывания антигенов (“Nunc”, Дания).

Для неспецифической адсорбции антигена в лунки планшета для ИФА вносили по 100 мкл раствора антигена (20мкг/мл) в 0,05М карбонат-бикарбонатном буфере (КББ) (рН 8,4 - 8,5). Инкубировали в течение ночи при комнатной температуре.

Для адсорбции биотинилированных пептидов в лунках планшета для ИФА предварительно сорбировали стрептавидин (“ICN”, США, 1мкг/лунку) из

КББ, затем вносили вносили 100 мкл раствора биотинилированных пептидов (10мкг/мл) в PBST, и после 3-ч инкубации при 37° С промывали 3 раза PBST.

Для ковалентной пришивки антигена за счет аминогруппы пептида NH-группы лунок планшета Covalink-NH модифицировали цианур-хлоридом (в100 мкл раствора (1 мг/мл) в 0,1М Na-фосфатном буфере инкубация 5 мин при комнатной температуре). После отмывки PBS в лунки планшета вносили 100 мкл раствора пептида (25 мг/мл), инкубировали ночь при комнатной температуре и промывали лунки 0,1М Na-фосфатным буфером с добавлением 1% MgSO₄.

Для ковалентного присоединения за счет карбоксильной группы пептида в лунки планшета Covalink-NH вносили 100 мкл смеси, содержащей водный раствор пептида, преинкубированный 5 мин при комнатной температуре с равным объемом раствора КД и NHS в КББ (молярное соотношение КД:NHS:пептид 10:10:1, конечная концентрация пептида 25 мг/мл) и инкубировали ночь при комнатной температуре, далее отмывали PBST.

Для адсорбции оболочечного белка E2 и гетеродимера E1E2 ВГС в лунках планшета для ИФА предварительно сорбировали лектин подснежника (1мкг/лунку), затем вносили раствор препаратов оболочечного белка E2 или гетеродимера E1E2 (9-10 мкг/лунку) в PBST, неспецифическое взаимодействие блокировали добавлением в реакционную смесь 50% (по объему) молока 0,5%-ной жирности.. Планшеты инкубировали 2 ч при температуре 37°С при перемешивании, промывали PBST.

В лунки планшета, сенсibilизированные антигеном, вносили по 150 мкл блокирующего буфера (PBS с 50% (по объему) молока 0,5%-ной жирности) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре при перемешивании. В лунки вносили 100 мкл раствора сыворотки с различным разведением блокирующим буфером с 0,5% Tween 20 и инкубировали 1,5 ч при 37°С при перемешивании. Планшет промывали PBST 3 раза и добавляли конъюгат пероксидазы хрена с антителами козы против IgG кролика или мыши в разведении 1:2000 для антикроличьего и 1:10000 для антимышиного конъюгата в буфере для разведения сывороток, инкубировали 1 час при 37°С, промывали планшет PBST

3 раза. Регистрацию взаимодействия антител с антигенами проводили при помощи цветной реакции, как описано выше. Оптическую плотность при 405 нм измеряли на многоканальном спектрофотометре Spectroscan (“Thermolabsystems”, Финляндия–США).

Концентрацию белка определяли методом Лоури [Lowry et al., 1951].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Структурно-функциональная карта оболочечных белков ВГС.

Структурно-функциональная карта оболочечных белков ВГС была получена путем наложения известных из литературы к началу 2007г и выявленных нами функционально важных участков и а.к.о. на составленную ранее [Sobolev et al., 2000] консенсусную последовательность оболочечных белков ВГС. Данная карта представляет собой таблицу, где каждая строка соответствует одному аминокислотному остатку (а.к.о.) консенсусной последовательности. 1-й столбец таблицы содержит номер позиции а.к.о. в консенсусной последовательности, 2-й столбец - номер позиции а.к.о. в полипротеине ВГС изолята Н77 генотипа 1а (общепринятая международная нумерация и используемая в данной работе, если не указано особо), 3-й столбец - а.к.о., чаще всего встречающийся в данной позиции (доминирующий). В 4-м столбце в соответствующих строках перечислены а.к.о., встречающиеся в данной позиции помимо доминирующего а.к.о. Частота встречаемости каждого а.к.о. показана верхним индексом. А.к.о., встречающиеся менее чем в 5% последовательностей, обозначены строчными буквами. Ячейки, соответствующие позициям с частотой встречаемости доминирующих а.к.о. более 95%, закрашены **темно-серым** цветом. **Светло-серым** цветом закрашены ячейки, соответствующие позициям, в которых а.к.о. заменяется на остаток со сходными физико-химическими свойствами [Henikoff and Henikoff, 1992], и встречаемость этих остатков в сумме составляет 95% и более. В 5-й столбец таблицы в соответствующие строки и группы строк внесены данные о функциональной значимости отдельных а.к.о. и целых фрагментов. В этом столбце также отмечены протяженные высококонсервативные и гипервариабельные фрагменты оболочечных белков ВГС. В таблице 1 показаны

два фрагмента структурно-функциональной карты, соответствующих двум участкам белка E2. Помимо двух известных гипервариабельных фрагментов HVR1 и HVR2, в оболочечных белках ВГС были выявлены еще 5 вариабельных фрагментов (VR – variable region; выделены синим шрифтом). Два из них (VR3 и VR4) расположены в белке E1 (248-258 и 290-303, соответственно), два других (VR5 и VR6) - в белке E2 (570-580 и 706-713) и один в белке p7 (VR7, 765-774).

Данная карта позволяет установить функциональную значимость того или иного фрагмента или а.к.о. для жизнедеятельности ВГС, его консервативность, возможные аминокислотные замены в пределах данного фрагмента (позиции), а также функции и консервативность близлежащих а.к.о. или участков оболочечных белков. Карта является эффективным инструментом при изучении структурно-функциональных свойств оболочечных белков ВГС, взаимодействия оболочечных белков с молекулами поверхности клетки, эпитопном картировании, конструировании синтетических вакцинных конструкций.

