

На правах рукописи

Мойса Александр Александрович

ИММУНОГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ  
ФРАГМЕНТОВ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА Е2 ВИРУСА ГЕПАТИТА С

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.  
Ореховича РАМН (ИБМХ РАМН)

|                             |                                                                           |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>Научный руководитель</b> | доктор биологических наук,<br>профессор<br>Колесанова Екатерина Федоровна |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|

|                              |                                                                        |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>Официальные оппоненты</b> | доктор биологических наук,<br>профессор<br>Москалева Елизавета Юрьевна |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|

доктор биологических наук  
Ипатова Ольга Михайловна

|                            |                                                                                    |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ведущая организация</b> | ФГУ Научно-исследовательский<br>институт физико-химической<br>медицины ФМБА России |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|

Защита состоится 7 апреля в 12:30 часов на заседании диссертационного  
совета Д.001.010.01 при ИБМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул.  
Погодинская, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН по адресу:  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
кандидат химических наук

Е.А. Карпова

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

В настоящее время по приводимым в литературе данным около 3% мирового населения (около 200 миллионов) хронически инфицированы вирусом гепатита С (ВГС) и дополнительно от 3 до 4 миллионов новых инфицирований происходит каждый год (Schlaphoff, et al., 2007). Иммунная система большинства больных гепатитом С не способна самостоятельно справиться с вирусом, что позволяет ВГС длительно реплицироваться в гепатоцитах и ряде других клеток (Ludwig et al., 2004). У 3–10% инфицированных в течение примерно 20 лет развивается цирроз печени с последующим риском возникновения гепатоцеллюлярной карциномы (Seeff et al., 2002).

Лечение гепатита С значительно улучшилось в течение последних лет, но общедоступной специфичной терапии всё ещё нет. Современная терапия комбинированием  $\alpha$ -интерферона и рибавирина является достаточно дорогой и сопровождается побочными эффектами (Schlaphoff, et al., 2007). Кроме того, она имеет довольно низкую эффективность, особенно в отношении ВГС субтипа 1b (чувствительными к терапии оказываются менее 30% пациентов), наиболее часто встречающегося в России.

Разрабатываемые в настоящее время новые лекарственные средства для борьбы с вирусом гепатита С, нацеленные на ингибирование вирусных протеаз и РНК-зависимой РНК-полимеразы, ещё не прошли клинических испытаний (Webster et al., 2009). Кроме того, существует риск появления устойчивых к ним мутантных форм ВГС (Foster et al., 2004; Webster et al., 2009). Насущной необходимостью остаётся создание вакцин против ВГС, которые бы предотвращали распространение этой инфекции в человеческой популяции независимо от субтипа и/или мутантной формы вируса, или по крайней мере были бы способны защитить пациента от эволюции острого гепатита С в хронический (Lauer et al., 2004; Elmowalid et al., 2007). Несмотря на интенсивные исследования в этом направлении и разработку ряда кандидатных вакцин, дошедших до стадии

клинических испытаний (Barrett, 2007), эффективного вакцинного препарата против гепатита С пока нет.

Первыми компонентами ВГС, распознаваемыми иммунной системой человека как чужеродные, являются оболочечные белки E1 и E2. Эти белки ответственны за взаимодействие с рецепторами клеток-мишеней и проникновение вируса внутрь клеток. Соответственно, антитела против оболочечных белков ВГС могут проявлять и по данным ряда исследователей действительно проявляют вируснейтрализующее и протективное действие (Farci et al., 1994; Zibert et al., 1997). Однако оболочечные белки отличаются наибольшим генетическим разнообразием в зависимости от субтипа ВГС и наибольшей изменчивостью аминокислотных последовательностей в ходе многократных репликаций вируса в организме-хозяине. Это является одной из основных причин ухода ВГС от иммунного ответа организма-хозяина. 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.

### **Цель и задачи исследования**

Целью работы является разработка синтетических пептидных иммуногенных конструкций на основе фрагментов оболочечного белка E2 ВГС.

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

1. Выбор Т- и В-эпитопов в составе консервативных участков аминокислотной последовательности оболочечного белка E2 ВГС. Дизайн предполагаемых иммуногенных конструкций на основе выбранных эпитопов.
2. Синтез и очистка пептидов, представляющих собой составные иммуногенные конструкции.
3. Исследование синтезированных пептидов и их смесей на наличие иммуногенности на лабораторных животных и на способность вызывать

образование антител, взаимодействующих с целым оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2 ВГС.

4. Исследование взаимодействия антител, полученных в результате иммунизации лабораторных животных, с вирусными частицами из плазмы крови больных гепатитом С.

#### **Научная новизна.**

В работе впервые:

- получены новые синтетические Т-В-эпитопные пептидные конструкции, содержащие в своем составе высококонсервативные фрагменты оболочечного белка E2 ВГС;
- продемонстрирована высокая иммуногенность полученных Т-В-эпитопных пептидных конструкций в опытах на лабораторных животных;
- показана способность полученных синтетических Т-В-эпитопных пептидных конструкций вызывать образование антител, взаимодействующих с полноразмерным оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2 ВГС и связывающих вирусные частицы из плазмы крови больных гепатитом С;
- для синтеза пептидов длиной свыше 20 аминокислотных остатков применен новый регламент пептидного синтеза с использованием 4-метилпиперидина для удаления защитных Fmoc-групп с альфа-аминогрупп растущей пептидной цепи.

#### **Практическая значимость исследования**

Исследованные в данной работе синтетические иммуногенные конструкции, составленные из высококонсервативных фрагментов оболочечного белка E2, могут быть использованы в разработке препарата вакцины против ВГС.

#### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы были доложены на: VIII Российской научно-практической конференции «Вирусные гепатиты: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика» (Москва, 2009), 12-м семинаре Научно-консультативного комитета МНТЦ «Борьба с глобальными

инфекциями» («Combating Global Infections»; Листвянка – Иркутск, 2009), V Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009), VI научно-практической конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2009), совместной конференции НИАИЗ(США)-МНТЦ «Биоинформатические подходы и методы для исследования аллергических и инфекционных заболеваний» (Москва, 2010), 5-м Международном пептидном симпозиуме (Киото, 2010). Материалы диссертации представлены в 2 статьях и в 4 публикациях в материалах сборников научных конференций.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы и приложения. Работа содержит 160 страниц машинописного текста, 14 таблиц и 16 рисунков включая приложение. Список литературы включает 264 источника.

### **Материалы и методы исследований**

Лизаты клеток, содержащие полноразмерные оболочечные белки ВГС из изолята Н77 (субтип 1а), любезно предоставлены доктором J. Dubuisson, Институт Биологии/Институт Пастера, Лилль, Франция.

Препараты плазмы крови больных гепатитом С получены от д.м.н. О.Б.Ковалёва, научного сотрудника кафедры детских инфекций РГМУ на базе Детской Городской Клинической Больницы №9 им. Г.Н. Сперанского (инфекционный корпус); возраст больных 7-14 лет.

