



СИНТЕЗ И АНАЛИЗ СВОЙСТВ ИММУНОГЕННОГО ФРАГМЕНТА ПОЛИПЕПТИДА NS4A ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2021 г. А. Н. Белявцев*, ***, #, М. В. Мельникова**, Н. Г. Шевченко***, ****, Г. В. Сапронов****, Р. Г. Вахренев**, Н. С. Шастина*, Е. Ф. Колесанова**, Л. И. Николаева***

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

**ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

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

****Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Россия, 125995 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Поступила в редакцию 13.07.2020 г.

После доработки 25.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Цель настоящей работы – синтез и анализ пептидного фрагмента антигена NS4A вируса гепатита С (ВГС) субтипа 1b, содержащего консервативный В-клеточный и Т-хелперный эпитопы. Методом твердофазного синтеза по Fmoc-протоколу получен 24-членный пептид VIVGRILSGRPAVIP-DREVLVYRK-NH₂, аминокислотная последовательность которого содержит целевой участок 24–46 а.о. антигена NS4A ВГС субтипа 1b (соответствует 1681–1703 а.о. полипротеина ВГС). Для раствора пептида с концентрацией 0.5 мг/мл методом динамического светорассеяния было показано наличие частиц с размерами 73 ± 10 нм (30%) и 236 ± 5 нм (70%). Индекс полидисперсности 0.377 ± 0.012 предполагает наличие гетерогенности вследствие агрегации молекул пептида. Методом электрофоретического светорассеяния определен ζ -потенциал агрегатов пептида: 7.0 ± 0.5 мВ. Эти данные подтверждают возможность создания наноразмерной липосомальной формы пептидного препарата. Исследована иммунореактивность синтезированного высокоочищенного пептида с использованием сывороток крови больных хроническим гепатитом С. В 41.7% образцов сывороток крови были выявлены иммуноглобулины G к данному пептиду. Таким образом, показано, что этот пептид воспроизводит по крайней мере один В-эпитоп, к которому образуются антитела при естественной ВГС-инфекции. Синтезированный 24-членный пептид – перспективный кандидат для проведения дальнейших исследований и использования в качестве потенциального иммуногена при конструировании наноразмерной терапевтической иммуногенной липосомальной композиции с пептидом и адьювантом в виде синтетических липидов.

Ключевые слова: гепатит С, антиген NS4A, синтетический пептид, твердофазный пептидный синтез, физико-химические свойства пептида, иммунореактивность

DOI: 10.31857/S0132342321030039

ВВЕДЕНИЕ

Разработка средств противовирусной терапии гепатита С и вакцины против вируса гепатита С (ВГС) – одна из актуальных задач здравоохранения. В настоящее время исследователи продолжают проведение поиска новых или модификацию уже существующих лекарственных средств

для повышения эффективности или минимизации побочного действия [1–4]. Синтетические пептиды, содержащие аминокислотные последовательности эпитопов антигена, могут целенаправленно активировать клетки иммунной системы [5–8]. Для создания полноценного иммуногена необходимо использовать пептид, содержащий в себе не только В-клеточную антигенную детерминанту, но и Т-хелперный эпитоп, а также правильно подобранный адьювант, что обеспечит повышение иммуногенности и формирование иммунологической памяти [6, 8–13].

Сокращения: ВГС – вирус гепатита С; УВО – устойчивый вирусологический ответ; Fmoc – 9-флуоренилметилокси-карбонильная защитная группа; NF-κB – ядерный фактор каппа В; NS4A – неструктурный полипептид 4А.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 265-39-83; эл. почта: belyavcev@mirea.ru).

																							В-клеточный консервативный эпитоп														В-клеточный типоспецифичный эпитоп																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
S	T	W	V	L	V	G	G	V	L	A	A	L	A	A	Y	C	L	T	T	G	S	V	V	I	V	G	R	I	L	S	G	K	P	A	V	I	P	D	R	E	V	L	Y	R	E	F	D	E	M	E	E	C	
Т-хелперный эпитоп											Т-хелперный эпитоп											Т-хелперный эпитоп																															
											S											C																															
											V											V																															
											G											R																															
											R											V																															
											I											V																															
											C											G																															
																						Q																															
																						Q																															

Рис. 1. Аминокислотная последовательность антигена NS4A вируса гепатита С субтипа 1b. Под последовательностью расположены обозначения замен аминокислот в других изолятах субтипа 1b [24]. Серым цветом выделен выбранный для синтеза пептида участок 24–46 а.о.

