



УДК 577.112.6+578.1

ОЦЕНКА АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ГРИППА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

© 2025 г. О. В. Грибовская^{*,#}, А. М. Цыганков^{**}, В. П. Мартинович^{*}, В. В. Янченко^{**}^{*} Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Акад. Купревича, 5/2^{**} Витебский государственный медицинский университет, Беларусь, 210023 Витебск, пр. Фрунзе, 27

Поступила в редакцию 03.02.2025 г.

После доработки 25.02.2025 г.

Принята к публикации 26.02.2025 г.

В данной работе апробирован метод оценки иммуногенности синтетических пептидов, который может лечь в основу метода клинической диагностики клеточного иммунного ответа против вируса гриппа А. Используемые пептиды идентичны по аминокислотному составу 9-мерным эпитопам поверхностных белков вирусов гриппа, актуальных для вакцинных штаммов Северного полушария сезона 2023–2024 гг., и представляют собой фрагмент (432–440 а.о.) Phe-Leu-Asp-Ile-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala гемагглютиниона вируса гриппа А и фрагмент (454–462 а.о.) Leu-Leu-Trp-Asp-Thr-Val-Thr-Gly-Val нейраминидазы вируса гриппа В. Пептиды синтезировали классическими методами пептидной химии с использованием методов активированных эфиров и карбодиимидного метода в качестве основных способов конденсации. В клиническом исследовании участвовало 55 добровольцев в возрасте 20–26 лет. Уровень гамма-интерферона (IFN- γ) оценивали методом иммуноферментного анализа. Внутри групп добровольцев, имеющих различия в статусе вакцинации и инфекционного анамнеза, не было получено статистически значимых различий для всех парных сравнений концентраций IFN- γ в 55 случаях. Для проведения клинической диагностики иммунного ответа против вируса гриппа А необходима оптимизация данного метода.

Ключевые слова: пептидный синтез, гамма-интерферон, вирус гриппа, адаптивный иммунный ответ

DOI: 10.7868/S1998286025060024

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире ежегодные эпидемии гриппа вызывают ~3–5 миллионов случаев тяжелой формы заболевания и приводят к 290–650 тысячам смертей, оказывая огромное давление на системы здравоохранения [1, 2].

Грипп – это контагиозное респираторное заболевание, вызываемое вирусом гриппа [3]. Инкубационный период составляет 24–48 ч, после чего у инфицированных людей могут проявиться острые симптомы (включая головную боль, кашель, насморк, боль в горле, мышечные боли, озноб и

лихорадку), которые могут сохраняться в течение 2–8 дней и коррелируют с высокой вирусной нагрузкой [4, 5]. В большинстве случаев без медицинского лечения лихорадка и другие симптомы гриппа проходят в течение недели, однако в некоторых случаях кашель может ухудшиться и сохраняться дольше двух недель. Грипп может привести к серьезному заболеванию или смерти, особенно в группах высокого риска, таких как дети и пожилые люди [1]. По этой причине в данных категориях лиц проводят обязательную вакцинацию. Однако оценить эффективность поствакцинального клеточного иммунного ответа

Сокращения: IFN- γ – гамма-интерферон; Вос – трет-бутилоксикарбонил; DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид; DMF – *N,N*-диметилформамид; DIPC – *N,N'*-диизопропилкарбодиимид; HOBt – *N*-гидроксибензотриазол; Bzl – бензил; TEA – триэтиламин; NMM – *N*-метилморфолин; OSu – сукцинимидный эфир; OPfp – пентафторфениловый эфир; ESI – ионизация распылением в электрическом поле.

[#] Автор для связи: (тел.: +3 (751) 737-387-53; эл. почта: olymelnik@yandex.ru).

сложно, поскольку широкодоступных методов для оценки противовирусного иммунного ответа нет. Разработка таких методов позволит определять целесообразность проведения ревакцинации.

Изучение противогриппозного иммунитета продолжается уже более 50 лет. Цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ имеет важное значение в предотвращении гриппозной инфекции и смягчении ее тяжести. Первоначально исследования были основаны на анализе цитотоксического иммунного ответа к цельным вирусам гриппа и их отдельным белкам, затем к различным эпитопам белков. В отношении гриппа такие эпитопы имеют происхождение из внутренних белков вируса (нуклеопротеин и матриксный белок) и наружных (гемагглютинин и нейраминидаза). CD8⁺-клетки памяти, специфичные к эпитопам белков вируса гриппа, образуются как после гриппа, так и после вакцинации против гриппа [2–6]. Поствакцинальный иммунитет характеризуется клеточной и гуморальной защитой против вирусов гриппа. Клеточный иммунный ответ связан непосредственно с клетками и не может быть исследован изолированно. Один из подходов к его исследованию – изучение реакций клеток *in vitro* или *ex vivo* в ответ на различные стимуляторы. Пептидные фрагменты белков, идентичные иммунодоминантным эпитопам, как специфические стимулы, дают возможность исследовать один из вариантов реакции клеток иммунной системы – секрецию цитокинов; цитотоксичность и пролиферация изучаются иными методами.