Таблица 1. Фрагмент структурно-функциональной карты оболочечного белка E2

№поз. в кон. сен. сусе	В	Аминокислотный остаток (а.к.о.)	Функция а.к.о. и фрагментов полипротеина	
Н77 (1a)	ДОМИНИРУЮЩИЙ	встречающийся в данной позиции помимо доминантного		
419	412	Q ⁸⁶	sntdrhkylea	
420	413	L ⁹⁹	vpsqif	
421	414	V ⁶⁴	mnlkf	
422	415	N ⁹⁵	hgktsriqpd	
423	416	T ⁹²	S ⁵ wiapnkh	
424	417	N ⁹⁸	agedstih	
425	418	G ⁹⁸	apvtsd	сайт гликозилирования, гликозилирование а.к.о. модулирует* проникновение вирусной частицы в клетку, но не влияет на образование гетеродимера E1E2 (Goffard et al., 2005)
426	419	S ⁸⁹	R ⁷ tilngc	а.к.о. важный для взаимодействия с CD81 (Owsianka et al., 2006)
427	420	W ⁹⁷	srllqge	
428	421	H ⁹⁷	eyrnldg	
429	422	I ⁹³	vfltaed	
430	423	N ⁹⁸	dseth	сайт гликозилирования, гликозилирование а.к.о. важно для проникновения вирусной частицы в клетку, но не влияет на образование гетеродимера E1E2 (Goffard et al., 2005)
431	424	R ⁸⁴	S ¹⁴ akwarpnle	
432	425	T ⁹⁷	avsnrmige	
433	426	A ⁹⁵	stqpd	
434	427	L ⁹⁸	nsqvrpm	
435	428	N ⁹⁷	sdpki	
436	429	G ⁹⁸	qeywrf	C ⁶⁴⁴ (Yagnik et al., 2000)
437	430	N ⁹⁵	dsrytmki	
438	431	D ⁷⁵	E ¹¹ A ¹¹ pmqtsn	сайт гликозилирования (Goffard et al., 2005)
439	432	S ⁹⁷	tyrpgn	
440	433	L ⁹⁵	ipfch	
441	434	N ⁵⁰	Q ²² D ⁹ H ⁸ K ⁵ stevrg	
442	435	T ⁹⁸	cnpmia	
443	436	G ⁹⁸	ws	
444	437	F ⁶¹	W ³⁷ lsri	
445	438	L ⁵⁷	I ²⁵ V ¹⁴ fmpqga	
446	439	A ⁹⁶	vthsg	Участок взаимодействия с CD81 (Drummer et al., 2006)
447	440	A ⁴⁸	G ³⁵ S ¹⁶ vpr	
448	441	L ⁹⁹	vp	
449	442	F ⁹²	lismvp	
450	443	Y ⁹⁸	hcfa	
451	444	T ³⁰	A ²² Y ¹⁵ H ¹¹ V ⁸ sfriakln	
452	445	H ⁵⁷	R ¹³ N ¹¹ K ⁷ sytpldc	
453	446	K ³⁸	R ²⁴ N ⁹ S ⁵ yqmge	
454	447	F ⁹⁸	liscy	

Участок, важный для взаимодействия с CD81** (Owsianka et al., 2001)

Участок, важный для взаимодействия с CD81** (Owsianka et al., 2001)

E2	502-521	CR2	V CGPVY C FT P SPV V VG T TD R	86%	-
E2	549-556	PRR2	W FG C T W M N	88%	-
E2	581-590	CR3	C PT D CF R K H P	92%	A28-A30
E2	611-622	CR4	Y P Y RL W H Y P C T V	75%	A31-A35
E2	654-663	CHR	L ED R DR R SELS	49%	A51 ⁵
E2	682-704	CR5	L PAL S T G LI H L H Q N IV D V Q Y L Y G	59%	A36-A50

¹ – первая и последняя позиции указаны в соответствии с полипротеином ВГС изолята H77 генотипа 1a;

² – регионы обозначены в соответствии с Sobolev et al., 2000;

³ – а.к.о., встречающиеся в 95% и более последовательностей, подчеркнуты, положительно заряженные а.к.о закрашены серым цветом;

⁴ – номера перекрывающихся октапептидов, соответствующих ВКФ;

⁵ – пептид A51 содержал 10 а.к.о.

В качестве положительного контроля (С1-С6) использовали пептиды, представляющие собой известные сайты взаимодействия с ГАГ из других белков [Drake et al., 1993; Cardin et al., 1986; Lawler et al., 1991; Knaus et al., 1990].

Результаты тестирования пептидов (рис. 1) показали слабое взаимодействие с гепарином пептида из фрагмента CR3 (A30) и более сильное взаимодействие с гепарином пептидов из участка CR4 (A31-35).