В качестве объекта исследования в данной работе был выбран полипептид NS4A ВГС субтипа 1b как наиболее распространенного на территории России. Биологическая значимость полипептида NS4A заключается в том, что он выполняет роль кофактора сериновой протеазы NS3 ВГС, активируя последнюю путем изменения ее конформации в районе каталитической триады при формировании комплекса с полипептидом NS4A. В результате каталитическая триада His-1083, Asp-1107 и Ser-1165 взаимодействует с субстратом и тем самым ускоряет отщепление от вирусного полипротеина неструктурных белков NS4B, NS5A и NS5B [14]. Полипептид NS4A состоит из 54 а.о. (соответствуют 1658–1711 а.о. последовательности полипротеина ВГС) и содержит в себе экспериментально подтвержденные В-клеточные и Т-хелперные (стимулирующие CD4⁺-Т-клетки) эпитопы [15, 16]. N-Концевой участок полипептида NS4A гидрофобен и погружен в липидный бислой мембраны эндоплазматической сети, вследствие чего белок NS3, содержащий протеазный и хеликазный домены, удерживается около мембраны [17]. Полипептид NS4A также участвует в блокировке внутриклеточного антивирусного сигналинга, регулировании репликации вируса и гиперфосфорилировании антигена NS5A [18]. Протеазный комплекс NS3–NS4A принимает участие в сборке вириона, и его мутации могут привести к дефектам при сборке [19]. Предполагается, что полипептид NS4A способствует участию креатинкиназы В в функционировании репликационного комплекса ВГС, что приводит к повышению уровня АТФ и стимулированию ферментативных активностей, необходимых для репликации [20]. В соответствии с гипотетической моделью молекулярных взаимодействий между NS3, NS4A и NS5A особое значение в обеспечении этих контактов имеет участок полипротеина 1691–1704 а.о., соответствующий 34–47 а.о. NS4A [21]. Фрагмент 21–34 а.о. NS4A (соответствует 1678–1691 а.о. полипротеина ВГС) непосредственно взаимодействует с белком NS3 в специальном участке, связывающем кофактор сериновой протеазы, и содержит в себе консервативную для всех генотипов вируса область (рис. 1) [16, 21]. Вполне вероятно, что блокирование соответствующих

участков полипептида NS4A может оказать ингибирующее воздействие на репликационную активность вируса. Один из способов такого блокирования – связывание с антителами, специфичными к участку взаимодействия полипептида NS4A с протеазным доменом NS3. Для продукции таких антител необходимо составить иммунную конструкцию, содержащую как участок полипептида NS4A, ответственный за взаимодействие с протеазой NS3, так и В-клеточный и Т-хелперный эпитопы [6, 8, 12]. Поскольку полипептид NS4A содержит в своем составе экспериментально выявленные В-клеточные и Т-хелперные эпитопы, полностью или частично входящие в состав участка взаимодействия с NS3 [15, 16], иммунная конструкция может представлять собой фрагмент полипептида NS4A, содержащий как участок взаимодействия с NS3, так и указанные эпитопы. Показано, что высокие титры антител к полипептиду NS4A – прогностический признак эффективности лечения гепатита С [22, 23].

Цель настоящей работы – синтез 24-членного пептидного фрагмента антигена NS4A вируса гепатита С субтипа 1b, содержащего консервативный В-клеточный и Т-хелперный эпитопы, а также участок взаимодействия с сериновой протеазой NS3, с последующим анализом физико-химических свойств этого пептида и оценкой иммунореактивности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После анализа литературных данных из аминокислотной последовательности полипептида NS4A ВГС субтипа 1b [24] для синтеза был выбран 23-членный фрагмент VIVGRILSGRPVAVIPDREVLRYR, соответствующий 1681–1703 а.о. полипротеина ВГС. Этот фрагмент содержит большую часть участка связывания NS4A с сериновой протеазой NS3, полностью В-клеточный (консервативный для всех генотипов, 24–36 а.о.) [16] и Т-хелперный эпитопы (37–46 а.о.) [15], а также частично типоспецифичный В-клеточный (32–54 а.о.) [25] и Т-хелперный эпитопы (14–33 а.о.) [26] (рис. 1).