Т-клеточный иммунный ответ оценивают с помощью различных традиционных и широко используемых методов, включая выявление цитокиновых ответов (например, ИФА, ELISPOT), фенотипирование Т-клеток методом проточной цитометрии, оценку пролиферации Т-клеток в ответ на антиген, а также определение антиген-специфической цитотоксичности (например, анализ высвобождения хрома) [7, 8]. Гамма-интерферон (IFN- γ) – один из ключевых маркеров специфического Т-клеточного иммунного ответа и один из основных цитокинов, продуцируемый Т-хелперами 1-го типа (Th1) и цитотоксическими Т-лимфоцитами, играющий важную роль в клеточном иммунитете. Его выявление указывает на активацию специфического Т-клеточного ответа на антиген.

Цель данного исследования заключалась в оценке уровня IFN- γ как показателя напряженности специфического Т-клеточного иммунитета в ответ на использование синтетических пептидов: фрагмента (432–440 а.о.) Phe-Leu-Asp-Ile-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala гемагглютинина вируса гриппа А и фрагмента (454–462 а.о.) Leu-Leu-Trp-Asp-Thr-Val-Thr-Gly-Val нейраминидазы вируса гриппа В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез пептидов (IX) и (XIX). Синтез пептида (IX) осуществляли по схеме 1, используя фрагментную конденсацию пептидных блоков.

Гексапептид (VI) получали путем последовательной сшивки трех дипептидов, начиная с C-конца. В случае синтеза тетрапептида Boc-Thr-Tyr-Asn-Ala-OMe (IV) в качестве конденсирующего агента использовали DIPIC с добавлением HOBt. Дипептид Boc-Ile-Trp-OH вводили в реакцию с C-концевым тетрапептидом с использованием метода активированных эфиров. Для блокирования α -аминогрупп применяли Boc-защитную группу. Ее отщепление проводили обработкой 4.5 М раствором HCl в этилацетате либо 3 М раствором HCl в уксусной кислоте (для Trp-содержащих пептидов с целью подавления побочной реакции *трет*-бутилирования индольного цикла).

Гидрохлориды пептидов после отщепления Boc-защитной группы, которое протекало с выходами, близким к количественным (93–98%), использовали в синтезе после определения их однородности методом тонкослойной хроматографии. Полной характеристики гидрохлоридов не проводили, т.к. кислотный гидролиз Boc-группы протекает, как правило, без рацемизации и изменения структуры пептидной цепи [10]. Синтез активированных, сукцинимидных или пентафторфениловых, эфиров аминокислот или пептидов осуществляли без выделения, отфильтровав осадок дициклогексимочевины, что позволило сократить время и количество растворителей на выделение эфиров.

N-Концевой трипептид (VII) получали также с использованием метода активированных эфиров, причем Boc-Phe-OPfp также вводили в реакцию без выделения.

Для синтеза пептида (XIX) была предложена схема 2. C-Концевой тетрапептид (XIII) получали последовательным наращиванием пептидной

