



УДК 577.112.6

ВЫЯВЛЕНИЕ В-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЭЛИМИНАЦИЕЙ ВИРУСА

© 2026 г. М. Д. Стучинская*, **, #, Л. И. Николаева*, А. Н. Белявцев*, **,
Н. Г. Шевченко*, В. В. Куприянов*, ***, Н. С. Шастина**

* ФГБУ “Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России,
Россия, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18

** ФГБОУ ВО “МИРЭА – Российский технологический университет” – Институт тонких химических
технологий им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

*** ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” – Институт биоинженерии РАН,
Россия, 119071 Москва, просп. 60-летия Октября, 7

Поступила в редакцию 28.07.2025 г.

После доработки 10.08.2025 г.

Принята к публикации 12.08.2025 г.

Хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ВГС), может привести к печеночной недостаточности, циррозу печени и гепатоцеллюлярной карциноме. Два вирусных оболочечных гликопротеина Е1 и Е2 участвуют в процессе проникновения ВГС в клетки хозяина и выступают мишенями для вируснейтрализующих антител. Наличие антител к комплексу Е1Е2 до начала лечения, как было продемонстрировано другими авторами, было ассоциировано с достижением устойчивого вирусологического ответа (УВО) у 70% пациентов после терапии противовирусными препаратами прямого действия (ПППД), т.е. может быть предиктивным маркером ($p = 0.012$). Однако до сих пор не выяснена возможная предиктивная роль отдельных В-эпитопов оболочечных белков ВГС. Цель исследования – выявить антитела к пептидам, воспроизводящим консервативные В-клеточные эпитопы оболочечных белков Е1 и Е2, оценить их значимость для прогноза элиминации вируса. Синтез девяти пептидов из оболочечных белков вируса проводили твердофазным методом. Иммунореактивность пептидов анализировали методом иммуноферментного анализа с использованием сывороток крови 9 участников с острым и 67 участников с хроническим гепатитом С, которым была проведена терапия ПППД. По результатам исследования показано, что наличие антител к двум пептидам, воспроизводящим консервативные иммунодоминантные В-эпитопы белка Е2, ассоциировано с достижением УВО у 73.0 и 89.2% пациентов ($p = 0.00001$ и $p = 0.0086$), что позволяет рассматривать наличие антител к ним как положительный прогностический маркер. Полученные данные могут быть использованы при совершенствовании методов прогнозирования исходов терапии, формировании персонализированных подходов к лечению и разработке вакцинных препаратов против гепатита С.

Ключевые слова: гепатит С, оболочечные белки, вируснейтрализующие антитела, моделирование консервативных В-клеточных эпитопов, твердофазный пептидный синтез, иммунореактивность, предиктивный маркер

DOI: 10.7868/S1998286026010081

ВВЕДЕНИЕ

Вирусный гепатит С – повсеместно распространенное инфекционное заболевание, которым, по данным Всемирной организации здравоохранения, страдает ~50 млн человек в мире [1]. При этом

ежегодно регистрируется ~1 млн новых случаев инфицирования. В 2024 г. показатель заболеваемости хроническим гепатитом С (ХГС) в России составил 34.86 на 100 тыс. населения, что выше, чем в 2023 г. (31.63 на 100 тыс. населения) [2], причем заболе-

Сокращения: ВГС – вирус гепатита С; ВНА – вируснейтрализующее антитело; МКА – моноклональное антитело; ОГС – острый гепатит С; ОП – оптическая плотность; ОШ – отношение шансов; ПППД – противовирусные препараты прямого действия; УВО – устойчивый вирусологический ответ; ХГС – хронический гепатит С; 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

Автор для связи: (эл. почта: mayastaya@mail.ru).

ваемость ХГС превышает заболеваемость хроническим гепатитом В в 3.7 раза. После острой фазы инфекции, вызываемой вирусом гепатита С (ВГС), в ~70–85% случаев развивается ХГС, который может привести к циррозу печени и гепатоцеллюлярной карциноме [1].

С момента открытия ВГС в 1989 г. были достигнуты значительные успехи в изучении вируса и лечении вызываемой им инфекции. С 2014 г. в нашей стране стала применяться новая эффективная терапия гепатита С, основанная на противовирусных препаратах прямого действия (ПППД). Эти препараты направлены на белки ВГС, специфически блокируют их функциональную активность и прерывают цикл репликации вируса. Максимальная эффективность терапии достигается, когда пациенты проходят лечение на ранней стадии до выраженного фиброза или цирроза печени [3]. Устойчивый вирусологический ответ (УВО) достигается в среднем в 95% случаев [4, 5]. Однако из-за высоких затрат на препараты и значительной доли невыявленных диагнозов лечением охвачено ~10% инфицированных в мире, что характерно и для нашей страны [6].

Установлено, что у выздоровевших после острой инфекции не формируется длительный протективный иммунитет и существует риск реинфекции. Как показано ранее, в случае повторного инфицирования процесс клиренса (элиминации) вируса ускоряется на ~80%, наблюдается быстрое увеличение титров вируснейтрализующих антител (ВНА), полиспецифичный и поликлональный ответ В-клеток и CD8⁺ Т-клеток, менее длительное течение инфекции и снижение максимального уровня вирусной нагрузки, что свидетельствует о значении адаптивного иммунитета [7]. В последние годы исследователи проявляют интерес к разработкам, направленным на создание синтетических эпитопных вакцин от гепатита С с использованием консервативных и вируснейтрализующих антигенных детерминант разных белков вируса. Предполагается, что комбинация Т-хелперных, Т-киллерных и В-клеточных эпитопов из наиболее иммуногенных антигенов ВГС может стать кандидатным вариантом профилактической и/или терапевтической вакцины против гепатита С [8].