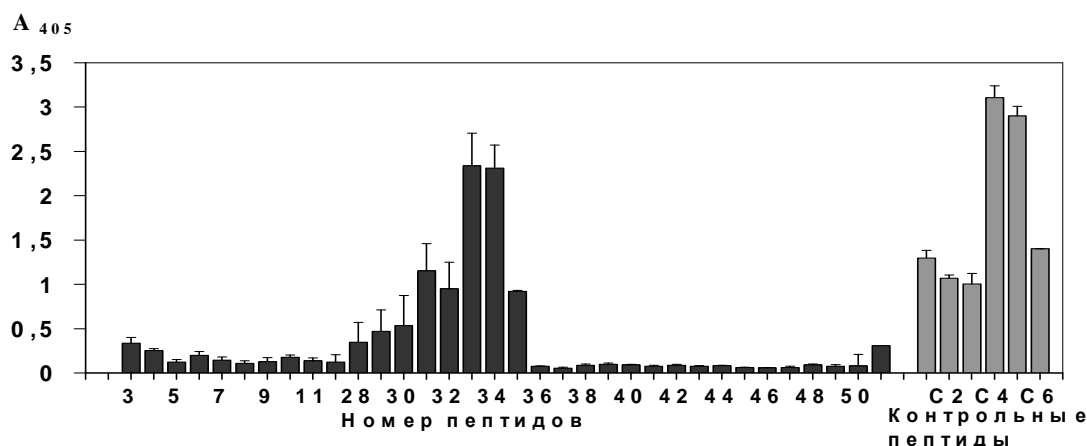


Рис. 1 Взаимодействие пептидов с гепарином

Мы обратили внимание, что участок 610-620 (рис. 2), включающий ВКФ CR4 белка E2, пептиды из которого взаимодействовали с гепарином (выделен жирным шрифтом), имеет сходство с 11-членным фрагментом этого же белка, содержащим участок PRR1 (9 из 11 а.к.о. общие для обоих фрагментов, причем 7 из них (отмечены звездочкой *) располагаются в одинаковой последовательности). Структурно-функциональная карта показала, что фрагменту PRR1 в последовательности белка с N-конца предшествует

положительно заряженный остаток аргинина, который встречается в 84% последовательностей или заменяется в 14% последовательностей на остаток лизина. Это позволило нам предположить, что фрагмент PRR1, более протяженный с N-конца ($^{481}\text{DQRPYCWNYAP}^{490}$), может взаимодействовать с гепарином.



Рис. 2 Гомология фрагментов CR4 и PRR1 белка E2.

Кроме того, участку CHR с N-конца также предшествуют высококонсервативные остатки аргинина (консервативность этих остатков составляет 98-99%), а в целом фрагмент $^{648}\text{RGERCDLEDRDR}^{659}$ характеризуется наличием консервативных гидрофильных а.к.о. Мы предположили, что фрагмент 648-659 также может взаимодействовать с гепарином. Для подтверждения этих предположений были синтезированы три биотинилированных пептида с последовательностями: N1–DYPYRLWHYPC; N2–DQRPYCWNYAP; N3–RGERCDLEDRDR; все они проявили гепарин-связывающую активность, сравнимую с таковой пептидов положительного контроля (рис. 3).

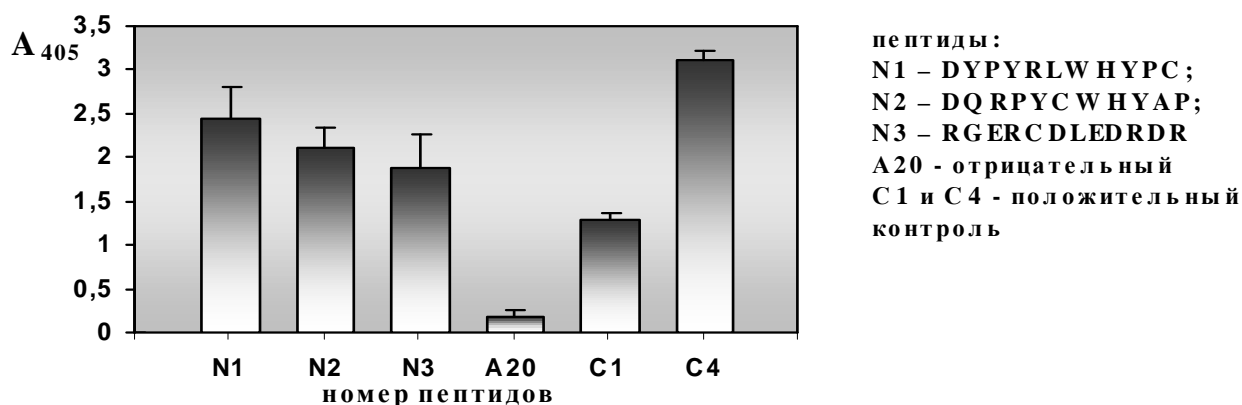


Рис. 3 Взаимодействие пептидов N1, N2 и N3 с гепарином.

Изучение антигенных свойств ВКФ оболочечных белков E1 и E2 ВГС.

Выбор ВКФ и синтез соответствующих им пептидов.

Для изучения антигенности в составе синтетических конструкций были выбраны пять ВКФ (CR1, CR3, CR4, CR5 и CHR), которые могут участвовать в процессе проникновения ВГС в клетку-мишень и которые, соответственно,

могли бы вызвать образование к себе вируснейтрализующих антител. CR3, CR4 и CHR были выявлены как участки связывания гепарина (антигенность участка, соответствующего удлинённому с N-конца PRR1, в составе конъюгата с овальбумином была изучена ранее [Оленина, 2002]). В участке CR5 предполагается локализация «пептид слияния» оболочечного белка E2 с мембраной эндосомы клетки-мишени [Drummer and Proumbourios, 2004]. Кроме того, в этом участке предсказываются Т-хелперные эпитопные мотивы. Участок CR1 белка E1 представлял интерес как обладающий антигенной активностью в составе целого гетеродимера E1E2 и индуцирующий образование антител у лиц, инфицированных ВГС [Zibert et al., 1999, Olenina et al., 2002].

Были синтезированы 9 пептидов, а.к. последовательности которых содержат пять выбранных ВКФ (табл. 2). В состав указанных пептидов, помимо собственно ВКФ, были включены дополнительные а.к.о. Cys, Lys или Ser (показаны обычным шрифтом), обеспечивающие присоединение к белку-носителю и/или имеющие функцию мостика между пептидом и белком-носителем, либо обеспечивающие циклизацию пептида путем образования S-S-мостика (два остатка Cys на N- и C-концах пептида). Для лучшего моделирования структуры фрагмента в составе молекулы белка α -карбоксильные группы пептидов амидировали, а α -амино-группы, если они не использовались для конъюгации с носителем, ацетилировали. Правильность синтеза пептидов подтверждена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Таблица 2 Пептиды, содержащие ВКФ оболочечных белков E1 и E2 ВГС, и их характеристика