Т-хелперные эпитопные мотивы выявляли с помощью программного обеспечения SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>). При этом использовали как полную консенсусную аминокислотную последовательность оболочечного белка Е2 ВГС, так и отдельные полноразмерные последовательности этого белка из различных изолятов ВГС, имеющиеся в базах SWISS-PROT и UniProt.

Составленные нами из фрагментов оболочечного белка Е2 В-Т- и Т-В-эпитопные конструкции получали с помощью твердофазного автоматического пептидного синтеза на пептидном синтезаторе 433А (“Applied Biosystems”, США)

исходя из 9-флуоренилметилоксикарбонил(Fmoc)-защищенных по  $\alpha$ -аминогруппам производных аминокислот. Пептиды очищали препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на обращённой фазе и характеризовали с помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS, ESI ORBITRAP MS и MS/MS). Степень чистоты определяли с помощью аналитической ВЭЖХ.

### **Получение сывороток и препаратов иммуноглобулинов класса G (IgG) от иммунизированных животных.**

Крыс-самцов массой 200-250 г иммунизировали путем 4-кратного подкожного введения растворов пептидов с интервалом в 2 недели между инъекциями. Часть животных иммунизировали пептидами с адъювантом, а часть теми же пептидами без адъюванта. В случае иммунизации с адъювантом первую иммунизацию проводили смесью раствора пептида(ов) в фосфатно-солевом буфере с полным адъювантом Фрейнда, все последующие – смесью раствора пептида(ов) с неполным адъювантом Фрейнда. Адъювант Фрейнда добавляли в соотношении 1:1 (объём/объём) к растворам пептидов и смешивали до получения стойкой молочно-белой эмульсии. Вводимые дозы антигенов – 100 мкг пептида на 1 инъекцию одной крысе. Забор крови для получения антисывороток проводили через 1 неделю после последней иммунизации. В качестве контроля использовали сыворотки крови или выделенные из них IgG, полученные от тех же животных до начала иммунизации. Препараты иммуноглобулинов получали из сыворотки крови высаливанием насыщенным раствором сульфата натрия. Очистку препаратов IgG проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке с 3 мл Affi-Gel<sup>®</sup> Protein A агарозы «Bio-Rad».

Тестирование сывороток на наличие антипептидных антител и антител, взаимодействующих с оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2, проводили методом иммуноферментного анализа. При этом в зависимости от эксперимента на поверхность лунок планшета сорбировали либо препараты пептидов, либо полноразмерный оболочечный белок E2 или гетеродимер E1E2 ВГС, которые адсорбировали на лектин подснежника.

Взаимодействие препаратов IgG с нативными вирусными частицами оценивали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого препараты IgG сорбировали на поверхности микропробирок, куда добавляли образцы плазмы крови (100 мкл) хронически инфицированных ВГС больных, у которых предварительно с помощью ПЦР было установлено наличие РНК ВГС. Связывание вирусных частиц с IgG определяли путём выявления РНК ВГС методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией с электрофоретической детекцией («АмплиСенс<sup>®</sup> HCV-EPh») и флуоресцентной детекцией в реальном времени («АмплиСенс<sup>®</sup> HCV-Монитор-FRT»).



## Результаты и обсуждение

### Получение синтетических пептидных Т-В эпитопных конструкции на основе высококонсервативных фрагментов оболочечных белков ВГС

Критерием отбора В-эпитопной части пептидной конструкции служили: содержание высококонсервативных аминокислотных остатков (с частотой встречаемости в данной позиции в последовательностях полипротеина различных изолятов ВГС не ниже 95%) не менее 50% и гидрофильных аминокислотных остатков не менее 40% (таблица 1), а также функциональная значимость участка последовательности белка E2 ВГС.

Таблица 1. Консервативные участки оболочечных белков E1 и E2

| Белок | Позиция <sup>1</sup> | Участок <sup>2</sup> | Последовательность <sup>3</sup> | Консервативность /<br>Гидрофильность |
|-------|----------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| E1    | 315-324              | CR1                  | <u>GHRMAWDMMM</u>               | 94% / 60%                            |
| E2    | 418-432              | GLR                  | <u>GSWHINRTALNCNDS</u>          | 52% / 73%                            |
| E2    | 481-491              | PRR1                 | <u>DQRPYCWHYPP</u>              | 66% / 64%                            |
| E2    | 502-521              | CR2                  | <u>VCGPVYCFTPSPVVVGTTDR</u>     | 86% / 55%                            |
| E2    | 549-556              | PRR2                 | <u>WFGCTWMN</u>                 | 88% / 50%                            |
| E2    | 581-590              | CR3                  | <u>CPTDCFRKHP</u>               | 92% / 70%                            |
| E2    | 610-622              | CR4                  | <u>DYPYRLWHYPCTV</u>            | 75% / 62%                            |
| E2    | 654-663              | CHR                  | <u>LEDRDRSELS</u>               | 49% / 80%                            |
| E2    | 682-704              | CR5                  | <u>LPALSTGLIHLHQNIVDVQYLYG</u>  | 59% / 52%                            |

<sup>1</sup> – первая и последняя позиции указаны в соответствии нумерацией аминокислотных остатков в последовательности полипротеина ВГС изолята H77 (генотип 1a);

<sup>2</sup> – участки обозначены в соответствии с (Sobolev et al., 2000);

<sup>3</sup> – аминокислотные остатки, встречающиеся в данной позиции полипротеина в 95% и более изолятов ВГС, подчеркнуты.

Участок CR3 обладает высокой гидрофильностью, то есть с высокой вероятностью локализуется на поверхности молекулы E2, и отвечает за взаимодействие белка E2 с гликозаминогликанами (Barth et al., 2006; Olenina et al., 2005). PRR1 обладает умеренной гидрофильностью и отвечает за взаимодействие белка E2 (в том числе в составе вирусоподобных частиц) с рецептором ВГС CD81.

Кроме того, ранее у больных гепатитом С обнаруживали антитела к 8-членным пептидам в составе этих фрагментов белка E2 (Olenina et al., 2002). Фрагмент CHR, обладающий высокой гидрофильностью и входящий в сайт связывания белка E2 с гликозаминогликаном, ранее был включён в различные синтетические конструкции, а также конъюгаты с бычьим сывороточным альбумином. Эти конструкции и конъюгаты обладали высокой иммуногенностью для мышей и вызывали образование антител, специфично взаимодействовавших с целым белком E2 ВГС (Фарафонова 2005; Kuraeva et al, 2005). Таким образом, имевшиеся в литературе данные позволяли полагать, что выбранные нами в качестве В-эпитопов высококонсервативные фрагменты могут быть экспонированы на поверхности вирусной частицы и могут участвовать в её взаимодействии с молекулами – предполагаемыми рецепторами ВГС. Антитела против таких фрагментов могут обладать изолят-независимым протективным действием.