Элиминация вируса при ОГС находится в прямой зависимости от быстрого появления циркулирующих ВНА [9]. Однако высокие титры ВНА также наблюдаются у большинства хронически инфицированных пациентов, но они не способны контролировать инфекцию [10]. Считается, что главная причина этой неспособности – высокая

частота аминокислотных замен в структуре оболочечных белков, что приводит к ускользанию от антител. Поэтому актуально изучение роли отдельных консервативных В-эпитопов оболочечных белков в ограничении ВГС-инфекции. Исследование эпитопов оболочечных белков ВГС имеет важное практическое значение для разработки новых диагностических тестов, создания вакцин, разработки терапии и мониторинга иммунного ответа при лечении.

Оболочечный белок Е1 участвует в процессе проникновения вируса в клетки-мишени, взаимодействуя с клеточными рецепторами, такими как клаудин-1, клаудин-6 и CD36 (скэвенджер-рецептор). Установлены основные иммуногенные области белка Е1, служащие мишенями ВНА: N-концевая область 192–207 а.о. (против нее получено моноклональное антитело Н-111 со слабой нейтрализующей активностью) и область 313–328 а.о. (против нее получены нейтрализующие моноклональные антитела (МКА) IGH505 и IGH526). Помимо этих двух областей, Colbert et al. идентифицировали антигенный сайт 112, охватывающий 215–299 а.о., на который нацелено МКА НЕРС112, имеющее нейтрализующую активность против семи штаммов ВГС [11].

Второй оболочечный гликопротеин Е2 обеспечивает контакт вируса, связываясь с клеточными рецепторами CD81 и SR-B1. В течение последнего десятилетия были выявлены новые важные факты по локализации антигенных детерминант белка Е2, что позволило создать его антигенный “портрет” [12]. Нейтрализующая поверхность белка Е2 представляет собой преимущественно гидрофобную зону, которая сформирована 421–459 и 519–535 а.о. и состоит из высококонсервативных участков.

Было высказано предположение, что основной механизм нейтрализации ВГС – нарушение взаимодействия между Е2 и рецептором CD81 [13]. В процессе проникновения вируса после связывания с CD81 и формирования эндосомы интерфейс гликопротеинового комплекса Е1Е2 дестабилизируется при низком рН в эндосоме, вызывая конформационные изменения, приводящие к экспонированию и внедрению пептида слияния в эндосомальную мембрану. Таким образом, ВНА могут либо блокировать связывание CD81 путем прямой конкуренции, либо, если они связываются за пределами сайта контакта с рецептором, могут нарушать конформационные изменения, необходимые для слияния. Сайт связывания CD81 состоит из консервативной N-концевой области; области переднего слоя, состоящей из короткой α-спирали;

соседней области, названной CD81-связывающей петлей. Большинство антител, нейтрализующих ВГС, специфичны к конформационным эпитопам. Однако было показано, что антитела, специфичные к линейным эпитопам, также нейтрализуют широкий спектр циркулирующих штаммов вируса гепатита С. По крайней мере, человеческое МКА HCV1, которое распознает консервативный линейный эпитоп 412–423, обеспечило защиту шимпанзе от экспериментального инфицирования разными генотипами ВГС [14].

Цель данного исследования – выявить антитела к пептидам, воспроизводящим консервативные линейные В-клеточные эпитопы оболочечных белков E1 и E2 ВГС, и оценить их возможную значимость для прогноза элиминации вируса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Опираясь на накопленные данные по антигенной структуре оболочечных белков ВГС, были отобраны девять ключевых В-клеточных эпитопов. Выбор эпитопов осуществляли с учетом следующих критериев: консервативность последовательности в различных генотипах вируса, способность вызывать сильный иммунный ответ, показанная ассоциация с самопроизвольным выздоровлением при ОГС, наличие ранее выявленных ВНА к этим эпитопам. Эпитопы были получены методом твердофазного синтеза на смоле Ванга в ручном режиме по Fmoc-протоколу. После синтеза пептиды очищали методом офВЭЖХ с использованием УФ- и масс-спектрометрического детектирования для идентификации целевых пептидов и примесей, лиофильно высушивали. Чистота полученных препаратов пептидов по данным аналитической офВЭЖХ составила >95%.

Пептиды (I) и (II) воспроизводили консервативные иммуногенные эпитопы из E1, а пептиды (III–IX) – консервативные (или использовались консенсусные последовательности) иммуногенные эпитопы из E2, охватывающие области нейтрализующей поверхности [12, 15–20]. Данные о выбранных пептидах представлены в табл. 1.

Способность синтезированных пептидов реагировать с сыворотками ВГС-инфицированных пациентов (иммунореактивность) анализировали методом твердофазного иммуоферментного анализа. Иммунореактивность оценивали как коэффициент позитивности (КП) и рассчитывали по показаниям оптической плотности (ОП) образцов относительно пороговой величины ОП. Группу пациентов с острым гепатитом С (ОГС) составили 9 человек (в возрасте 24–46 лет; 3 мужчины и 6 женщин). Участники с ХГС, получавшие терапиюПППД, составили вторую группу ($n = 67$), диапазон возраста 25–67 лет (42 мужчины, 25 женщин). После терапии 37 (55.2%) участник достиг УВО, 30 участников (44.8%) завершили терапию безуспешно. Стадии фиброза F3 и F4 отмечены у 17 участников, у остальных – от F0 до F2.

На рис. 1 представлена частота выявления антител к отдельным пептидам в группах с ОГС и ХГС.