№ пептида	А.к. последовательность ¹	ВКФ	K ² , %	Мол.масса пептида расчетная, Да	Масса молекулярных ионов на спектрограмме
П1	NH ₂ -CPTDCFRKH-CONH ₂	CR3	97	1202,5	1205,1
П2	NH ₂ -LPALSTGLIHLHQNIVDVQYLYG-CONH ₂	CR5	59	2564,0	2559,0 2579(+Na ⁺)
П3	NH ₂ -CDLEDRDRSELC-CONH ₂	CHR	38	1424,8	1424,5 1422,5(окисл.)
П4	NH ₂ -PYRLWHYPCT-CONH ₂	CR4	94	1334,5	1334,9
П7	NH ₂ -CDLEDRDRSEL-CONH ₂	CHR	38	1349,5	1331,74(-H ₂ O) 1349,77 1371,75(+Na ⁺)

П8	NH ₂ - DLED RDRSELK-CONH ₂	CHR	38	1374,5	1356.7(-H ₂ O) 1374.72 1396.69(+Na ⁺)
П9	NH ₂ -SPALSTGLIHL HQN IVD-CONH ₂	CR5	63	1814,1	1813,8 1835,8(+Na ⁺) 1851,8(+K ⁺)
П10	Ac-SPALSTGLIHL HQN IVD-CONH ₂	CR5	63	1856,1	1855,5
П13	Ac- GHRMA WDMC-CONH ₂	CR1	96	1234,6	1250,9/1266,9 1234,4/1250,4 ³

¹ – последовательность, соответствующая консенсусной последовательности включенного в пептид ВКФ, выделена жирным шрифтом;

² – консервативность последовательности ВКФ, включенной в состав пептида;

³ – массы молекулярных ионов после обработки пептида 2-меркаптоэтанолом.

Получение синтетических конструкций, включающих ВКФ

Синтезированные пептиды были включены в состав конструкций (табл. 3), содержащих в качестве источника Т-хелперных эпитопов различные белки-носители [Van Regenmortel and Muller, 1999]. В качестве одного из носителей пептида П2 использовали полиоксидоний (ПО), синтетический полимер, обладающий выраженной иммуномодуляторной активностью и успешно применяемый в качестве адъюванта в субъединичных вакцинах [Петров Р.В. и др., 1999]. Количество остатков пептида в одной молекуле конъюгата определяли с помощью SELDI-масс-спектрометрического анализа и аминокислотного анализа для конъюгата П2-ПО.

Таблица 3 Синтетические конструкции и их характеристика

№ животного (группы) ¹	Синтетическая конструкция	ВКФ	Мол.масса Конъюгата ²	N ³
1-I	П1-ДМС-БСА	CR3	67549	0,7
1-II	П1-ГА-БСА		88493,5	17,3
2-I 2-II	П2-ГА-БСА	CR5	79870,5	5,0
3-I	П3-ГА-БСА	CHR	81231,1	9,8
3-II	П3-ГА-ОВА		-	-
4-I	П4-ДМС-БСА	CR4	67195,6-	0,4
4-II	П4-ГА-БСА		83574,1	12,1
5	П7-МБС-БСА	CHR	79161,7	8,1
6	П7-МБС-МГ		20075,0	(2,1/1)
			43455,3	2,8 (6,1/2)
			65900,7	(9,5/3)
7	П8-ГА-БСА		79081,8	8,6
8	П8-ГА-МГ		20506,9	(2,5/1)
			26341,4	(6,6/1)
			37866,1	2,5 (3,2/2)
		53739,0	(2,1/3)	
		77489,2	(6,8/4)	
9	П9-ГА-БСА	CR5	78530,0	6,3
10	П10-КД-БСА		73196,6	3,6
11	П2-ПО		-	1,0 ⁴
13	П13- МБС-БСА	CR1	73106,1	4,5

¹ - 1-I -4-II – номера иммунизированных кроликов (римская цифра указывает цикл иммунизации), 5-13 - номера групп иммунизированных мышей;

² – усредненная молекулярная масса конъюгата по данным SELDI-MS (Да);

³ - N - среднее количество молекул пептида на 1 молекулу белка в конъюгате;

⁴ - данные определены методом аминокислотного анализа.

Получение антипептидных антител к фрагментам CR3, CR4, CR5 и CHR у кроликов.

Основной задачей данного этапа работы являлось определение способности ВКФ оболочечных белков ВГС в составе искусственных конструкций вызывать образование антител специфичных к целым белкам. Для этого необходимо было получить достаточное количество антипептидных антител для анализа их специфичности. Поэтому в качестве подопытных животных были выбраны кролики для получения антител против конъюгатов П1-ДМС-БСА, П2-ГА-БСА, П3-ГА-БСА, П4-ГА-БСА. Из сывороток крови иммунизированных кроликов выделяли IgG и тестировали их на способность к

специфическому взаимодействию с соответствующими пептидами методом ИФА. Анализ проводили с использованием пептидов, ковалентно связанных с поверхностью лунок планшетов. После первого цикла иммунизации антипептидные антитела во фракциях IgG, полученных из сывороток крови иммунизированных кроликов, не были обнаружены.

Был проведен повторный цикл иммунизации. Поскольку одной из причин отсутствия антител к П1 и П4 может быть малое количество молекул пептида, связавшееся с одной молекулой белка-носителя в конъюгатах П1-ДМС-БСА и П4-ДМС-БСА (табл. 3), для повторного цикла иммунизаций использовали конъюгаты этих же пептидов с БСА, полученные с помощью ГА, с большим содержанием остатков пептида (табл. 3). В конъюгате П3-ГА-БСА содержание остатков пептида оптимально. Отсутствие иммунного ответа на пептид П3 может быть результатом электростатического взаимодействия пептида с поверхностью молекулы белка-носителя, прилегающей к месту пришивки пептида [Bahraoui et al., 1986]. Поэтому для второго курса иммунизации использовали конъюгат пептида П3 с ОВА. Из-за сложности работы с пептидом П2 (низкая растворимость в водных растворах самого пептида и его конъюгатов) для повторного цикла иммунизации была использована та же конструкция П2-ГА-БСА.