В результате поиска Th-эпитопов с помощью программы SYFPEITHI были получены таблицы всех вероятных Th-мотивов протяжённостью 15 аминокислотных остатков, специфичных для аллельных вариантов главного комплекса гистосовместимости II класса. Предсказанные Th-эпитопные мотивы консенсусной аминокислотной последовательности E2 и аминокислотных последовательностей E2 отдельных изолятов практически совпадали, поэтому в дальнейшем использовали таблицу возможных Th-мотивов консенсусной аминокислотной последовательности E2. В качестве Th-мотивов, которые могут быть использованы в иммуногенных конструкциях, отбирали мотивы с вероятностью соответствия Th-эпитопу больше 15, при этом данные мотивы должны были содержать высококонсервативные фрагменты (ВКФ) оболочечного белка E2, включающие не менее трёх важных для взаимодействия с МНС II аминокислотных остатка В результате в качестве источников Th-эпитопов были выбраны ВКФ CR2 и CR5 как содержащие наибольшее число перекрывающихся Th-эпитопных мотивов, охватывающих практически все варианты специфичности по отношению к различным аллельным вариантам МНС II (таблица 2). Эти

фрагменты и были включены в искусственные иммуногенные пептидные конструкции как возможные источники Th-эпитопов.

Таблица 2. Th-эпитопные мотивы ВКФ CR2 и CR5 белка E2 ВГС и их специфичности по отношению к аллельным вариантам МНС II

| ВКФ | Аллели МНС II          | Количество найденных Т-хелперных эпитопных мотивов |
|-----|------------------------|----------------------------------------------------|
| CR2 | H2-Ek                  | 1                                                  |
|     | HLA-DRB1*0101          | 4                                                  |
|     | HLA-DRB1*0301 (DR17)   | 1                                                  |
|     | HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4) | 2                                                  |
|     | HLA-DRB1*0701          | 5                                                  |
|     | HLA-DRB1*1501 (DR2b)   | 2                                                  |
| CR5 | H2-Ek                  | 3                                                  |
|     | H2-Ak                  | 1                                                  |
|     | HLA-DRB1*0101          | 5                                                  |
|     | HLA-DRB1*0301 (DR17)   | 3                                                  |
|     | HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4) | 3                                                  |
|     | HLA-DRB1*0701          | 5                                                  |
|     | HLA-DRB1*1101          | 2                                                  |
|     | HLA-DRB1*1501 (DR2b)   | 3                                                  |

Фрагмент CR2 – наиболее протяженный ВКФ в составе оболочечного белка E2 ВГС, содержит большое количество перекрывающихся Th-эпитопных мотивов. Его функциональная роль точно неизвестна, однако предполагается, что в этом участке находится «пептид слияния» оболочечного белка E2 с мембраной эндосомы клетки-мишени (Вишневская и др., 2008; Krey et al., 2010). Фрагменты белка E2, используемые в качестве В-эпитопов в составе создаваемых иммуногенных конструкций, также содержали предсказываемые Th-эпитопные мотивы, но специфичные для меньшего числа аллелей МНС II.

Для обеспечения свободного вращения В- и Т-хелперной эпитопных частей друг относительно друга в предполагаемых пептидных иммуногенных конструкциях между этими частями вводили короткий гибкий линкер. Так как заранее невозможно предсказать, какой порядок расположения В- и Т-эпитопов в

конструкции будет предпочтителен с точки зрения наибольшей эффективности иммунного ответа, для каждой пары В-эпитоп – Т-эпитоп использовали два варианта расположения в молекуле: В-Т и Т-В (рис. 1).

Составленные из фрагментов белка Е2 и тестированные нами предполагаемые иммуногенные конструкции приведены в таблице 3. Конструкции 7 и 8 были составлены ранее и тестированы на иммуногенность на мышах (Фарафонова, 2007).

Таблица 3. Иммуногенные конструкции

| № | Ст-ра конструкции | Аминокислотная последовательность конструкции                       |
|---|-------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1 | CR2-GG-CR3        | Ac-VCGPVYCFTPSPVVVGTTDGGCPTDCFRKHPE-CONH <sub>2</sub>               |
| 2 | CR3-GG-CR2        | Ac-CPTDCFRKHPEGGVCGPVYCFTPSPVVVGTTD-CONH <sub>2</sub>               |
| 3 | PRR1-GG-CR2       | Ac-DQRPYCWHYPPKPCGGVCGPVYCFTPSPVVVGTTD-CONH <sub>2</sub>            |
| 4 | CR2-GG-PRR1       | Ac-VCGPVYCFTPSPVVVGTTDGGDQRPYCWHYPPKPCG-CONH <sub>2</sub>           |
| 5 | CR5-GG-PRR1       | Ac-STGLIHLHQNIVDVQYLYGGDQRPYCWHYPPKPCG-CONH <sub>2</sub>            |
| 6 | PRR1-GG-CR5       | Ac-DQRPYCWHYPPKPCGGSTGLIHLHQNIVDVQYLYG-CONH <sub>2</sub>            |
| 7 | CHR-GG-CR2        | Ac-DLED RDRSELGGVCGPVYCFTPSPVVVGTTD-CONH <sub>2</sub>               |
| 8 | CR2-GG-CHR        | NH <sub>2</sub> -VCGPVYCFTPSPVVVGTTDGGDLED RDRSEL-CONH <sub>2</sub> |

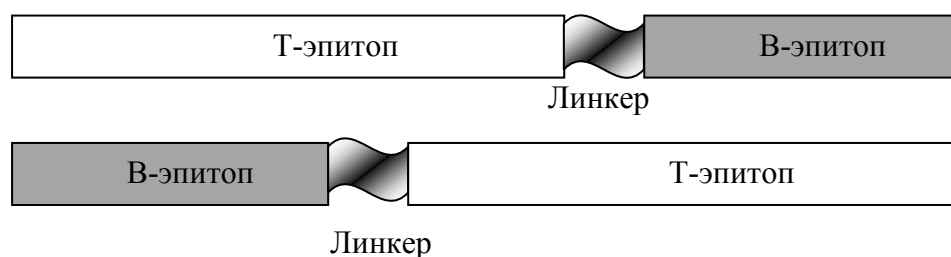


Рис 1. Строение Т-В / В-Т-эпитопных конструкций

## Синтез иммуногенных конструкций

### Разработка нового регламента твердофазного пептидного синтеза исходя из Fmoc-аминокислот.

Стандартная методика синтеза пептидов из Fmoc-аминокислот включает удаление защитных Fmoc-групп со смолы и с растущей пептидной цепи пиперидином (PIP) в виде 20%-ного раствора в N,N-диметилформамиде (DMF).

Однако в настоящее время PIP входит в список прекурсоров, и его свободное использование и приобретение в России запрещено.