Наиболее часто антитела выявлялись к пептидам (III) и (VIII), в то время как пептид (VII) показал низкую иммунореактивность. Как наглядно демонстрирует рис. 1, антитела к пептиду (III) чаще выявлялись в остром периоде инфекции, чем в хроническом ($p < 0.05$). Однако следует отметить, что группа с ОГС была значительно меньше, что группа с ХГС.

Таблица 1. Локализация пептидов, выбранных для синтеза

Пептид	Локализация, а.о.	Аминокислотная последовательность	Ссылки
(I)	E1: 244–260	PTLAARNASVPTTTIR	[15]
(II)	E1: 313–327	VSGHRMAWDMMMNWS	[15, 16]
(III)	E1-E2: 381–393	GVDAETHVTGGSAA	[17]
(IV)	E2: 395–411	RTTSGLTSLFSPGAKQN	[17]
(V)	E2: 412–422	QLINTNGSWHI	[12, 20]
(VI)	E2: 434–446	NTGFIASLFYTHK	[12, 20]
(VII)	E2: 484–499	PYCWHYAPKPCGIVSA	[15, 16, 19]
(VIII)	E2: 524–535	APTYSWGENETD	[12, 20]
(IX)	E2: 554–569	WMNSTGFTKTCGGPPC	[15, 16]

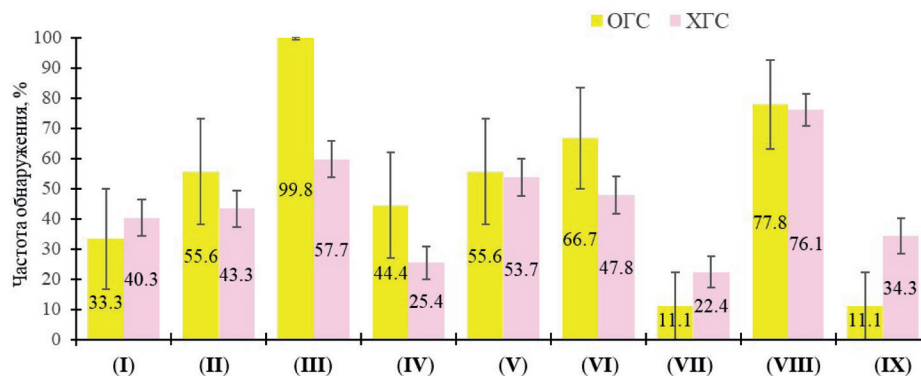


Рис. 1. Частота обнаружения антител к пептидам (I–IX) у участников с острым (ОГС) и хроническим гепатитом С (ХГС).

У 64 из 67 пациентов (95.5%) с ХГС были обнаружены антитела к исследуемым пептидам. У большинства положительных образцов сывороток (73.4%) наблюдали низкий коэффициент позитивности антител – от 1 до 10.

У всех участников с ОГС были обнаружены антитела к отдельным пептидам. Наиболее часто у больных ОГС выявляли антитела к пептидам (III), (VI) и (VIII). Группа пациентов с ОГС была взята на мониторинговое наблюдение, у двух участников доказана самопроизвольная элиминация вируса длительным отсутствием РНК (3–4 года). У одного из них во время ОГС были выявлены антитела ко всем девяти пептидам в достаточно высоких титрах – 1 : 80 (I), 1 : 160 (II, IV, V, VI, IX), 1 : 320 (VII, VIII) и 1 : 640 (III). У второго участника с самоэлиминацией вируса были обнаружены антитела к шести пептидам ((II), (III), (IV), (V), (VI) и (VIII)), однако титры были низкими – 1 : 10. Очевидно, это свидетельствует о вкладе антител в ограничение ВГС-инфекции и согласуется с результатами других авторов [9, 15, 19, 20].

Virlogeux et al. продемонстрировали, что наличие антител к комплексу E1E2 до начала лечения ассоциировано с достижением УВО после терапииППД у 70% пациентов, т.е. может быть предиктивным маркером (ОШ = 2.82; 95% ДИ: 1.27–6.47; $p = 0.012$) [21]. Поэтому следующей задачей было обнаружение взаимосвязи между наличием антител к отдельным пептидам и результатом терапии, что ранее никем не было показано. В табл. 2 представлены данные по частоте выявления антител у участников, достигших УВО и завершивших терапию unsuccessfully.

Первичный анализ данных показал вариабельность частоты выявления антител к различным пептидам между группами. Наибольшая разница наблюдалась для пептида (VI) (73.0% против 16.7%) и пептида (VIII) (89.2% против 60.0%).

Выявлена статистически значимая взаимосвязь между наличием антител к пептидам (VI) и (VIII) до начала терапии и достижением УВО ($p = 0.00001$; ОШ – 13.50; 95% ДИ: 4.05 – 44.98 и $p = 0.0086$; ОШ – 5.50; 95% ДИ: 1.55–19.57 соответственно). Коэффициенты корреляции между

Таблица 2. Анализ ассоциации между достижением УВО и частотой выявления антител к пептидам

Пептид	Частота выявления антител, %		p -значение	ОШ (95% ДИ)
	участники с УВО ($n = 37$)	участники без УВО ($n = 30$)		
(I)	43.2 (16)	36.7 (11)	0.6245	1.32 (0.49–3.53)
(II)	45.9 (17)	40.0 (12)	0.8045	1.28 (0.48–3.38)
(III)	59.5 (22)	60.0 (18)	1.0000	0.98 (0.37–2.61)
(IV)	32.4 (12)	16.7 (5)	0.1675	2.40 (0.74–7.82)
(V)	54.1 (20)	56.7 (17)	1.0000	0.90 (0.34–2.37)
(VI)	73.0 (27)	16.7 (5)	0.00001	13.50 (4.05–44.98)
(VII)	29.7 (11)	13.5 (4)	0.1450	2.75 (0.77–9.76)
(VIII)	89.2 (33)	60.0 (18)	0.0086	5.50 (1.55–19.57)
(IX)	37.8 (14)	30.0 (9)	0.6076	1.42 (0.51–3.96)

наличием антител и достижением УВО составили 0.561 (средняя сила связи) и 0.340 (умеренная сила связи) для пептидов (VI) и (VIII) соответственно. Более значимо – выявление антител к пептиду (VI), что заметно по параметрам логистической регрессии, особенно по высокой величине ОШ, отражающей, во сколько раз шансы достичь УВО выше при наличии антител к пептиду, чем при их отсутствии.