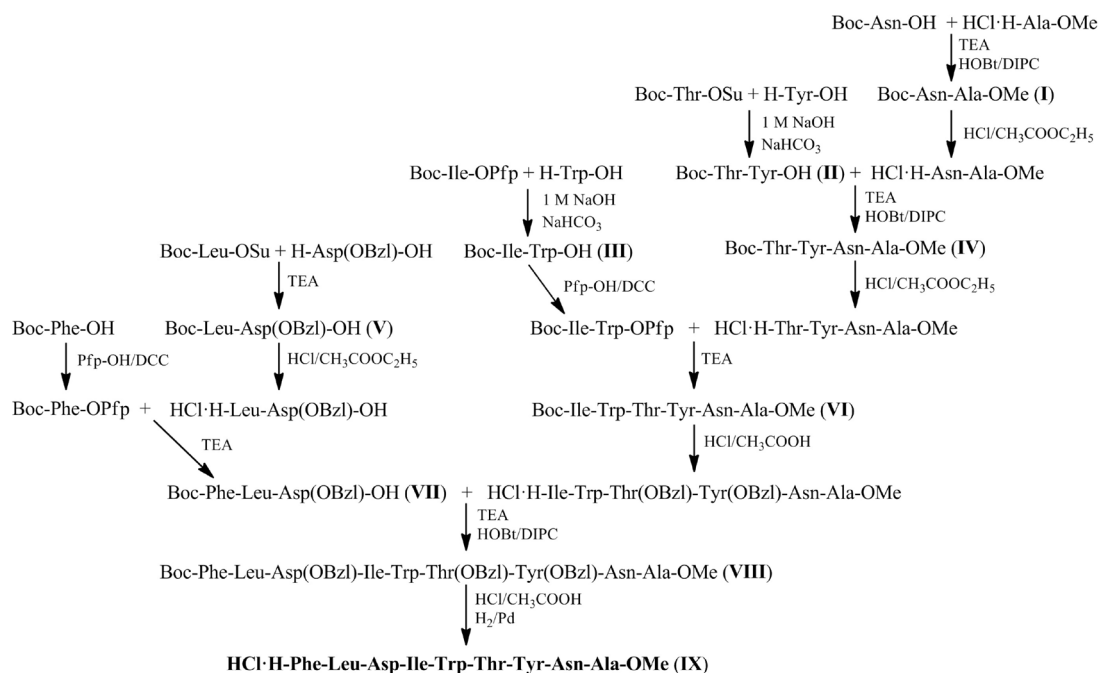


Схема 1. Схема синтеза пептида (IX).

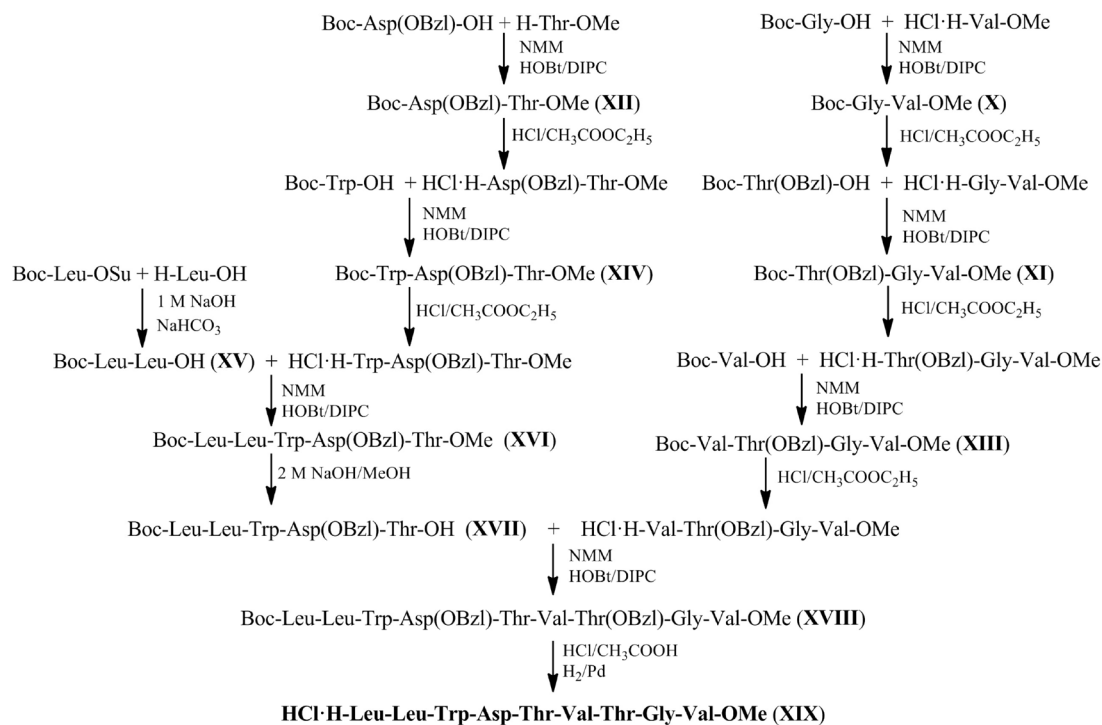


Схема 2. Схема синтеза пептида (XIX).

цепи с использованием карбодиимидного метода. *N*-Концевой пентапептид (XVI) получали по схеме [2+3], причем дипептид Boc-Leu-Leu-OH – по методу активированных эфиров, а трипептид Boc-Trp-Asp(OBzl)-Thr-Ome – карбодиимидным методом.