После второго курса иммунизации нам удалось получить антитела к фрагменту CR4; титр антипептидных антител в препарате IgG из сыворотки кролика 4-II составлял 1:2700. Однако полученные антипептидные антитела не взаимодействовали ни с оболочечным белком E2, ни с гетеродимером E1E2. Следовательно, в составе оболочечного белка E2 данные фрагменты имеют иную конформацию, чем в составе конъюгата с БСА.

К фрагментам CR3, CHR и CR5 антипептидные антитела у кроликов получить не удалось даже после второго цикла иммунизации. Вероятно, для получения антипептидных антител против фрагментов CR3 и CR4, способных специфично взаимодействовать с белком E2, необходима разработка принципиально иных иммуногенных конструкций. CR3 и CR4 содержат в своем составе много а.к.о., имеющих боковые функциональные группы, обычно

используемые для конъюгации с носителями (Asp, Lys, Cys), которые не должны быть затронуты при конъюгации, так как они, располагаясь в середине или почти в середине фрагментов, могут быть важны для взаимодействия с антителами. Возможной причиной неудачи в получении антител к участку CR5 может быть высокая гидрофобность содержащего этот фрагмент пептида П2. Более короткие и менее гидрофобные пептиды, содержащие часть фрагмента CR5, образовывали растворимые конъюгаты. Другой причиной как в случае CR5, так и в случае CHR, где замена носителя в конъюгате с П3 не привела к выработке специфических антител, может быть индивидуальная толерантность животного. В этом случае необходимо исследовать иммунный ответ в группах животных. Для таких масштабных исследований в качестве подопытных животных были выбраны мыши.

Получение антипептидных антител к фрагментам CR1, CR5 и CHR у мышей.

Для иммунизации мышей были использованы конъюгаты пептидов, содержащих фрагменты CHR, укороченный CR5 и CR1 (табл. 3, группы 5-13). Четыре группы мышей были использованы для проверки антигенности П2 (содержащего полноразмерный CR5) в составе конъюгата П2 с полиоксидонием (П2-ПО). Первая группа (табл. 4, группа №11) была иммунизирована П2-ПО с АФ, вторая (группа №11а) – П2-ПО без АФ. Две контрольные группы были иммунизированы соответственно пептидом П2 в смеси с ПО и пептидом П2 с АФ.

Значения титров антител к различным фрагментам для каждой антисыворотки и среднее геометрическое значение титров антител в группе приведены в таблице 4.

Таблица 4 Титры антипептидных антител в сыворотках мышей

№ группы	Иммуногенная конструкция	ВКФ	Титры антипептидных антител					
			1	2	3	4	5	T _{ср} ¹
5	П7-МБС-БСА	CHR	900	8100	<100	300	-	216
6	П7-МБС-МГ		<100	<100	<100	<100	<100	-
7	П8-ГА-БСА		300	<100	<100	900	300	38
8	П8-ГА-МГ		2700	<100	<100	<100	900	19
9	П9-ГА-БСА	CR5	<100	<100	<100	<100	<100	-
10	П10-КД-БСА		900	300	100	<100	300	96
11	П2-ПО + АФ		>450	<50	150	>450	>450	165

11a	П2-ПО		50	450	150	150	>450	187
13	П13-МБС-БСА	CR1	24300	218700	8100	24300	-	31980

¹ - T_{cp} - среднее геометрическое значений титров в группе.

Из полученных данных следует, что включение ВКФ CHR, CR1 и CR5 в конъюгаты с белками-носителями позволяет получить антипептидные антитела к указанным фрагментам. Однако иммунный ответ зависит от ориентации пептида, структуры носителя и сшивающего реагента и от индивидуальных особенностей функционирования иммунной системы иммунизируемого животного. Из исследованных фрагментов наиболее иммуногенным оказался CR1, который проявлял наибольшую иммуногенность среди ВКФ и в составе ВГС у больных гепатитом С [Zibert et al., 1997; Olenina et al., 2002]. Наиболее эффективными носителями для получения иммуногенных конструкций с использованием исследованных пептидов оказались БСА и ПО, а сшивающими реагентами – МБС и КД.

Определение специфичности антипептидных антител к препаратам оболочечных белков ВГС.

Сыворотки крови мышей, содержащие антипептидные антитела, были анализированы методом твердофазного ИФА на способность взаимодействовать с полноразмерным оболочечным белком E2 или гетеродимером E1E2. Оболочечные белки инкубировали с сыворотками (в разведении 1:50), содержащими антипептидные антитела. Из рис. 4 видно, что из 25 антисывороток пять содержали антитела, взаимодействующие с полноразмерным белком E2 и с гетеродимером E1E2. Это антисыворотки, полученные против конъюгатов пептидов, соответствующих фрагментам CHR и CR5.