Синтезированный пептид (I), воспроизводил область белка E1, которую ранее Zibert et al. оценили как иммунологически значимую с частотой обнаружения антител 11–46% в зависимости от групп инфицированных участников [15]. Зона этого эпитопа тесно перекрывается с областью 242–261 а.о. белка E1, которая участвует в связывании ВГС с клетками HepG2 [22]. В нашем исследовании антитела к пептиду (I) были выявлены в 33.3% образцов пациентов с ОГС и 40.3% образцов пациентов с ХГС, что согласуется с данными Zibert et al. [15].

Пептид (II) моделирует область В-клеточного эпитопа белка E1, имеющего консервативную последовательность, на которую формируются антитела с межгенотипной перекрестной нейтрализацией. Было высказано предположение, что нейтрализация может происходить путем блокирования конформационных изменений в гетеродимере E1E2 [23]. В нашем исследовании антитела к пептиду (II) были выявлены в 55.6% образцов пациентов с ОГС и 43.3% образцов пациентов с ХГС. Ранее Zibert et al., анализируя область 311–330 а.о. (близкую к нашему пептиду), показали, что антитела к ней выявляются с частотой 40% у пациентов с самопроизвольным выздоровлением при ОГС и с частотой 58% у пациентов с ХГС [15].

Пептиды (III) и (IV) воспроизводили консенсусные аминокислотные последовательности белка E2 и представляли собой N- и C-концевые участки гипервариабельной области 1 (HVR1) соответственно [24]. HVR1 выступает главным поверхностным антигеном вируса, доминантным эпитопом для нейтрализующих антител, регионом с высокой вариабельностью последовательности и ключевым фактором в формировании хронической инфекции [25]. Антитела, направленные на N-конец, – не нейтрализующие, в то время как антитела, распознающие C-концевую область HVR1, демонстрируют ограниченную нейтрализацию [26]. Процесс проникновения ВГС в клетку начинается со взаимодействия HVR1 с рецептором SR-B1. Было показано, что ранняя продукция антител против HVR1 связана с самопроизвольной элиминацией инфекции в острой фазе гепатита С [27]. Интересно, что несмотря на

чрезвычайно высокое разнообразие последовательностей HVR1, сообщалось о значительной межгенотипной перекрестной реактивности антител на различные варианты последовательности HVR1 [28]. Это может быть связано с тем, что HVR1 содержит консервативные аминокислотные позиции. В нашем исследовании антитела к пептиду (III) были выявлены в 99.8% образцов пациентов с ОГС и 59.7% образцов пациентов с ХГС. Среди всех проанализированных пептидов антитела у больных ОГС наиболее часто обнаруживались на этот пептид, что согласуется с данными других авторов, у которых, однако, частота выявления антител к этому эпитопу была ниже, чем в нашей работе – 29.4% при ОГС и 33.3% при ХГС [17]. Такое расхождение может быть обусловлено разной чистотой полученных пептидных препаратов. В нашем исследовании антитела к пептиду (IV) были выявлены в 44.4% образцов пациентов с ОГС и 25.4% образцов пациентов с ХГС, что согласуется с данными других авторов, у которых частота выявления антител к данному пептиду составила 17.6–48.4% в зависимости от групп пациентов [17].

Пептид (V) воспроизводил консервативный иммунодоминантный В-эпитоп, который выполняет важную роль в формировании комплексов E2 с CD81 [29]. Было обнаружено, что МКА AP33 и 3/11, которые распознают данный участок, эффективно нейтрализуют проникновение вируса [30]. Также были описаны и другие МКА, способные нейтрализовать ВГС, узнающие эту область: человеческие МКА e137, HC33 и HCV1, а также мышинное H77.39, которое помимо нарушения взаимодействия с CD81 также ингибировало связывание SR-B1 с E2. Предполагается, что близость области связывания МКА H77.39 с областью HVR1 приводит к усилению его нейтрализующей активности [31]. Область, воспроизводимая пептидом (V), содержит один сайт гликозилирования (417 а.о.). Среди наших проанализированных образцов антитела к пептиду выявлялись у 55.5% пациентов с ОГС и у 53.7% пациентов с ХГС. Другими авторами было показано, что антитела, направленные на участок 412–423 а.о., выявляются только у 2.5–15% пациентов [32]. Структурная гибкость этого эпитопа может объяснять его умеренную иммуногенность у пациентов, инфицированных ВГС [33]. Анализируя ту же область (412–423 а.о.), Ahsan et al. показали, что на данный пептид были обнаружены антитела с частотой в 43% у пациентов с ХГС и в 21% у участников с самопроизвольным выздоровлением [20].