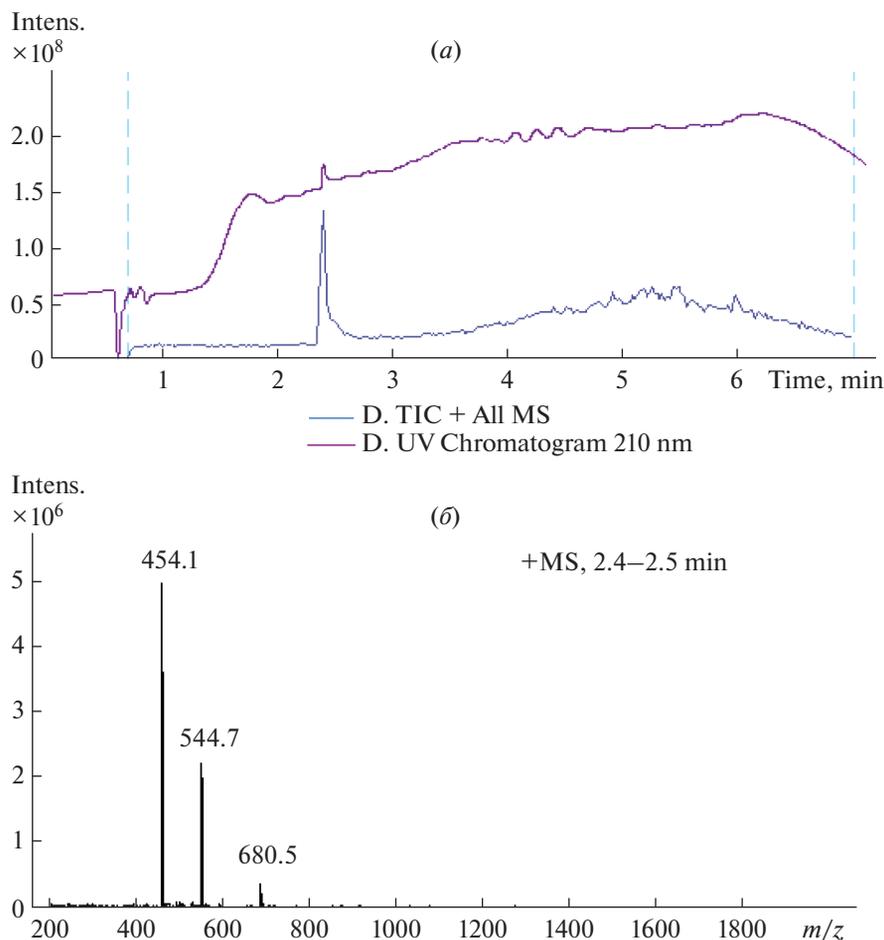


Рис. 2. (а) – Хроматограмма офВЭЖХ 24-членного пептида после препаративной очистки; (б) – масс-спектр очищенного пептида, представлены 4-, 5- и 6-зарядные ионы.

Выбранный фрагмент был синтезирован в виде амидированного по С-концу 24-членного пептида VIVGRILSGRPAVIPDREVLYRK-NH₂ ($M = 2719$ г/моль). Амидирование С-концевого остатка пептида моделирует его естественное состояние – участие в амидной (пептидной) связи с соседней аминокислотой [27]. Наличие лизина позволяет ацилировать данный пептид липофильным адьювантом по менее гидрофобному С-концу через ε-аминогруппу лизина при условии ее блокирования селективно удаляемой защитной группой. Пептид был получен твердофазным синтезом на смоле Ринка по Fmoc-протоколу методом активированных эфиров *in situ* [28, 29]. После синтеза пептид был очищен методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ) с использованием УФ- и масс-спектрометрического детектирования для идентификации целевого пептида и примесей. Чистота полученного препарата пептида по данным аналитической офВЭЖХ составила более 95% (рис. 2).