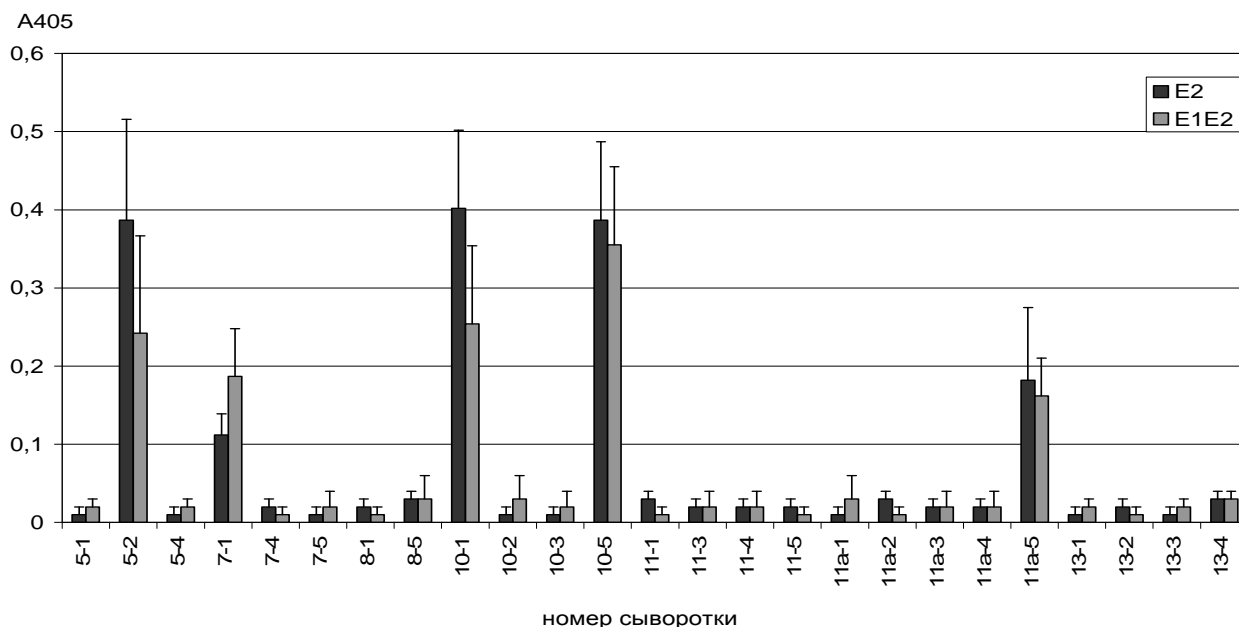


Рис. 4 Взаимодействие антител из сывороток мышей групп 5,7,8,10,11а,11 и 13 с оболочечными белками ВГС

Таким образом, конъюгация пептидов, соответствующих слабо или практически не иммуногенным в составе целых оболочечных белков ВГС ВКФ, с белками-носителями позволяет получить иммуногенные конструкции, способные вызывать выработку организмом специфических антипептидных антител. Пептид, содержащий предсказываемые Т-хелперные эпитопные мотивы, вызывал образование специфических антител и в виде конъюгата с полимерным адъювантом полиоксидонием. Это указывает на принципиальную возможность разработки конструкций для кандидатной вакцины против гепатита С на основе отдельных синтетических фрагментов оболочечных белков ВГС.

Получение синтетических пептидных Т-В эпитопных конструкций на основе ВКФ оболочечных белков ВГС.

Синтез Т-В эпитопных конструкций

Анализ оболочечного белка E2 с использованием обновленного программного обеспечения SYFPEITHI позволил выявить консервативный фрагмент оболочечного белка E2, содержащий Т-хелперные мотивы. Было высказано предположение, что этот фрагмент может быть использован как источник Т-хелперных эпитопов в искусственной иммуногенной пептидной

конструкции. Данный фрагмент был включен в состав двух пептидных конструкций (пептид 14 и пептид16), где в качестве В-эпитопа выступает другой ВКФ оболочечного белка Е2 ВГС (рис. 5а), а также были получены конъюгаты этих пептидов с БСА с использованием ГА. (рис 5б).

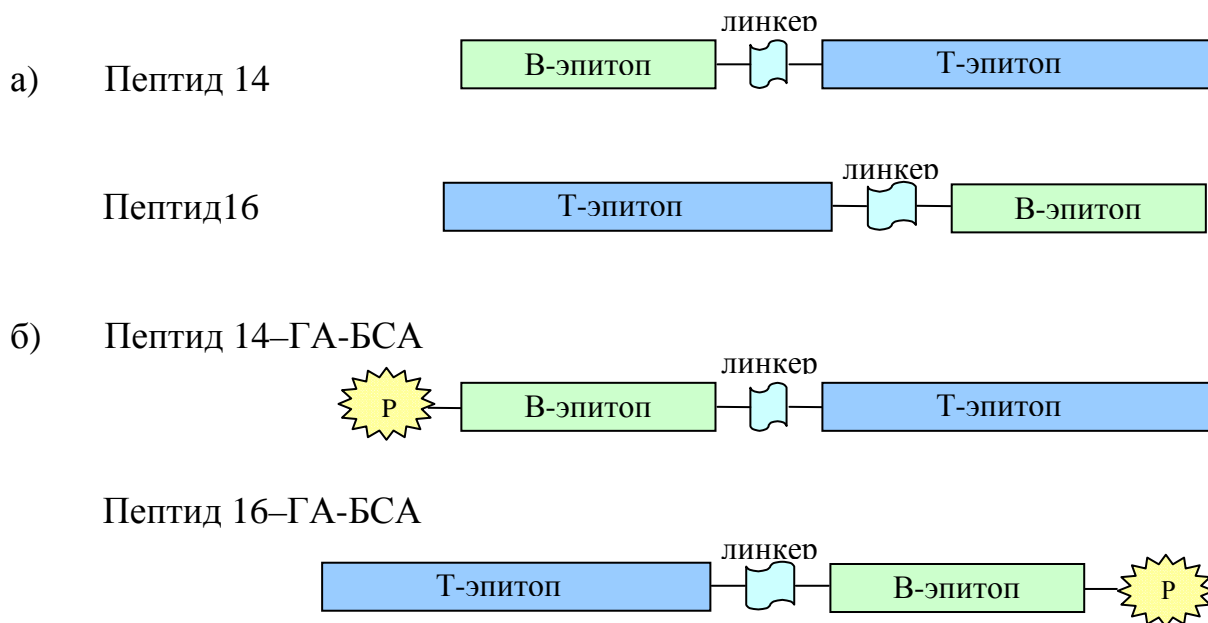


Рис. 5 Т-В эпитопные конструкции: а) пептидной природы; б) конъюгированные с БСА.

Получение антител к Т-В-эпитопным конструкциям и определение их специфичности.