Пептид (VI) воспроизводит консервативный иммунодоминантный В-эпитоп с потенциальной ролью в спонтанном клиренсе вируса [20], антитела к которому имеют межгенотипную нейтрализующую активность [34]. Данная область E2 участвует во взаимодействии с рецептором CD81 и в других этапах процесса проникновения вируса [35]. Данный эпитоп не имеет аминокислотных замен, приводящих к ускользанию *in vitro* [12]. Среди проанализированных образцов антитела к пептиду были обнаружены нами в 47.8% случаев у пациентов с ХГС и в 66.7% у пациентов с ОГС. Анализируя схожую область (432–443), Ahsan et al. получили данные по частоте выявления антител в 63% у участников с ХГС [20]. В своей работе они также продемонстрировали ассоциацию между наличием антител к данному пептиду и спонтанным ограничением острой фазы инфекции: у участников с самоэлиминацией вируса частота выявления антител к пептиду составила 78%. В нашем исследовании наличие антител к данному пептиду было ассоциировано с достижением УВО на терапиюПППД.

Пептид (VII) воспроизводит участок белка E2, который был описан другими авторами как иммуногенный [36]. Исследования показали, что участок 480–493 гликопротеина E2 – ключевой для связывания с CD81. Этот процесс может способствовать проникновению вируса гепатита С в гепатоциты [37]. Olbrich et al. идентифицировали два МКА с нейтрализующей активностью, ответственных за спонтанное завершение инфекции в острой фазе, эти антитела специфически распознают линейный эпитоп (483–499) [19]. Анализируя область 481–500 а.о. (близкую к нашему пептиду), Zibert et al. показали, что антитела к ней выявляются в 25–55% случаев и более часто – у участников с самопроизвольной элиминацией вируса [15]. В нашем исследовании на данный пептид антитела выявлялись редко – в 11.1–22.4% образцов.

Пептид (VIII) воспроизводит консервативный иммунодоминантный В-эпитоп белка E2. Данный эпитоп расположен внутри петли связывания с CD81 и выступает ключевой мишенью для антител, блокирующих проникновение ВГС. Область 524–529 образует линейный сайт связывания нейтрализующего антитела 1Н8. Для данного эпитопа предложены две возможные конформации: на первую формируются ВНА, а вторая повышает вероятность взаимодействия ВГС с рецептором CD81 и, таким образом, способствует проникновению вируса в гепатоциты печени [38]. В нашем исследовании антитела к пептиду были

выявлены в 76.1% образцов, что выше, чем в работе Ahsan et al., в которой частота обнаружения антител к области 523–532 (близкой к нашему пептиду) составила 30% [20]. Такое расхождение может быть обусловлено как различными группами пациентов, так и недостаточной чистотой пептида. В своей работе Ahsan et al. не приводят данных о методах синтеза и чистоте полученных препаратов, времени сбора сывороток, стадиях фиброза печени инфицированных людей, а также о том, проводилось ли лечение больных ХГС.

Пептид (IX) воспроизводит участок белка E2. В нескольких предыдущих исследованиях других авторов было описано, что эпитоп 551–570 (близкий к нашему) – иммуногенный [36]. В нашем исследовании антитела к пептиду были выявлены в 34.3% образцов. Анализируя область 551–570 а.о., Zibert et al. показали, что частота выявления антител варьировалась от 10% у пациентов с ХГС до 40% у пациентов с самопроизвольным выздоровлением при ОГС [15].

В нескольких предыдущих исследованиях были определены В-эпитопы оболочечных белков, появление антител к которым на ранней стадии ОГС может иметь решающее значение для самопроизвольного выздоровления [15, 19, 20]. Однако из-за бессимптомного течения острой ВГС-инфекции трудно выявить и, следовательно, изучить пациентов на ранней стадии заболевания. Ранее никем не было показано, что наличие антител к данным эпитопам может быть также ассоциировано с эффективностью терапииПППД. В нашем исследовании были выявлены два пептида (VI) и (VIII), антитела к которым достоверно чаще обнаруживались у участников, достигших УВО. На эти пептиды также выявлялись антитела у обоих участников с подтвержденной самоэлиминацией вируса после ОГС. Очевидно, что наличие антител к данным пептидам имеет положительное прогностическое значение для оценки исхода ОГС и терапииПППД. Особая роль пептидов (VI) и (VIII) может быть обусловлена тем, что они располагаются в области, критически важной для проникновения ВГС, участвуют во взаимодействии с ключевым клеточным рецептором CD81, демонстрируют высокую консервативность и иммуногенность, индуцируют ВНА.

Полученные в данном исследовании результаты могут быть использованы для разработки прогностических маркеров эффективности терапии, создания вакцин на основе консервативных эпитопов и оптимизации схем лечения с учетом иммунного статуса пациента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали Fmoc-защищенные L-аминокислоты (Merck, Германия; Macklin Biochemical Technology, Китай): Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Lys(Boc), Tyr(^tBu), Trp(Boc), Thr(^tBu), Cys(Trt), His(Trt), Glu(^tBu), Asp(^tBu), Asn(Trt), Gln(Trt), Ser(^tBu), Arg(Pbf), смолу Ванга с Fmoc-защитой аминокислотной группы (емкость 0.7 ммоль/г), 1,3-диизопропилкарбодиимид (DIC), этиловый эфир циангидроксииминацетата (Охута Pure) (Merck, Германия); пиперидин, триизопропилсилан, этандитиол, трифторуксусную кислоту, пропионовый ангидрид (Acros Organics, Бельгия); цианид калия, нингидрин, фенол (Warrington, Великобритания); растворители диметилформамид (DMF), хлористый метилен, диэтиловый эфир (Химмед, Россия). DMF класса чистоты о.с.ч. дополнительно осушали свежепрокаленными молекулярными ситами 4 Å.

Приборы. Очистку пептидов проводили методом полупрепаративной офВЭЖХ на колонке YMC-Actus Triart C8 (YMC, Швейцария; 250 × 20 мм I.D., S – 5 мкм, 12 нм), хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies, США). Чистоту пептидов подтверждали методом аналитической ВЭЖХ, колонка Reprosilpur Basic C18 (250 × 4.6 мм I.D., S – 5 мкм). Для отдельных стадий ИФА использовали термостатируемый шейкер-инкубатор (Biosan, Латвия), для регистрации результатов – спектрофотометр StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США).