Для подтверждения воспроизведения В-эпитопов была проведена оценка иммунореактивности очищенного пептида методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием сывороток крови людей, инфицированных гепатитом С. Исследовали 84 образца сывороток крови от людей, инфицированных ВГС. По результатам ИФА в тест-системе “Бест-анти-ВГС-спектр” установлено, что в данных образцах присутствовали суммарные антитела к антигенам NS4A и NS4B. В качестве контроля были протестированы образцы сывороток крови 10 здоровых людей, в которых анти-ВГС антитела отсутствовали.

Антитела к синтезированному пептиду были выявлены методом ИФА в сыворотках крови 41.7% инфицированных пациентов. Во всех образцах сывороток крови от здоровых людей антитела к данному пептиду не были обнаружены. В позитивных образцах от инфицированных пациентов превышение значения оптической плотности (ОП) относительно средней величины зна-

чения ОП образцов от здоровых людей составило от 2.5 до 159 раз. Однако у большинства позитивных образцов сывороток (68.57%) наблюдался низкий коэффициент позитивности (КП) антител — от 1 до 10. (КП — это отношение ОП образца сыворотки крови к пороговому значению ОП.) Доля позитивных образцов с высоким значением КП (от 21 до 53) составила 22.86%. Ранее при анализе сывороток крови пациентов с хроническим гепатитом С было показано, что доля NS4A-позитивных образцов (при использовании рекомбинантного антигена NS4A, воспроизводящего последовательность 19–54 а.о.) составляла 45% [30, 31], что позволяет предположить наличие у синтезированного пептида по крайней мере одного иммунодоминантного В-эпитопа полипептида NS4A, к которому образуются антитела при ВГС-инфекции.

Среди 84 образцов сывороток крови от инфицированных людей 59 образцов сывороток были получены от пациентов до начала противовирусной терапии пэгилированным интерфероном- $\alpha 2$ и рибавирином. Учитывая завершение лечения и его результат, сыворотки были поделены на две группы. Первая группа сывороток включала 29 образцов от пациентов с успешным результатом терапии (достигнут устойчивый вирусологический ответ (УВО), т.е. РНК в крови не выявлялась на 24-й неделе после лечения); вторая группа сывороток — 30 образцов от пациентов, не достигших УВО. У 20 пациентов (66.7%), не достигших УВО, антитела к пептиду отсутствовали. Антипептидные иммуноглобулины не были выявлены и у 14 участников (48.3%), достигших УВО. Достоверных различий в отсутствии антител между группами не обнаружено ($p > 0.05$; $t = 1.43$), что, скорее всего, связано с небольшой выборкой сравниваемых образцов. Однако явно прослеживается тенденция к наличию связи между появлением антител к выбранному нами в качестве антигена фрагменту полипептида NS4A и УВО на интерферонотерапию. Это дополнительно подтверждает присутствие в синтезированном нами пептиде основного(-ых) В-эпитопа(-ов) полипептида NS4A ВГС, поскольку показано, что наличие антител против этого белка — прогностический признак успешной интерферонотерапии [22, 23].

Для раствора пептида с концентрацией 0.5 мг/мл методом динамического светорассеяния было показано наличие частиц с размерами 73 ± 10 нм (30%) и 236 ± 5 нм (70%). Индекс полидисперсности 0.377 ± 0.012 предполагает наличие гетерогенности вследствие агрегации молекул пептида. Методом электрофоретического светорассеяния определили ζ -потенциал агрегатов пептида, который составил 7.0 ± 0.5 мВ. По-видимому, гидрофобный N-концевой участок пептида способствует агрегации его молекул, учитывая относительно низкую растворимость пептида в

водном растворе. Эти данные подтверждают возможность создания наноразмерной липосомальной формы пептида, его достаточно гидрофильный C-концевой участок в составе липосом предположительно будет доступен для контакта с Th-лимфоцитами, что позволит обеспечить эффективную доставку препарата [32, 33]. Известно, что липофильные соединения на основе жирных кислот стимулируют Toll-подобные рецепторы (неспецифическая иммунная активация через NF- κ B-путь) и выступают эффективными адъювантами для синтетических пептидов [34–37].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Fmoc-защищенные L-аминокислоты Arg(Pbf) (Sigma-Aldrich, США); Lys(Boc), Tyr(OBu^t), Leu, Val, Glu(OBu^t), Asp(OBu^t), Pro, Ile, Ala, Gly, Ser(OBu^t), амидную смолу Ринка с Fmoc-защитой аминокислотной группы (емкость 0.7 ммоль/г), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуронийгексафторфосфат (HBTU) (Chemper, США); 4-метилпиперидин, 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU), триизопропилсилан, тиоанизол, трифторуксусную кислоту, 2,4,6-коллиндин, пропионовый ангидрид (Acros Organics, Бельгия); этиловый эфир циангидроксииминоацетата (Охума Pure) (Merck, Германия); 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 4А.