Иммунизация мышей Т-В-эпитопными конструкциями проводилась в двух вариантах: с добавлением АФ и без него. Нумерация групп мышей в соответствии с материалом для иммунизации приведена в таблице 5. Результаты тестирования антисывороток мышей этих 6 групп (табл. 5) показали, что в результате иммунизации все мыши (за исключением мыши №3 в группе 16а) с разной эффективностью развили иммунный ответ к целой соответствующей конструкции (в таблице значения титров выделены **жирным шрифтом**). Показано, что обе пептидные конструкции способны в свободном виде, без конъюгации с белком-носителем и даже без адьюванта индуцировать образование специфических антипептидных антител. Тестирование антисывороток на специфичность к Т- и В-эпитопным фрагментам показало, что эффективность образования антител к отдельным фрагментам зависела от

использования адъюванта при иммунизации. В целом конструкция 14 оказалась более иммуногенной, чем конструкция, представленная пептидом 16. Эффективность образования антител к соответствующему антигену убывает в ряду групп 14-15-16-14а-17-16а. Однако в случае иммунизации конструкциями, содержащими пептид 16, выше эффективность образования антител к В-эпитопу.

Таблица 5 Титры антипептидных антител в сыворотках мышей иммунизированных Т-В-эпитопными конструкциями

№		Препарат для иммуни-зации	Титры антител и их среднее геометрическое в группе					
			к пептиду 14		к пептиду 16		к пептиду b	
14а	1	Пептид 14 без АФ	900	10090	<100	-	300	-
	2		24300		<100		<100	
	3		72900		<100		<100	
	4		2700		<100		<100	
	5		24300		<100		<100	
14	1	Пептид 14 + АФ	256000	256000	<100	185	900	75
	2		256000		2700		100	
	3		256000		100		<30	
	4		256000		900		30	
	5		256000		900		900	
15	1	П14-ГА-БСА + АФ	32000	48503	30	366	<100	-
	2		64000		300		<100	
	3		32000		900		100	
	4		64000		2700		<100	
	5		64000		300		<100	
16а	1	Пептид 16 без АФ	900	4	8100	149	24300	39
	2		<30		100		<100	
	3		<30		<30		-	
	4		<100		900		100	
	5		<30		100		<100	
16	1	Пептид 16 + АФ	2700	1397	32000	21000	900	2700
	2		900		16000		8100	
	3		2700		32000		8100	
	4		900		32000		2700	
	5		900		8000		900	
17	1	П16-ГА-БСА + АФ	16000	25	64000	2639	24300	-
	2		<100		1000		-	
	3		<100		2000		-	

Взаимодействие анти-Т-В-эпитопных антител с препаратами
оболочечных белков ВГС.

Тестирование сывороток крови методом ИФА на наличие антител, способных взаимодействовать с полноразмерным белком, показало, что из 27 сывороток четыре (14-5, 15-3, 15-5 и 17-1) содержат антитела,

взаимодействующие с белком E2, и три (14-5, 15-3 и 16-5) – антитела, взаимодействующие с гетеродимером E1E2 ВГС (рис. 7). С белком реагировали антитела только из тех сывороток крови, которые были получены после иммунизации конструкциями с АФ. Ни в одной из сывороток, полученных после иммунизации без использования АФ, антител против оболочечных белков не выявлено.

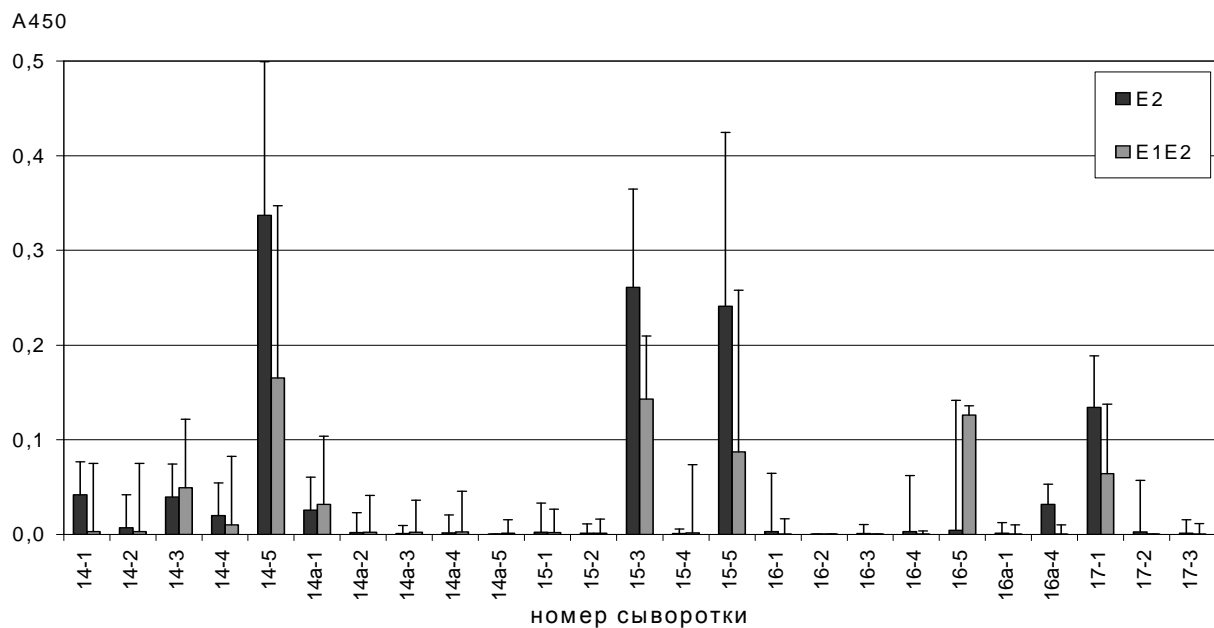


Рис. 7 Взаимодействие антител из сывороток мышей, иммунизированных Т-В-эпитопными конструкциями, с оболочечными белками ВГС

Высокая иммуногенность синтетических пептидных конструкций даже в отсутствие адьюванта подтверждает наличие Т-хелперной эпитопной активности у включенного в состав этой конструкции предсказанного Т-эпитопного мотива. Иммунный ответ с образованием специфических антипептидных антител наблюдался практически у всех иммунизированных животных, что свидетельствует о широкой специфичности данного Т-эпитопного мотива по отношению к МНС II. Важно отметить, что показана специфичность антипептидных антител из четырех сывороток к полноразмерному оболочечному белку E2 и трех к гетеродимеру E1E2 ВГС. Подобные конструкции из фрагментов оболочечных белков ВГС были получены впервые. В дальнейшем такие конструкции могут быть модифицированы и улучшены с целью получения антител с большей

связывающей активностью в отношении полноразмерных оболочечных белков ВГС.