Синтез пептидов. Синтез осуществляли в ручном режиме в стеклянном реакторе с фильтром и трехходовым краником для промывки смолы. При масштабе синтеза 0.25 ммоль в сосуд помещали необходимое количество смолы Ванга, далее наращивали пептидную цепь, последовательно присоединяя аминокислоты, используя метод активированных эфиров и удаляя Fmoc-группу перед присоединением следующей аминокислоты. Применяли конденсирующий агент DIC, а в качестве добавки для снижения возможной рацемизации и повышения эффективности связывания во время образования амидной связи использовали реагент Охута Pure. Полноту прохождения реакции присоединения аминокислот контролировали нингидриновым тестом Кайзера, осуществляли блокирование непрореагировавших аминокислотных групп пропионовым ангидридом в присутствии диизопропилэтиламина (DIPEA) для минимизации образования укороченных пептидов. По окончании синтеза проводили отщепление пептидной цепи от полимера и деблокирование функциональных защитных групп.

Пептиды очищали офВЭЖХ с использованием УФ- и масс-спектрометрического детектирования. Степень чистоты пептидов составила >95%, выходы пептидов – 22–34%.

Иммуноферментный анализ. Сыворотки крови от 76 участников (31 женщина и 45 мужчин) с вирусным гепатитом С (без ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов иной этиологии) были собраны в период с 2016 по 2023 гг. Время сбора сывороток – перед началом терапииПППД, в течение ОГС и после него.

Процедуру иммуноферментного анализа осуществляли в 96-луночных планшетах MaxiSorb (Sovtech, Россия), пептиды сорбировали в лунки в концентрации 20 мкг/мл в 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9.5) на протяжении 16 ч при 4°C. После закрытия участков неспецифического связывания бычьим сывороточным альбумином (1 мг/мл; Sigma, США) в 0.05 М фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) в лунки вносили сыворотки в разведении 1 : 10 (при необходимости выполняли титрование с шагом 2). Дальнейшие этапы выполняли по стандартной методике.

Результаты ИФА регистрировали, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: 450 нм (основной фильтр) и 650 нм (референс-фильтр). Для оценки результатов ИФА определяли пороговую величину ОП как среднее арифметическое значение ОП от 10 отрицательных образцов плюс трехкратная стандартная ошибка среднего.

Для всех образцов сывороток больных рассчитывали коэффициент позитивности как отношение ОП образца к пороговой величине ОП.

РНК вируса выявляли методом ОТ-ПЦР с чувствительностью 15 МЕ/мл (РеалБест РНК ВГС, Вектор-Бест, Россия).

Стадии фиброза печени определяли методом транзистентной фиброэластометрии на приборе Fibroscan FS 502 (Echosens, Франция). Для оценки степени выраженности фиброза использовали шкалу METAVIR.

Статистический анализ. Расчет размера выборки пациентов проводили по методике К.А. Отдельной [39]. При уровне значимости 0.05 и уровне точности “пилотное исследование” объем выборки составляет от 44 до 99. Статистическую обработку полученных данных выполняли, используя пакеты программ Excel (Microsoft, США) и Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. При наличии нормального распределения для оценки досто-

верности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, при ином распределении применяли точный метод Фишера. Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при $p < 0.05$. Для подтверждения значимости также рассчитывали 95%-ный доверительный интервал и отношение шансов. Коэффициент корреляции рассчитывали по общепринятой формуле коэффициента Крамера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были синтезированы девять пептидов, воспроизводящих ключевые иммуногенные В-эпитопы антигенного “портрета” оболочечных белков E1 и E2 ВГС. Полученные пептиды выявляли антитела у пациентов с острым и хроническим гепатитом С. При острой ВГС-инфекции наиболее часто обнаруживались антитела к пептидам (III), (VI) и (VIII), воспроизводящим иммуногенные В-эпитопы белка E2. Наличие антител одновременно к шести и более пептидам было характерно для участников с самопроизвольной элиминацией инфекции в острой фазе. Наличие антител до начала терапии к пептидам (VI) и (VIII), воспроизводящим консервативные иммунодоминантные В-эпитопы из нейтрализующей поверхности белка E2, было ассоциировано с достижением устойчивого вирусологического ответа.

Полученные данные могут быть использованы при совершенствовании методов прогнозирования исходов терапии, формировании персонализированных подходов к лечению и разработке вакцинных препаратов против ВГС.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-20148, <https://rscf.ru/project/25-25-20148/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с использованием животных в качестве объектов исследования.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам, изложенных в Хельсинкской декларации (1975 г., 2013 г.).

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ДПО “Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования” (РМАНПО) Минздрава России (Протокол № 7 от 17.05.2016).