На примере синтеза модельного пептида  $^5\text{RHDSGY}^{10}$ -амида, фрагмента бета-амилоида, был разработан новый регламент твердофазного пептидного синтеза путём введения модификации в стадию удаления защитной Fmoc-группы с  $\alpha$ -амино-группы растущей пептидной цепи. В качестве предлагаемых на замену PIP реагентов были тестированы пирролидин (PYR) и 4-метилпиперидин (4MPIP). Как видно из таблицы 4, использование обоих тестированных реагентов привело к получению препарата пептида с более высоким абсолютным и относительным содержанием целевого вещества; в частности, значительно снизились рацемизация и модификация остатка Asp. Однако использование 4MPIP вместо PIP оказалось предпочтительным из-за значительно более высокой стабильности растворов 4MPIP по сравнению с растворами PYR. 4MPIP обладает сходными с PIP физическими свойствами, в частности, плотностью и температурой кипения, что облегчает настройку дозирующего устройства автоматического синтезатора при замене одного реагента на другой.

Таблица 4. Результаты синтеза и характеристика препаратов фрагмента  $\beta$ -амилоида  $^5\text{RHDSGY}^{10}$

| Реагент для удаления Fmoc-группы* | Выход неочищенного пептида, мг | Эпимеризация Asp/iso-Asp | Аспартимид | Содержание целевого продукта в неочищенном препарате, % |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------|---------------------------------------------------------|
| 20%PIP                            | 6,5                            | Да                       | <1%        | 27                                                      |
| 20% PYR                           | 7,4                            | Нет                      | <1%        | 54                                                      |
| 20% 4MPIP                         | 9,3                            | Нет                      | <1%        | 51                                                      |

\*- реагент для удаления Fmoc-группы растворяли в DMF, содержание в % по объему.

B-T- и T-B-эпитопные пептидные конструкции (таблица 3) синтезировали методом автоматического твердофазного пептидного синтеза с использованием

20%-ного раствора 4MPiP в DMF для удаления Fmoc-групп с растущей пептидной цепи. Пептиды имели циклическую (а некоторые – бициклическую) структуру за счёт дисульфидных связей между остатками цистеина. Выбор такой структуры основан на том, что по данным литературы в оболочечных белках ВГС все остатки цистеина образуют внутримолекулярные дисульфидные связи, и используемые нами в качестве В-эпитопов участки оболочечного белка E2 могут находиться в петлях, образованных за счёт S-S-мостиков. Конформация циклического пептида может с большей точностью повторять конформацию петлеобразного участка последовательности оболочечного белка E2 ВГС, что будет способствовать выработке высокоаффинных антипептидных антител к белку.

Правильность синтеза пептидов контролировали масс-спектрометрическим анализом, степень чистоты определяли с помощью аналитической ВЭЖХ. В таблице 5 приведены результаты синтеза и характеристики полученных пептидов.

Таблица 5. Характеристики препаратов синтезированных пептидных конструкций

| № пептида | Молекулярная масса | Выход пептида (мг) | Степень чистоты (%) по данным ВЭЖХ |
|-----------|--------------------|--------------------|------------------------------------|
| 1         | 3406,9             | 7,0                | ≥90                                |
| 2         | 3406,9             | 15,4               | ≥90                                |
| 3         | 3763,4             | 24,9               | ≥90                                |
| 4         | 3705,3             | 25,3               | ≥90                                |
| 5         | 4095,7             | 18,7               | ≥90                                |
| 6         | 4095,7             | 22,7               | ≥90                                |
| 7         | 3323,7             | 19,5               | ≥80                                |
| 8         | 3166,6             | 22,4               | ≥80                                |

## **Образование специфических антител в ответ на иммунизацию крыс Т-В-эпитопными конструкциями**

### **Изучение иммуногенности пептидных конструкций**

При иммунизации крыс пептидами без АФ антипептидные антитела (здесь и далее антипептидными названы антитела к целой синтетической конструкции) были обнаружены только у одного животного из группы, иммунизированной пептидом 1. При иммунизации композицией каждой из синтетических пептидных

конструкций №№ 1-4, 7, 8 с АФ антипептидные антитела были обнаружены в сыворотках крови 22 из 29 животных в достаточно высоких титрах (табл. 6). Иммуногенными оказались как конструкции с условно «прямым» порядком расположения Т- и В-эпитопов (Т-линкер-В, конструкции №№ 1, 4, 8), так и с условно «обратным» порядком расположения (В-линкер-Т, конструкции №№ 2, 3, 7), хотя из сопоставления титров антипептидных антител против конструкций 1 и 2, 3 и 4 можно заключить, что конструкции вида Т-линкер-В в этом случае обладают более высокой иммуногенностью. Наиболее высокая иммуногенность была выявлена у конструкции № 1. Пептидные конструкции № 5 и 6 не вызвали образования специфических антител, возможно, из-за плохой растворимости в водных растворах и, как следствие, низкой биодоступности. Проявление пептидами №№ 1-4, 7 и 8 достаточно высокой иммуногенности при введении крысам может свидетельствовать о том, что включённый в данные конструкции фрагмент белка Е2, СR2, с предсказанными Т-хелперным эпитопными мотивами проявил способность стимулировать Т-хелперные лимфоциты 2 типа к активации превращения В-лимфоцитов в антителопродуцирующие плазматические клетки.

Таблица 6. Титры антипептидных антител к иммуногенным конструкциям использованным с АФ

| № группы | Кол-во животных в группе | Иммуногенная конструкция | Среднее геометрическое значение титров в группе |
|----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| 1        | 5                        | CR2-GG-CR3               | 1:31981                                         |
| 2        | 5                        | CR3-GG-CR2               | 1:8100                                          |
| 3        | 5                        | PRR1-GG-CR2              | 1:900                                           |
| 4        | 5                        | CR2-GG-PRR1              | 1:9152                                          |
| 5        | 5                        | CR5-GG-PRR1              | .>1:100                                         |
| 6        | 5                        | PRR1-GG-CR5              | >1:100                                          |
| 7        | 5                        | CHR-GG-CR2               | 1:5616                                          |
| 8        | 5                        | CR2-GG-CHR               | 1:2700                                          |

## Взаимодействие антител против пептидных иммуногенных конструкций с препаратами оболочечных белков ВГС

Тестирование содержащих антипептидные антитела сывороток крови крыс на наличие антител, способных взаимодействовать с полноразмерными оболочечными белками ВГС, показало, что из 23 сывороток 7 (1,3; 1,4; 1,5; 2,1; 2,3; 2,4; 8,1; первая цифра – номер группы, вторая – номер животного) содержат антитела, взаимодействующие с белком E2, и 8 (1,3; 1,4; 1,5; 2,1; 2,3; 2,4; 7,1; 8,1) – антитела, взаимодействующие с гетеродимером E1E2 (рис.2). Наиболее эффективно взаимодействовали с оболочечными белками ВГС антитела из антисывороток, полученных при гипериммунизации пептидами 1 и 2. В антисыворотках 1a,3; 1,1; 2,2; 2,5; 3,3; 3,4; 4,1; 4,2; 4,4; 7,1; 8,4 антитела к полноразмерному оболочечному белку E2 и гетеродимеру E1E2, возможно, присутствуют, но в малых количествах либо с низкой аффинностью (значения оптической плотности при взаимодействии сывороток с E2 и E1E2 незначительно превышали значения оптической плотности контрольных проб).