Получение пептида VIVGRILSGRPAVIP-DREVLVYRK-NH₂. Синтез осуществляли в ручном режиме в стеклянном реакторе с фильтром и трехходовым краником для промывки смолы, в нижней части реактора предусмотрен отвод для вакуум-фильтрации для удаления избытка реагентов и промывания смолы. При масштабе синтеза 0.25 ммоль (в расчете на количество активных групп на смоле) в сосуд помещали 0.357 г смолы Ринка (концентрация Fmoc-NH₂-групп на смоле 0.7 ммоль/г), добавляли хлористый метилен для набухания смолы, удаляли Fmoc-группу действием 4-метилпиперидина (2%, v/v — здесь и далее) и DBU (2%) в DMF, далее наращивали пептидную цепь, последовательно присоединяя аминокислоты, удаляя Fmoc-группу перед присоединением следующей аминокислоты. Карбоксильную группу присоединяемой аминокислоты активировали HBTU и Охума Pure в присутствии 2,4,6-коллиндина в DMF. Образование пептидной связи осуществляли с использованием 4-кратного избытка присоединяемой аминокислоты (1 ммоль). Полимерную смолу промывали DMF (5 × 2 мл) и хлористым метиленом (3 × 2 мл).

Присоединение аминокислот контролировали с помощью пробы Кайзера. При положительной пробе Кайзера проводили ацилирование оставшихся реакционноспособных аминогрупп пропионовым ангидридом.

После отщепления от смолы с одновременным удалением защитных групп боковых цепей действием трифторуксусной кислоты (92.5%) в присутствии тиоанизола (2.5%), триизопропилсилана (2.5%) и воды (2.5%) пептид осаждали диэтиловым эфиром. Очистку пептида проводили методом полупрепаративной оФВЭЖХ на колонке УМС-Actus Triart C8 (УМС, Швейцария; 250 × 20 мм I.D., S – 5 мкм, 12 нм), элюент вода/ацетонитрил с 0.1%-ной уксусной кислотой, скорость потока 15 мл/мин, хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), детектирование по оптическому поглощению элюента при длине волны 210 нм, диодно-матричный детектор G1314A. Чистоту препарата пептида подтверждали методом аналитической ВЭЖХ с УФ- и масс-спектрометрической детекцией, колонка УМС-Triart C18 (50 × 2.1 мм L.D., S – 1.9 мкм), колонку термостатировали при 30°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.35 мл/мин, в качестве подвижной фазы использовали 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В); хроматографическое разделение веществ проводили в режиме градиентного элюирования: 0 мин – 2% В, 0–10 мин – линейный градиент до 100% В, 10–12 мин – 2% В; $t_R = 2.4$ мин, масс-спектрометр Agilent 6340 Ion Trap (Agilent Technologies, США) с ионизацией электрораспылением, детектор – ионная ловушка.

Выход пептида составил 0.204 г (30% от теоретического); ESI-MS, m/z : найдено $[M + 4H]^{4+}$ 680.5; $[M + 5H]^{5+}$ 544.7; $[M + 6H]^{6+}$ 454.1; вычислено M_r (C₁₂₄H₂₁₆N₃₈O₃₀) 2719.3.

Определение размеров частиц в растворе пептида. Пептид растворяли в бидистиллированной воде (рН 5.9) в концентрации 0.5 мг/мл, исследовали распределение частиц по размерам и измеряли ζ-потенциал на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, США) при 25°C с использованием программного обеспечения Zetasizer Software. Эксперимент повторяли 3 раза.