Пациенты дали информированное письменное согласие на использование их сывороток крови в исследовательских целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – МДС, ЛИН, НСШ; экспериментальные работы – МДС, АНБ, НГШ, ВВК; написание статьи – МДС, ЛИН, НСШ; анализ данных – МДС, ЛИН. Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Hepatitis Report 2024: Action for Access in Low- And Middle-Income Countries // WHO. 2024. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672>
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2024 г.: государственный доклад // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М.: 2025. https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=30171
3. Quaranta M.G., Ferrigno L., Monti M., Filomia R., Biliotti E., Iannone A., Migliorino G., Coco B., Morisco F., Vinci M., D'Ambrosio R., Chemello L., Massari M., Ieluzzi D., Russo F.P., Blanc P., Verucchi G., Puoti M., Rumi M.G., Barbaro F., Santantonio T.A., Federico A., Chessa L., Gentile I., Zuin M., Parruti G., Morsica G., Kondili L.A. // *Hepatology*. 2020. V. 14. P. 362–372. <https://doi.org/10.1007/s12072-020-10034-0>
4. World Health Organization. Hepatitis C // WHO. 2025. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
5. Salmon D., Trimoulet P., Gilbert C., Solas C., Lafourcade E., Chas J., Piroth L., Lacombe K., Katlama C., Peytavin G., Aumaitre H., Alric L., Boué F., Morlat P., Poizot-Martin I., Billaud E., Rosenthal E., Naqvi A., Mialhes P., Bani-Sadr F., Esterle L., Carrieri P., Dabis F., Sogni P., Wittkop L. // *World J. Hepatology*. 2018. V. 10. P. 856–866. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i11.856>
6. Weber T., Potthoff J., Bizu S., Labuhn M., Dold L., Schoofs T., Horning M., Ercanoglu M.S., Kreer C., Gieselmann L., Vanshylla K., Langhans B., Janicki H.,

- Ströh L.J., Knops E., Nierhoff D., Spengler U., Kaiser R., Bjorkman P.J., Krey T., Bankwitz D., Pfeifer N., Pietschmann T., Flyak A.I., Klein F.* // *Immunity*. 2022. V. 55. P. 341–354.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.003>
7. *Frumento N., Sinnis-Bourozikas A., Paul H.T., Stavrakis G., Zahid M.N., Wang S., Ray S.C., Flyak A.I., Shaw G.M., Cox A.L., Bailey J.R.* // *Immunity*. 2024. V. 57. P. 40–51.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.12.004>
 8. Vaccines Against Hepatitis C Virus: Harnessing Immunity to Eliminate Global Hepatitis C: NIAID HCV Vaccines Webinar: Synthesis Report. 2022.
<https://web.archive.org/web/20221111201427if>
 9. *Pestka J.M., Zeisel M.B., Bläser E., Schürmann P., Bartosch B., Cosset F.L., Patel A.H., Meisel H., Baumert J., Viazov S., Rispeter K., Blum H.E., Roggendorf M., Baumert T.F.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 6025–6030.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607026104>
 10. *Bartosch B., Bukh J., Meunier J.C., Granier C., Engle R.E., Blackwelder W.C., Emerson S.U., Cosset F.L., Purcell R.H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 14199–14204.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2335981100>
 11. *Colbert M.D., Flyak A.I., Ogega C.O., Kinchen V.J., Massaccesi G., Hernandez M., Davidson E., Doranz B.J., Cox A.L., Crowe J.E., Jr., Bailey J.R.* // *J. Virol.* 2019. V. 93. P. e02070-18.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02070-18>
 12. *Tzarum N., Wilson I.A., Law M.* // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 1315.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01315>
 13. *Owsianka A.M., Timms J.M., Tarr A.W., Brown R.J., Hickling T.P., Szejek A., Bienkowska-Szewczyk K., Thomson B.J., Patel A.H., Ball J.K.* // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 8695–8704.
<https://doi.org/doi:10.1128/JVI.00271-06>
 14. *Morin T.J., Broering T.J., Leav B.A., Blair B.M., Rowley K.J., Boucher E.N., Wang Y., Cheslock P.S., Knauber M., Olsen D.B., Ludmerer S.W., Szabo G., Finberg R.W., Purcell R.H., Lanford R.E., Ambrosino D.M., Molrine D.C., Babcock G.J.* // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. P. e1002895.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002895>
 15. *Zibert A., Kraas W., Ross R.S., Meisel H., Lechner S., Jung G., Roggendorf M.* // *J. Hepatol.* 1999. V. 30. P. 177–184.
[https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(99\)80059-2](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80059-2)
 16. *Olenina L.V., Nikolaeva L.I., Sobolev B.N., Blokhina N.P., Archakov A.I., Kolesanova E.F.* // *J. Viral. Hepat.* 2002. V. 9. P. 174–182.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2002.00358.x>
 17. Николаева Л.И., Петрова Е.В., Финогенова, М.П., Шибнев В.А., Токмалаев А.К., Михайлов М.И. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2006. Т. 1. № 26. С. 37–41.
 18. Кузьмина Т.Н., Оленина Л.В., Санжаков М.А., Фарафонова Т.Е., Абрамихина Т.В., Дюбюиссон Ж.З., Соболев Б.Н., Колесанова Е.Ф. // *Биомед. химия*. 2009. Т. 55. № 1. С. 32–40.
 19. *Olbrich A., Wardemann H., Böhm S., Rother K., Colpitts C.C., Wrensch F., Baumert T.F., Berg T., Benckert J.* // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 220. P. 1209–1218.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz274>
 20. *Ahsan A., Dar S., Hassan F., Ghaffoor F., Yousuf M.H., Shahzad-Ul-Hussan S.* // *PLoS One*. 2021. V. 16. P. e0256816.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256816>
 21. *Virlogeux V., Berthillon P., Bordes I., Larrat S., Crouy S., Scholtès C., Pradat P., Maynard M., Zoulim F., Leroy V., Chemin I., Trépo C., Petit M.A.* // *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2018. V. 42. P. 313–318.
<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.02.002>
 22. *Garcia J.E., Puentes A., Suárez J., López R., Vera R., Rodríguez L.E., Ocampo M., Curtidor H., Guzman F., Urquiza M., Patarroyo M.E.* // *J. Hepatol.* 2002. V. 36. P. 254–262.
[https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00262-8](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00262-8)
 23. *Torrents de la Peña A., Sliepen K., Eshun-Wilson L., Newby M.L., Allen J.D., Zon I., Koekkoek S., Chumbe A., Crispin M., Schinkel J., Lander G.C., Sanders R.W., Ward A.B.* // *Science* 2022. V. 378. P. 263–269.
<https://doi.org/10.1126/science.abn9884>
 24. *Sobolev B.N., Poroikov V.V., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Archakov A.I.* // *J. Viral. Hepat.* 2000. V. 7. P. 368–374.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2000.00242.x>
 25. Астраханцева И.В., Кампо Д., Новиков В.В., Худяков Ю.Е. // *Вестник ННГУ*. 2012. Т. 2–3. С. 14–19.
 26. *Vieyres G., Dubuisson J., Patel A.H.* // *J. Gen. Virol.* 2011. V. 92. P. 494–506.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.028092-0>
 27. *Prentoe J., Bukh J.* // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 2146.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02146>
 28. *Mondelli M.U., Cerino A., Lisa A., Brambilla S., Segagni L., Cividini A., Bissolati M., Missale G., Bellati G., Meola A., Bruniercole B., Nicosia A., Galfrè G., Silini E.* // *Hepatology*. 1999. V. 30. P. 537–545.
<https://doi.org/10.1002/hep.510300233>
 29. *Flint M., Maidens C., Loomis-Price L.D., Shotton C., Dubuisson J., Monk P., Higginbottom A., Levy S., McKeating J.A.* // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 6235–6244.
<https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6235-6244.1999>
 30. *Owsianka A., Tarr A.W., Juttla V.S., Lavillette D., Bartosch B., Cosset F.L., Ball J.K., Patel A.H.* // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 11095–11104.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11095-11104.2005>