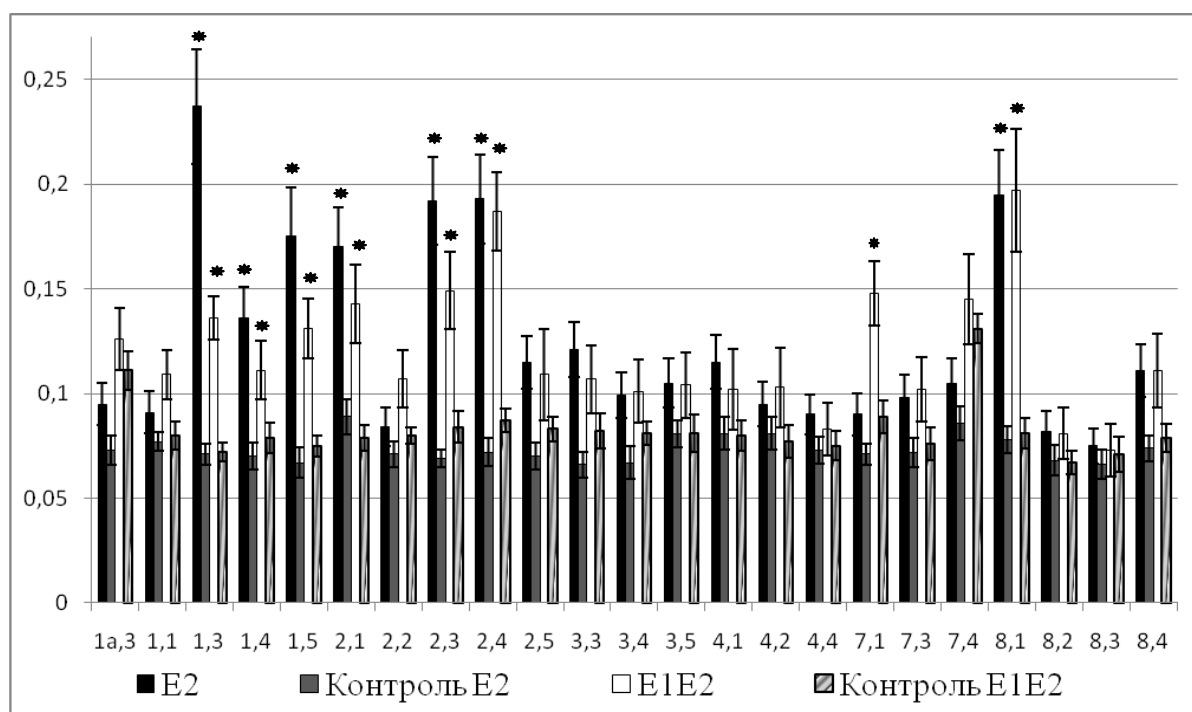


Рис. 2. Взаимодействие антител из сывороток крыс, иммунизированных Т-В-эпитопными конструкциями, с оболочечными белками ВГС (в разведении 1:50). Эксперимент ставили в 3 параллелях. \* -  $p < 0,5$  по сравнению с контролем (преимунная сыворотка животных).



Действительно, выделенные и сконцентрированные препараты IgG из антисывороток 1,1; 1,3; 1,4; 1,5; 4,1; 2,2; 2,3; 2,4; 3,3; 3,4; 4,1; 4,2; 4,4; 7,1; 7,1; 7,4 более эффективно связывали E2 и E1E2 (рис. 3). Невысокую эффективность взаимодействия антител против конструкций №№ 1-4 с оболочечными белками E2 и E1E2 изолята Н(1а) ВГС можно по крайней мере частично объяснить тем, что В-эпитопные части полученных нами конструкций имеют отличия в аминокислотной последовательности от аналогичных фрагментов оболочечных белков изолята Н(1а). Так, использованный нами фрагмент CR3 отличается на 1 аминокислотный остаток (His→Tyr) от соответствующего фрагмента изолята Н(1а), а фрагмент PRR1 отличается на два аминокислотных остатка от соответствующего участка в изоляте Н(1а): Ser→Asp и Asp→Glu. Фрагмент же CHR, использованный нами в пептидных конструкциях №7 и 8, не отличается по аминокислотной последовательности от соответствующего фрагмента в белке E2 изолята Н(1а) ВГС. Низкая эффективность связывания белков E2 и E1E2 антителами, полученными против конструкций №7 и 8, может объясняться либо низкой концентрацией антител против В-эпитопной части этих конструкций (то есть фрагмента CHR), либо не вполне адекватным моделированием фрагментом CHR конформации данного участка в молекуле белка E2.

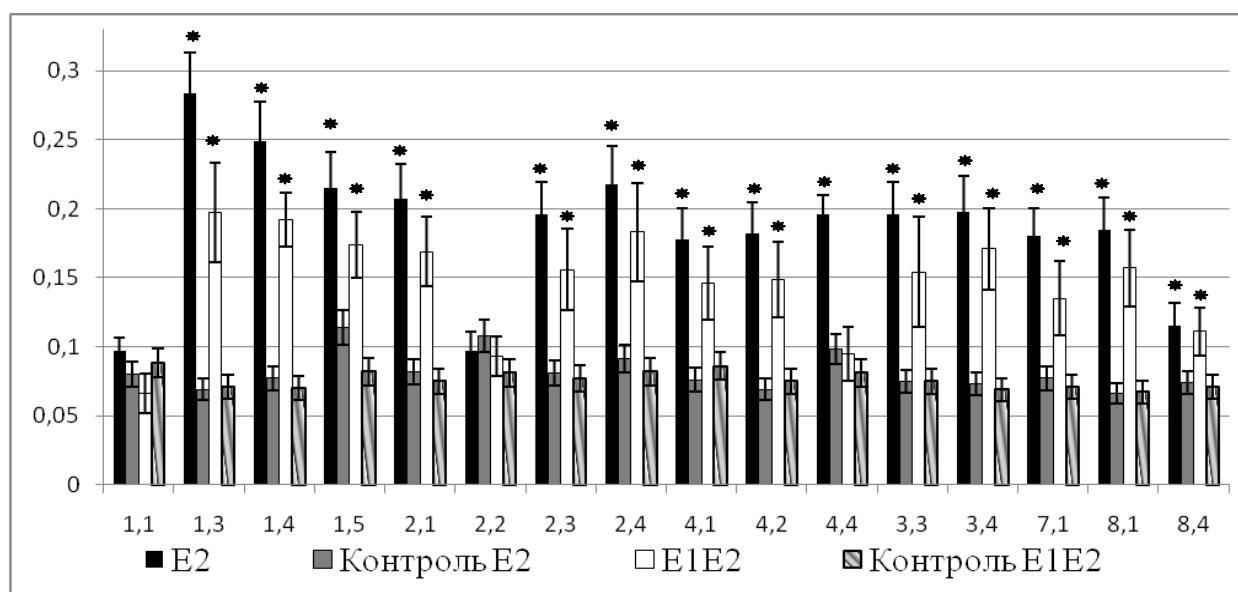


Рис 3. Взаимодействие препаратов IgG из сывороток крови крыс, иммунизированных Т-В-эпитопными конструкциями, с оболочечными белками ВГС (разведение сывороток 1:50). \* -  $p < 0,5$  по сравнению с контролем (преимунная сыворотка животных).