Иммуноферментный анализ. В работе использовали образцы сывороток крови от 84 пациентов, инфицированных ВГС (35 женщин и 49 мужчин, средний возраст 41 год), с подтвержденным наличием суммарных антител к антигенам NS4A и NS4B (по результатам ИФА в сертифицированной тест-системе “Бест-анти-ВГС-спектр”, Вектор-Бест, Россия). В качестве контроля были протестированы образцы сывороток крови 10 здоровых людей (5 женщин и 5 мужчин, средний

возраст 35 лет), в которых анти-ВГС антитела отсутствовали.

Пептид иммобилизировали в лунках иммунологического 96-луночного полистирольного планшета с повышенной сорбцией (Nunc, Дания) при 4°C в концентрации 10 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9.25) в течение ночи. Свободные зоны лунок блокировали раствором бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл; Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (рН 7.2). После этого в лунки вносили образцы сывороток крови, разведенные в 10 раз фосфатно-солевым буфером с 0.1% Tween 20 (рН 7.2), после инкубирования отмывали и выявляли антипептидные иммуноглобулины G. Остальные этапы ИФА выполняли по общепринятой методике [23].

Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм, используя иммуоферментный микропланшетный анализатор (фотометр) Stat-Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Пороговое значение оптической плотности рассчитывали как среднее значение оптической плотности отрицательного контроля плюс тройное стандартное отклонение. Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля составляло 0.032. Достоверность различий по выявлению антител в сравниваемых группах пациентов оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Твердофазным методом синтезирован 24-членный пептид VIVGRILSGRPAVIPDREVLYRK-NH₂, целевая часть которого соответствует фрагменту 24–46 а.о. неструктурного полипептида NS4A ВГС субтипа 1b (рис. 1).

Показана иммунореактивность полученного 24-членного пептида путем взаимодействия с сыворотками крови людей, инфицированных вирусом гепатита С. Установлено, что 41.7% сывороток крови больных, имеющих антитела к суммарным антигенам NS4A и NS4B, содержали иммуноглобулины G к анализируемому пептиду. По косвенным данным, синтезированный пептид имеет иммунодоминантный В-эпитоп NS4A.