31. Sautto G., Tarr A.W., Mancini N., Clementi M. // Clin. Dev. Immunol. 2013. V. 2013. P. 45096. <https://doi.org/10.1155/2013/450963>
32. Tarr A.W., Urbanowicz R.A., Jayaraj D., Brown R.J.P., McKeating J.A., Irving W.L., Ball J.K. // J. Virol. 2012. V. 86. P. 2739–2749. <https://doi.org/10.1128/JVI.06492-11>
33. Tarr A.W., Owsianka A.M., Jayaraj D., Brown R.J.P., Hickling T.P., Irving W.L., Patel A.H., Ball J.K. // Gen. Virol. 2007. V. 88. P. 2991–3001. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83065-0>
34. Fauvelle C., Colpitts C.C., Keck Z.Y., Pierce B.G., Fount S.K.H., Baumert T.F. // Expert. Rev. Vaccines. 2016. V. 15. P. 1535–1544. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1194759>
35. Drummer H.E., Boo I., Maerz A.L., Pountourios P. // J. Virol. 2006. V. 80. P. 7844–7853. <https://doi.org/10.1128/JVI.00029-06>
36. Dai Z., Zeng W., Li G., Shu X. // Front. Biosci. (Landmark Ed.). 2023. V. 28. P. 239. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2810239>
37. Lyra A.C., Fan X., Di Bisceglie A.M. // Braz. J. Infect. Dis. 2004. V. 8. P. 126–132. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000500010>
38. Deng L., Hernandez N., Zhong L., Holcomb D.D., Yan H., Virata M.L., Tarafdar S., Xu Y., He Y., Struble E., Alter H.J., Zhang P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. P. e2104242118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104242118>
39. Отдельнова К.А. // Сб. трудов 2-го Московского медицинского института. 1980. Т. 150. № 6. С. 18–22.

Detection of B-Cell Epitopes of Hepatitis C Virus Envelope Proteins Associated with Viral Elimination

M. D. Stuchinskaya*, **, #, L. I. Nikolaeva*, A. N. Belyavtsev*, **, N. G. Shevchenko*, V. V. Kupriyanov*, ***, and N. S. Shastina**

Phone +7 (929) 677-25-65; email: mayastaya@mail.ru

* Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of Russia, ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia

** MIREA – Russian Technological University – Institute of Fine Chemical Technologies named after M.V. Lomonosov, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

*** Fundamental Basis of Biotechnology – Institute of Bioengineering, Russian Academy of Sciences, prosp. 60-letiya Oktyabrya 7, Moscow, 119071 Russia

Hepatitis C virus (HCV) is a pathogen, the chronic infection of which can lead to liver failure, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Two viral envelope glycoproteins, E1 and E2, are involved in the process of HCV entry into host cells and serve as targets for virus-neutralizing antibodies. The presence of antibodies to the E1E2 complex before treatment, as demonstrated by other researchers, is associated with the achievement of a sustained virological response (SVR) in 70% to therapy with direct-acting antiviral agents (DAAs), and thus may serve as a predictive marker ($p = 0.012$) [21]. However, the possible predictive role of individual B-epitopes of HCV envelope proteins has not yet been clarified. The aim of the study was to identify antibodies to peptides representing conserved B-cell epitopes of envelope proteins E1 and E2, and to evaluate their significance for predicting viral elimination. The synthesis of nine peptides from viral envelope proteins was carried out using the solid-phase method. The immunoreactivity of the peptides was analyzed using solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay with serum samples from 9 participants with acute and 67 participants with chronic hepatitis C who underwent DAA therapy. The results of this study showed that the presence of antibodies to two peptides representing conserved immunodominant B-epitopes of the E2 protein is associated with achieving a SVR in 73.0 and 89.2% of patients ($p = 0.00001$ and $p = 0.0086$), which allows considering the presence of these antibodies as a positive prognostic marker. The obtained data can be used to improve methods for predicting therapy outcomes, developing personalized approaches to treatment, and developing vaccines.

Keywords: hepatitis C, envelope proteins, virus-neutralizing antibodies, modeling of conserved B-cell epitopes, synthetic peptides, solid-phase peptide synthesis, immunoreactivity, predictive marker