Тем не менее, полученные результаты демонстрируют принципиальную возможность индукции иммунного ответа с образованием антител, специфично взаимодействующих с оболочечными белками ВГС, в результате иммунизации синтетическими пептидными Т-В-эпитопными конструкциями, разработанными *in silico*.

### **Исследование иммуногенности смеси пептидных Т-В-эпитопных конструкций**

Крыс (4 особи) иммунизировали смесью иммуногенных конструкций №№ 1-4, 7 и 8 с АФ в режиме гипериммунизации. Данные пептидные конструкции смешивали в равных долях (по массе): в 100 мкг смеси содержалось по 16,6 мг каждого пептида. Иммунизацию и получение сыворотки проводили так же, как и в случае отдельно взятых пептидных конструкций. В таблице 7 приведены результаты определения титров антител в сыворотках крови крыс, иммунизированных смесью конструкций, против каждой отдельно взятой конструкции.

Таблица 7. Титры антипептидных антител к иммуногенным конструкциям при иммунизации смесью конструкций с АФ.

| № группы | Кол-во животных в группе | Иммуногенная конструкция | Среднее геометрическое значение титров в группе к конструкции |
|----------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 9        | 4                        | CR2-GG-CHR               | 1:8100                                                        |
|          |                          | CHR-GG-CR2               | 1:3894                                                        |
|          |                          | CR3-GG-CR2               | 1:24300                                                       |
|          |                          | CR2-GG-CR3               | 1:24300                                                       |
|          |                          | PRR1-GG-CR2              | 1:2700                                                        |
|          |                          | CR2-GG-PRR1              | 1:1872                                                        |

У трех животных после иммунизации смесью конструкций появились антитела против всех конструкций, входивших в состав смеси. У одного животного антипептидных антител ни к одной конструкции не обнаружено. Величины титров антител свидетельствуют о том, что иммунизация смесью конструкций вызывает столь же эффективную продукцию специфических антител

к каждой из конструкций, что и иммунизация каждой конструкцией в отдельности в 6 раз более высокой дозе.

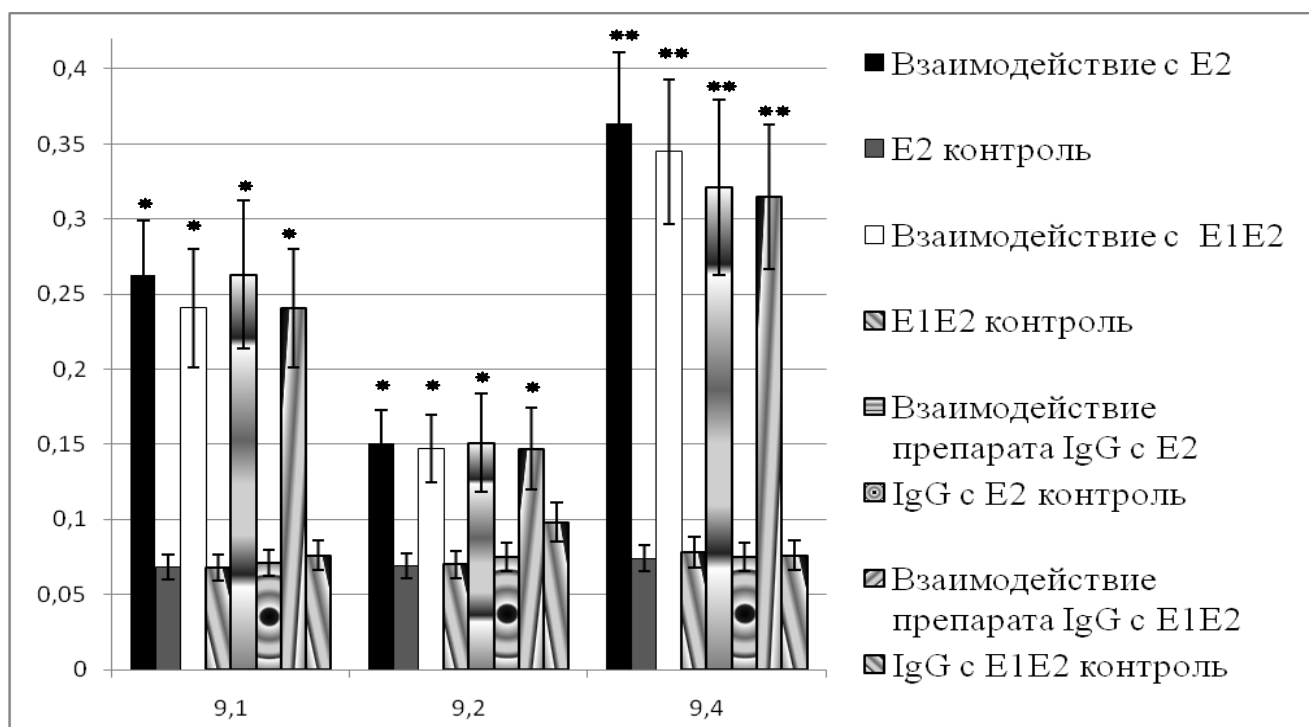


Рис. 4. Взаимодействие антисывороток и препаратов IgG из сывороток крыс, иммунизированных Т-В-эпитопными конструкциями, с оболочечными белками ВГС (разведение сывороток 1:50). \* -  $p < 0,5$ , \*\* -  $p < 0,1$  по сравнению с контролем (преимунная сыворотка).

Тестирование антисывороток и препаратов IgG, полученных против смеси иммуногенных конструкций, на взаимодействие с оболочечным белком E2 и гетеродимером E1E2, показало, что в сыворотках всех трёх животных, развивших В-клеточный иммунный ответ против смеси иммуногенных конструкций, присутствуют антитела, взаимодействующие с оболочечными белками ВГС (рис. 4). Более высокую иммуногенность смеси конструкций по сравнению с каждой конструкцией в отдельности можно объяснить присутствием дополнительных Th-эпитопов в других конструкциях, а более высокую связывающую активность по отношению к оболочечным белкам ВГС - наличием более широкого спектра антител к большему количеству участков оболочечного белка E2. Следует отметить, что наиболее иммуногенными в составе смеси оказались, как и при иммунизации отдельными конструкциями, пептиды 1 и 2. Возможно, в данных

конструкциях удалось наиболее точно смоделировать фрагмент оболочечного белка E2 ВГС.