Показано, что данный 24-членный пептид в виде высокоочищенного водного препарата образовывал агрегаты гетерогенной структуры небольших размеров и умеренной стабильности. Это указывает на способность пептида к связыванию с липосомами в виде частиц среднего размера (~200 нм) и подтверждает его перспективность в качестве кандидата при конструировании липопептидного иммуногена против вируса гепатита С.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность аспирантам А.А. Юшиной и В.А. Щелконогову (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова) за содействие в определении размера частиц и ζ -потенциала пептида.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90037).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование выполнено с соблюдением этических стандартов, изложенных в Хельсинкской декларации (1975 г., 2013 г.). Пациенты дали информированное согласие на использование их сывороток крови в исследовательских целях. Исследование одобрено этическим комитетом Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gonzalez-Aldaco K., Torres-Reyes L.A., Ojeda-Granados C., Jose-Abrego A., Fierro N.A., Roman S.* // Ann. Hepatol. 2018. V. 17. P. 908–919. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7191>
2. *Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L.* // Gastroenterology. 2019. V. 156. P. 418–430. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
3. *Chudinov M.V.* // Fine Chem. Technol. 2019. V. 14. P. 7–23. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2019-14-4-7-23>
4. *Crouch E., Wrensch F., Schuster C., Zeisel M.B., Baumert T.F.* // Ther. Adv. Gastroenterol. 2018. V. 11. P. 1–15. <https://doi.org/10.1177/1756283X18759483>
5. *Brown L.E., Jackson D.C.* // Curr. Drug Deliv. 2005. V. 2. P. 383–393. <https://doi.org/10.2174/156720105774370258>
6. *Мойса А.А., Колесанова Е.Ф.* // Биомед. химия. 2011. Т. 57. С. 14–30. <https://doi.org/10.18097/pbmc20115701014>
7. *Колесанова Е.Ф., Соболев Б.Н., Мойса А.А., Егорова Е.А., Арчаков А.И.* // Биомед. химия. 2015. Т. 61. С. 254–264. <https://doi.org/10.18097/PBMC20156102254>
8. *Moisa A.A., Kolesanova E.F.* // InTech: Rijeka, 2012. P. 201–228. <https://doi.org/10.5772/2240>
9. *Baz A., Buttigieg K., Zeng W., Rizkalla M., Jackson D.C., Groves P., Kelso A.* // Vaccine. 2008. V. 26. P. 2570–2579. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.022>
10. *BenMohamed L., Gras-Masse H., Tartar A., Daubersies P., Brahimi K., Bossus M., Thomas A., Druilhe P.* // Eur. J. Immunol. 1997. V. 27. P. 1242. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270528>
11. *Иванов Б.Б., Мещерякова Е.А., Андропова Т.М., Иванов В.Т.* // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. С. 732–746. [*Ivanov B.B., Meshcheryakova E.A., Andronova T.M., Ivanov V.T.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 1991. V. 17. P. 732–746.]
12. *Sobolev B.N., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Poroikov V.V., Archakov A.I.* // Curr. Comp.-Aid. Drug Des. 2005. V. 1. P. 207–222. <https://doi.org/10.2174/1573409053585681>
13. *Вольпина О.М., Титова М.А., Жмак М.Н., Короев Д.О., Обозная М.Б., Волкова Т.Д., Иванов В.Т.* // Биоорг. химия. 2002. Т. 28. С. 387–395. [*Volpina O.M., Titova M.A., Zhmak M.N., Koroev D.O., Oboznaya M.B., Volkova T.D., Ivanov V.T.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2002. V. 28. P. 349–356.] <https://doi.org/10.1023/A:1020452709271>
14. *Suzuki T., Ishii K., Aizaki H., Wakita T.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. V. 59. P. 1200–1212. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.014>
15. *Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruner N.H., Jung M.-C., Schraut W., Schirren C.-A., Heeg M., Scholz S., Witter K., Zahn R., Vogler A., Zachoval R., Pape G.R., Diepolder H.M.* // J. Virol. 2005. V. 19. P. 12425–12433. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
16. *Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E.* // J. Med. Virol. 1998. V. 56. P. 105–111.
17. *Wolk B., Sansonno D., Krausslich H.G., Dammacco F., Rice C.M., Blum H.E., Moradpour D.* // J. Virol. 2000. V. 74. P. 2293–2304.
18. *Gu M., Rice C.M.* // Curr. Opin. Virol. 2013. V. 3. P. 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.013>
19. *Dubuisson J., Cosset F.-L.* // J. Hepatology. 2014. V. 61. P. 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.031>
20. *Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T.* // J. Virol. 2009. V. 83. P. 5137–5147. <https://doi.org/10.1128/jvi.02179-08>
21. *Campo D.S., Dimitrova Z., Mitchell R.J., Lara J., Khudya-kov Y.* // PNAS. 2008. V. 105. P. 9685–9690. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801774105>
22. *Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sallberg M., Quiroga J., Carreno V., Leroux-Roels G.* // J. Med. Virol. 2007. V. 79. P. 701–713. <https://doi.org/10.1002/jmv.20846>
23. *Николаева Л.И., Макашова В.В., Петрова Е.В., Шунулин Г.А., Самохвалов Е.И., Токмалаев А.К., Львов Д.К.* // Биомед. химия. 2009. Т. 55. С. 201–212. <https://doi.org/10.1134/S1990750809020127>
24. *Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., Ashfaq U.A., Asad S., Gull S., Shahid I., Hassan S.* // Virol. J. 2011. V. 8. P. 317. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
25. *Chien D.Y., McFarland J., Tabrizi A., Kuo C., Houghton M., Kuo G.* // In: Viral Hepatitis and Liver Disease / Eds.