ВЫВОДЫ

1. Составлена структурно-функциональная карта оболочечных белков вируса гепатита С.
2. Определены четыре линейных фрагмента оболочечного белка E2, взаимодействующие с гепарином – возможным рецептором ВГС.
3. Показано, что высококонсервативные фрагменты оболочечных белков ВГС, включенные в состав искусственных иммуногенных конструкций, проявляют антигенные свойства и способны вызывать образование специфических антител, взаимодействующих с оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2
4. Получены высокоантигенные синтетические Т-В-эпитопные пептидные конструкции, содержащие в своем составе высококонсервативные фрагменты оболочечного белка E2 ВГС и способные вызывать образование антител, взаимодействующих с полноразмерным оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2 ВГС.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Olenina L.V., Kuzmina T.I., Sobolev B.N., Kuraeva T.E., Kolesanova E.F., Archakov A.I. Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 // *Journal of Viral Hepatitis*. – 2005. – V. 12. №6. - P. 584-593.
2. Оленина Л.В., Кузьмина Т.И., Соболев Б.Н., Кураева Т.Е., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И. Разработка лабораторно-экспериментальных образцов искусственной вакцины против вируса гепатита С. Иммуногенность высококонсервативных участков оболочечного белка E2 в составе синтетических конструкций // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. - 2003. - Т. 9, № 7. - С. 51-53.
3. Kuraeva T.E. Olenina L. V., Kuzmina T.I., Alyoshina E.Yu., Kolesanova E.F., Archakov A.I. Immunogenicity of highly conserved fragments of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 // In: *Peptides - Bridges Between Disciplines, Proceedings of the Third International and Twenty-Eight European Peptide symposium*. Flegel, M.; Fridkin, M.; Gilon, C. and Slaninova J. (Eds.). - 2005. - P.172-173.

4. Sobolev B.N., Kolesanova E.F., Olenina L.V., Kuraeva T.E., Rudik A.V., Poroikov V.V., Archakov A.I. Hepatitis C virus functional mapping database: an instrument in subunit vaccine design. // In: Peptides - Bridges Between Disciplines, Proceedings of the Third International and Twenty-Eight European Peptide symposium. Flegel, M.; Fridkin, M.; Gilon, C. and Slaninova J. (Eds.). - 2005. - P. 213-214.
5. Кураева Т.Е., Соболев Б.Н., Алешина Е.Ю., Кузьмина Т.И., Колесанова Е.Ф. Антигенная характеристика высококонсервативных участков оболочечных белков вируса гепатита С. // Медицинская иммунология. Сборник докл. пятой научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2001». - Санкт-Петербург, 2001. - Том 3, №2. - С. 231.
6. Кураева Т. Е., Оленина Л. В. Получение антипептидных антител против консервативного участка оболочечного белка вируса гепатита С // Сборник докл. конф. Биология наука XXI века: 6-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 мая 2002 г.). - Пущино, 2002. - Т. 1. – С. 270.
7. Olenina L.V., Kuzmina T.I., Sobolev B.N., Ivanov Yu.D., Gnedenko O.V., Nikolaeva L.I., Kuraeva T.E., Kolesanova E.F., Archakov A.I. Highly conservative sites of HCV envelope proteins: Possible functional role and immunogenic properties // In: Int. Conference “Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine”. Book of Abstracts. - Moscow, 2002. - P.94.
8. Kuraeva T.E. Olenina L. V., Kuzmina T.I., Alyoshina E.Yu., Kolesanova E.F., Archakov A.I. Immunogenicity of highly conserved fragments of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 // Материалы Междунар. симп. «3rd International and 28th European Peptide Symposium» - Prague, 2004. - V. 10. №8. - P. 94.
9. Sobolev B.N., Kolesanova E.F., Olenina L.V., Kuraeva T.E., Rudik A.V., Poroikov V.V., Archakov A.I. Hepatitis C virus functional mapping database: an instrument in subunit vaccine design Материалы Междунар. симп. «3rd International and 28th European Peptide Symposium» - Prague, 2004. - V. 10., №8. - P. 112.
10. Sobolev B.N., Kuraeva T.E., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Rudik A.V., Poroikov V.V., Archakov A.I. Hepatitis c virus epitope mapping database (HCVMAP): an instrument in subunit vaccine design // In: Int. Conference “Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine”. Book of Abstracts. - Moscow, 2004 - P. 5.13.

Список сокращений

а.к.о. – аминокислотный остаток

АФ – адъювант Фрейнда

БСА - бычий сывороточный альбумин

ВГС - вирус гепатита С

ВКФ – высококонсервативный фрагмент

ГА - глутаровый альдегид

ГАГ - гликозаминогликаны

ДМС – диметилсульфид

ИФА - иммуноферментный анализ

КД – 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид

МБС – N- гидроксисукцинимидный эфир 3-малеимидобензойной кислоты

МГ – миоглобин лошади

ОВА – овальбумин

ПО - полиоксидоний

DKP – Lys-Pro-дикетопиперазин

HVR - гипервариабельный участок (hypervariable region)

IgG – иммуноглобулины класса G, IgA – иммуноглобулины класса A

MALDI-TOF – matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight
времяпролетная [масс-спектрометрия] с лазерной десорбцией-ионизацией
с помощью матрицы

NHS - N-гидроксисукцинимид

PBS – фосфатно-солевой буфер

PBST – фосфатно-солевой буфер с твином

SELDI – (surface-enhanced laser desorption-ionization) усиленная
поверхностная лазерная десорбция-ионизация (в масс-спектрометрии
белков)