### **Взаимодействие препаратов IgG, полученных против пептидных иммуногенных конструкций, с нативными вирусными частицами**

Для данного эксперимента препараты IgG от разных животных внутри одной группы объединяли в единые образцы: **1** (1,3; 1,4; 1,5), **2** (2,1; 2,3; 2,4), **3** (3,3; 3,4), **4** (4,1; 4,2; 4,4), **7** (7,1), **8** (8,1; 8,4), **9** (9,1; 9,2; 9,4). На первом этапе исследования был проведен качественный анализ взаимодействия сорбированных на поверхности микропробирок IgG с нативными вирусными частицами, при этом связывание иммуноглобулинами вирусных частиц регистрировали с помощью электрофоретической детекции продуктов ПЦР после реакции обратной транскрипции. В данном исследовании использовали плазму крови пациента №1 с хроническим гепатитом С. Как видно на электрофореграмме (рис.5.), IgG из образцов 1, 2, 3, 4, 9 эффективно связывали вирусные частицы из плазмы крови, поскольку в соответствующих дорожках присутствуют специфические светящиеся полосы на уровне 240 п.н. Препараты IgG из образцов 7 и 8 достаточно слабо взаимодействовали с вирусными частицами либо содержали значительно меньшее количество специфических антител. Из полученных результатов можно сделать вывод, что большая часть препаратов антипептидных антител к иммуногенным конструкциям содержит молекулы иммуноглобулинов, способные специфично связывать нативные вирусные частицы.

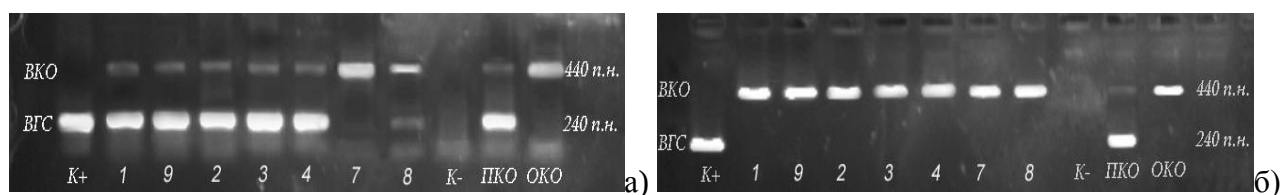


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации: а) РНК ВГС из вирусных частиц, связанных IgG из гипериммунных сывороток, б) контроль IgG из преиммунных сывороток.

Для сравнительной количественной оценки эффективности связывания частиц ВГС из крови больных антипептидными IgG из сывороток крови гипериммунизированных животных использовали реакцию обратной транскрипции РНК ВГС и ПЦР-амплификацию кДНК ВГС с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». В этом исследовании также использовали объединённые препараты IgG (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9) от разных животных из одной группы. Для того чтобы оценить эффективность связывания вирусных частиц различными препаратами IgG, сравнивали количество вирусных частиц, присутствующих в образцах плазмы, с количеством вирусных частиц, связанных IgG. Образцы плазмы пациентов подвергали такой же обработке в тех же условиях. Количество вирусных частиц, связавшихся с IgG, равнялось количеству копий обнаруженной РНК ВГС в микропробирках с сорбированными на их внутренней поверхности IgG. Это количество копий РНК рассчитывали по калибровочным графикам, построенным при использовании ДНК-калибраторов, амплификация которых проходила в тех же условиях. Значения концентраций вирусных частиц, сорбированных препаратами IgG приведены в таблице 8.

По результатам проведенного эксперимента, представленным в таблице 8, видно, что наибольшее количество вирусных частиц связывают IgG из антисывороток, полученных после гипериммунизации животных пептидами 1 и 2, а также смесью иммуногенных конструкций. Препарат IgG, полученный после иммунизации смесью пептидных конструкций содержит большее количество антител, специфически взаимодействующих с оболочечными белками ВГС и потому более эффективно связывает и вирусные частицы. Иммуногенные конструкции 1 и 2 содержат в качестве В-эпитопной части фрагмент CR3, имеющий наиболее консервативную аминокислотную последовательность из всех трёх В-эпитопных фрагментов, использованных в иммуногенных конструкциях 1-4, 7 и 8, и потому препараты IgG, содержащие антитела против данного фрагмента, весьма эффективно связывают вирусные частицы, принадлежащие к разным изолятам ВГС. В то же время В-эпитопные фрагменты конструкций 3 и 4, 7 и 8 обладают меньшей консервативностью первичной структуры, и потому полученные против этих конструкций антитела с различной эффективностью связывают вирусные частицы, принадлежащие к разным изолятам ВГС. Таким образом, антитела, вырабатываемые против участка CR3, по всей видимости,

будут обладать широкой специфичностью по отношению к различным изолятам ВГС.

Таблица 8. Количество РНК в препаратах вирусных частиц, полученных после сорбции на антипептидных антителах.

| Обозначение образца | Количество (МЕ) РНК ВГС, связанной препаратами IgG | Концентрация РНК в образце плазмы / концентрация РНК из связанных IgG вирусных частиц |
|---------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| IgG гр.1+№1         | 258                                                | 38                                                                                    |
| IgG гр.9+№1         | 126                                                | 78                                                                                    |
| IgG гр.2+№1         | 399                                                | 25                                                                                    |
| IgG гр.3+№1         | 149                                                | 66                                                                                    |
| IgG гр.4+№1         | 771                                                | 127                                                                                   |
| IgG гр.8+№1         | 294                                                | 33                                                                                    |
| IgG гр.7+№1         | 91,9                                               | 107                                                                                   |
| IgG гр.1+№5         | 377                                                | 72                                                                                    |
| IgG гр.9+№5         | 1460                                               | 19                                                                                    |
| IgG гр.2+№5         | 160                                                | 169                                                                                   |
| IgG гр.3+№5         | 163                                                | 166                                                                                   |
| IgG гр.4+№5         | 91                                                 | 295                                                                                   |
| IgG гр.1+№7         | 820                                                | 110                                                                                   |
| IgG гр.9+№7         | 3770                                               | 24                                                                                    |
| IgG гр.2+№7         | 1880                                               | 48                                                                                    |
| IgG гр.3+№7         | 50                                                 | 1799                                                                                  |
| IgG гр.4+№7         | 135                                                | 667                                                                                   |
| IgG гр.1+№9         | 526                                                | 7                                                                                     |
| IgG гр.9+№9         | 99                                                 | 38                                                                                    |
| IgG гр.2+№9         | 119                                                | 32                                                                                    |
| IgG гр.3+№9         | 215                                                | 18                                                                                    |
| IgG гр.4+№9         | 103                                                | 37                                                                                    |
| IgG гр.1+№11        | 600                                                | 8                                                                                     |
| IgG гр.9+№11        | 526                                                | 9                                                                                     |
| IgG гр.2+№11        | 160                                                | 31                                                                                    |
| IgG гр.3+№11        | 14                                                 | 355                                                                                   |
| IgG гр.4+№11        | 108                                                | 46                                                                                    |