- Nishioka K., Suzuki H., Mishiro S., Oda T. Springer, То-
кьо, 1994. P. 320–324.
26. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., Chung R.T., Walker B.D. // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 12584–12595. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12584-12595.2002>
 27. Короев Д.О., Вольпина О.М., Волкова Т.Д., Камынина А.В., Самохин А.Н., Филатова М.П., Бобкова Н.В. // *Биоорг. химия.* 2019. Т. 45. С. 518–523. [Koroev D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., Kamynina A.V., Samokhin A.N., Filatova M.P., Bobkova N.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 5. P. 361–365.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019050054>
 28. Алешина Е.Ю., Пындык Н.В., Мойса А.А., Санжаков М.А., Харьбин О.Н., Николаев Е.Н., Колесанова Е.Ф. // *Биомед. химия.* 2008. Т. 54. С. 184–191. <https://doi.org/10.1134/S1990750808030098>
 29. Kolesanova E.F., Sanzhakov M.A., Kharybin O.N. // *Int. J. Pept.* 2013. V. 2013. P. 197317. <https://doi.org/10.1155/2013/197317>
 30. Николаева Л.И., Куприянов В.В., Лейбман Е.А., Ионова К.С., Самохвалова Е.Г., Васильев А.В. // В сб. Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 30 марта–1 апреля 2015 г.), Москва, 2015. С. 244.
 31. Николаева Л.И., Куприянов В.В., Зыкова А.А., Ионова К.С., Равин Н.В. // В мире вирусных гепатитов. 2015. В. 1–2. С. 12–17.
 32. Добрынина А.В., Цыкунова М.А., Себякин Ю.Л. // *Тонк. хим. технол.* 2010. Т. 5. С. 98–103.
 33. Varypataki E.M., Benne N., Bouwstra J., Jiskoot W., Ossendorp F. // *Cancer Immunol. Res.* 2017. V. 5. P. 1–12. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0283>
 34. Tan A.C.L., Mifsud E.J., Zeng W., Edenborough K., McVernon J., Brown L.E., Jackson D.C. // *Mol. Pharm.* 2012. V. 9. P. 2710–2718. <https://doi.org/10.1021/mp300257x>
 35. Zeng W., Eriksson E., Chua B.Y., Grollo L., Jackson D. // *Amino Acids.* 2010. V. 39. P. 471–480. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0463-0>
 36. Langhans B., Schweitzer S., Nischalke H.D., Braunschweiger I., Sauerbruch T., Spengler U. // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 189. P. 248–253. <https://doi.org/10.1086/380763>
 37. Langhans B., Braunschweiger I., Schweitzer S., Jung G., Inchauspe G., Sauerbruch T., Spengler U. // *Immunology.* 2001. V. 102. P. 460–465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01209.x>

Synthesis and Analysis of Properties of an Immunogenic Fragment of the Polypeptide NS4A of Virus Hepatitis C

A. N. Belyavtsev^{*, ***, #}, M. V. Melnikova^{**}, N. G. Shevchenko^{***, ****}, G. V. Saprionov^{****}, R. G. Vahrenov^{**}, N. S. Shastina^{*}, E. F. Kolesanova^{**}, and L. I. Nikolaeva^{***}

[#]Phone: +7 (495) 246-05-55, e-mail: belyavcev@mirea.ru

^{*}Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

^{**}Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

^{***}Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia

^{****}Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, ul. Barrikadnaya 2/1, Moscow, 123995 Russia

The work is aimed at the synthesis and analysis of a NS4A hepatitis C virus (HCV) antigen peptide fragment that contains a conserved B-cell and T-helper epitopes. 24-mer peptide VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂, which contains the main immunogenic site 24–46 of HCV NS4A antigen (corresponding to the 1681–1703 amino acid residues of the HCV polypeptide), subtype 1b, has been prepared via solid-phase synthesis according to the Fmoc-protocol. Particles with diameters of 73 ± 10 nm (30%) и 236 ± 5 nm (70%) have been detected in the water solution of the highly purified peptide (0.5 mg/mL) by dynamic light scattering. Polydispersity index of 0.377 ± 0.012 implies the existence of heterogeneity because of the aggregation of the peptide molecules. ζ -Potential of the peptide aggregates has been determined as 7.0 ± 0.5 mV by means of electrophoretic light scattering. These data confirm the possibility for the development of a nanoscale liposome form of the peptide preparation. Immunoreactivity of the synthesized highly purified peptide has been studied with the use of blood sera of patients with chronic hepatitis C. Anti-peptide immunoglobulins G have been detected in 41.7% serum samples. Thus, this peptide has been shown to reproduce at least one B-epitope, to which antibodies are raised during natural HCV infection. The synthesized 24-mer peptide is a promising candidate for further research and for the use as a potential immunogen for the design of a nanoscale therapeutic immunogenic liposomal peptide composition with synthetic lipids as an adjuvant.

Keywords: hepatitis C, antigen NS4A, synthetic peptid, solid-phase peptide synthesis, physicochemical properties of peptide, immunoreactivity