### **Размер частиц в растворах иммуногенных конструкций**

Для пептидов длиной менее 50 аминокислотных остатков столь высокая иммуногенность полученных нами синтетических пептидных конструкций необычна. Такая иммуногенность характерна для полипептидов с молекулярной массой не менее 10 кДа. Поскольку полученные нами пептидные конструкции имеют в своём составе более гидрофильную В-эпитопную часть и более гидрофобную Т-эпитопную часть, и таким образом представляют собой

амфифильные молекулы. Логично предположить, что в растворе эти молекулы могут собираться в мицеллоподобные мультимеры, на поверхности которых экспонируются гидрофильные группы, формирующие В-эпитопы иммуногенных конструкций. Образование таких надмолекулярных комплексов может способствовать повышению иммуногенности конструкций за счёт многоточечного взаимодействия с иммунокомпетентными клетками, опсонизации этих комплексов антителами и, как следствие, увеличения эффективности презентации пептидных антигенов, а также повышения устойчивости пептидов к действию ферментов в ходе иммунизации. Для подтверждения данного предположения были определены диаметры частиц иммуногенных конструкций в водном растворе с использованием субмикронного анализатора диаметров частиц N5 компании Beckman Coulter. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 10. Размеры частиц в растворах иммуногенных конструкций

| № пептида | Средняя величина d, нм | Содержание частиц в растворе % |
|-----------|------------------------|--------------------------------|
| 1         | 8                      | 90                             |
| 2         | 8                      | 90                             |
| 3         | 9                      | 85                             |
| 4         | 9                      | 80                             |
| 7         | 9                      | 95                             |
| 8         | 9                      | 90                             |

Из приведённых результатов видно, что пептидные конструкции в растворе образуют мультимеры с диаметром частиц от 6 до 22 нм, в среднем 8-9 нм. Частицы такого диаметра соответствуют молекулам глобулярных белков с молекулярной массой от 40 до свыше 1000 кДа (Соколов и др., 2009) и, следовательно, могут содержать от 10 до нескольких сотен молекул пептидов. Такая мультимеризация может быть по крайней мере одной из причин высокой иммуногенности составленных нами из высококонсервативных фрагментов белка E2 синтетических пептидных конструкций.

## **Заключение**

В данной работе экспериментально подтверждена принципиальная возможность создания полностью синтетических пептидных иммуногенных конструкций из отдельных фрагментов оболочечных белков ВГС. Впервые удалось получить высокоиммуногенные пептидные конструкции, составленные из высококонсервативных фрагментов оболочечного белка Е2, способные вызывать образование специфических антител, взаимодействующих не только с самими конструкциями и их В-эпитопными частями, но и связывающих оболочечные белки и вирусные частицы разных изолятов ВГС. Эти конструкции являются оригинальной разработкой, основанной на выполненных ранее исследованиях по структурно-функциональному картированию оболочечных белков ВГС в лаборатории белковой инженерии ИБМХ РАМН (Sobolev et al., 2000; Olenina et al., 2002, 2005; Кузьмина и др., 2009).

Разработанные и исследованные в данной работе синтетические пептидные конструкции могут служить практической и теоретической основой для разработки пептидной вакцины против гепатита С. Под практической основой понимается использование данных пептидных конструкций как готовых иммуногенов вакцины, под теоретической – применение их в качестве шаблона для разработки новых подобных конструкций, обладающих иной В- и Т-эпитопной специфичностью. Поскольку, как показали результаты данной работы, смесь пептидных конструкций, содержащих разные В- и Т-эпитопы, более эффективна как иммуноген, способный вызывать образование белок- и вирус-специфичных антител и стимулировать Т-лимфоциты, включение дополнительных В-Т-эпитопных пептидных конструкций может повысить иммуногенность композиции и способность вызывать антитела, специфически взаимодействующие с различными изолятами ВГС. При этом, возможно, какие-то наименее эффективные конструкции из числа разработанных будут исключены.



## Выводы

1. Из предполагаемых В-эпитопов и предсказанных Т-эпитопов, являющихся высококонсервативными фрагментами оболочечного белка Е2 вируса гепатита С, сконструированы и получены в виде синтетических препаратов 6 новых потенциально антигенных пептидных конструкций.
2. Внесена модификация в методику и разработан новый регламент твердофазного пептидного синтеза с использованием 4-метилпиперидина вместо пиперидина для удаления защитных групп с альфа-аминогрупп растущей пептидной цепи.
3. Показана высокая иммуногенность шести из 8 исследованных синтетических пептидных конструкций в опытах по иммунизации крыс. Показано, что данные синтетические пептидные конструкции в водных растворах могут существовать в форме олигомеров.
4. Показано, что при иммунизации пептидными конструкциями CR2-GG-CR3, CR3-GG-CR2, CHR-GG-CR2, CR2-GG-CHR, CR2-GG-PRR1, PRR1-GG-CR2 образуются антитела, взаимодействующие с оболочечным белком Е2 ВГС и гетеродимером Е1Е2 ВГС.
5. Полученные в результате иммунизации антипептидные антитела связывали нативные вирусные частицы из плазмы больных ВГС.

## Список сокращений

АФ – адъювант Фрейнда

ВГС – вирус гепатита С

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

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

ESI ORBITRAP MS и MS/MS – масс-спектрометрия (простая и tandemная) с ионизацией электрораспылением и детекцией с помощью орбитальной ионной ловушки.

### **Список опубликованных работ по теме диссертации**

1. Мойса А.А., Фарафонова Т.Е., Колесанова Е.Ф. Перспективы использования высококонсервативных фрагментов оболочечных белков вируса гепатита С в синтетических пептидных вакцинах // «Мир вирусных гепатитов». 2009. №2. Ч.2. С.70.
2. Колесанова Е.Ф., Фарафонова Т.Е., Мойса А.А. Пептидные иммуногены и вакцины: принципы разработки // Материалы IV Российского симпозиума “Белки и пептиды”. 2009. С.105.
3. Moisa A.A., Farafonova T.E., Kolesanova E.F. Prospects for the use of hepatitis C virus envelope protein highly conserved sites in peptide vaccines // Materials of The 12th SAC Seminar «Combating Global Infections». 2009. P. 39.
4. Арчаков А.И., Сторожаков Г.И., Колесанова Е.Ф., Фарафонова Т.Е., Мойса А.А. Вакцина против гепатита С // Сборник докладов VI Международная конференции “Молекулярная медицина и биобезопасность». Москва. 2009. С. 37 – 38.
5. Алешина Е.Ю., Пындык Н.В., Мойса А.А., Санжаков М.А., Харыбин О.Н., Николаев Е.Н., Колесанова Е.Ф. Синтез фрагмента  $\beta$ -амилоида 5RHDSGY10 и его изомеров // Биомедицинская химия. 2008. Т.54, №2. С. 154 – 166.
6. A. A. Moisa and E. F. Kolesanova. Synthetic peptide vaccines. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2010. V. 4, № 4. P. 321 – 332.