До введения в реакцию конденсации пентапептид (XVI) подвергали реакции омыления под действием 2 М раствора щелочи в метаноле.

Целевые пептиды до снятия защит боковых функциональных групп подвергали очистке методом колоночной хроматографии на сефадексе

G-10. Как видно из схем 1 и 2, снятие защит с боковых функциональных групп аминокислот осуществляли пропуском тока водорода через раствор пептидов в уксусной кислоте в присутствии палладиевого катализатора в течение 2.5 ч. Идентификацию соединений на всех стадиях синтеза выполняли методом масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали хроматографическими методами.

Инфекционный анамнез групп добровольцев по гриппу. В исследовании приняли участие 55 добровольцев, которых распределили на группы: группа 1 – иммунизированные вакциной “Гриппол+” и переболевшие гриппом; группа 2 – иммунизированные вакциной “Гриппол+” и не болевшие гриппом; группа 3 – не иммунизированные вакциной “Гриппол+” и переболевшие гриппом; группа 4 – не иммунизированные вакциной “Гриппол+” и не болевшие гриппом.

Анализ анкет 55 добровольцев показал, что гриппом переболело 18 человек (32.7%); до настоящего исследования срок, прошедший после заболевания, составил более 5 месяцев (до несколь-

ких лет). Иммунизированных вакциной “Гриппол плюс” было 26 человек (47.3%); до настоящего исследования срок, прошедший после вакцинации, составил более 5 месяцев. Согласно данным анкет, добровольцы часто отмечали “стресс” до 14 дней до забора крови (14 человек, 25.5%); контакт с инфекционными больными отметило 5 человек (9.1%); прием глюкокортикостероидов был зафиксирован у одного человека, что не служило основанием для исключения из исследования. Средний возраст всех участников составил 21.8 ± 0.5 лет. В табл. 1 и 2 отражены результаты анкетирования добровольцев, распределенных по характерным группам.

В группе 1 у лиц, имеющих гибридный иммунитет (иммунитет, обеспечиваемый сочетанием перенесенной инфекции и вакцинации), до вакцинации имел место перенесенный грипп, т.е. после вакцинации не было заболевания гриппом. Среди всех добровольцев, отметивших “контакт с инфекционными больными”, не представлялось возможным определить, с какими именно инфекциями (грипп или ОРВИ) были люди, контактировавшие с участниками исследования.

Таблица 1. Количественный анализ ответов участников исследования

Категория	Количество добровольцев (<i>n</i>), ответивших утвердительно, %
Стресс	<i>n</i> = 14 или 25.5 (13.9–37.0)
Контакт с инфекционными больными	<i>n</i> = 5 или 9.1 (1.5–16.7)
Группа 1 – иммунизированные вакциной “Гриппол+” и переболевшие гриппом	<i>n</i> = 13 или 23.6 (12.4–34.9)
Группа 2 – вакцинированные “Гриппол+” и не болевшие гриппом	<i>n</i> = 6 или 11.0 (2.7–19.1)
Группа 3 – не иммунизированные вакциной “Гриппол+” и переболевшие гриппом	<i>n</i> = 13 или 23.6 (12.4–34.9)
Группа 4 – не иммунизированные вакциной “Гриппол+” и не болевшие гриппом	<i>n</i> = 23 или 41.8 (28.8–54.9)

Примечание: данные представлены в виде количества и процента добровольцев, ответивших утвердительно, в скобках указан 95%-ный доверительный интервал.

Таблица 2. Характеристика ответов участников исследования среди групп 1–4

Из них отметили	Количество участников, ответивших утвердительно			
	группа 1	группа 2	группа 3	группа 4
Стресс (<i>n</i> = 14)	5	2	5	2
Контакт с инфекционными больными (<i>n</i> = 5)	3	1	–	1
Прием глюкокортикостероидов	1 (низкое значение IFN-γ)	–	–	–

Иммуноферментный анализ. Определение концентрации IFN- γ проводили методом иммуноферментного анализа, предложенным ранее [11]. Для описания данных использовали медианы и межквартильный размах (IQR), что обусловлено ненормальным распределением данных и наличием выбросов. Для сравнения парных измерений

применяли непараметрический критерий Уилкоксона.

Результаты анализа 55 парных измерений (контроль и опыт) отражены на рис. 1. Статистически значимых различий внутри групп добровольцев, имеющих различия в статусе вакцинации и инфекционного анамнеза, не выявлено.

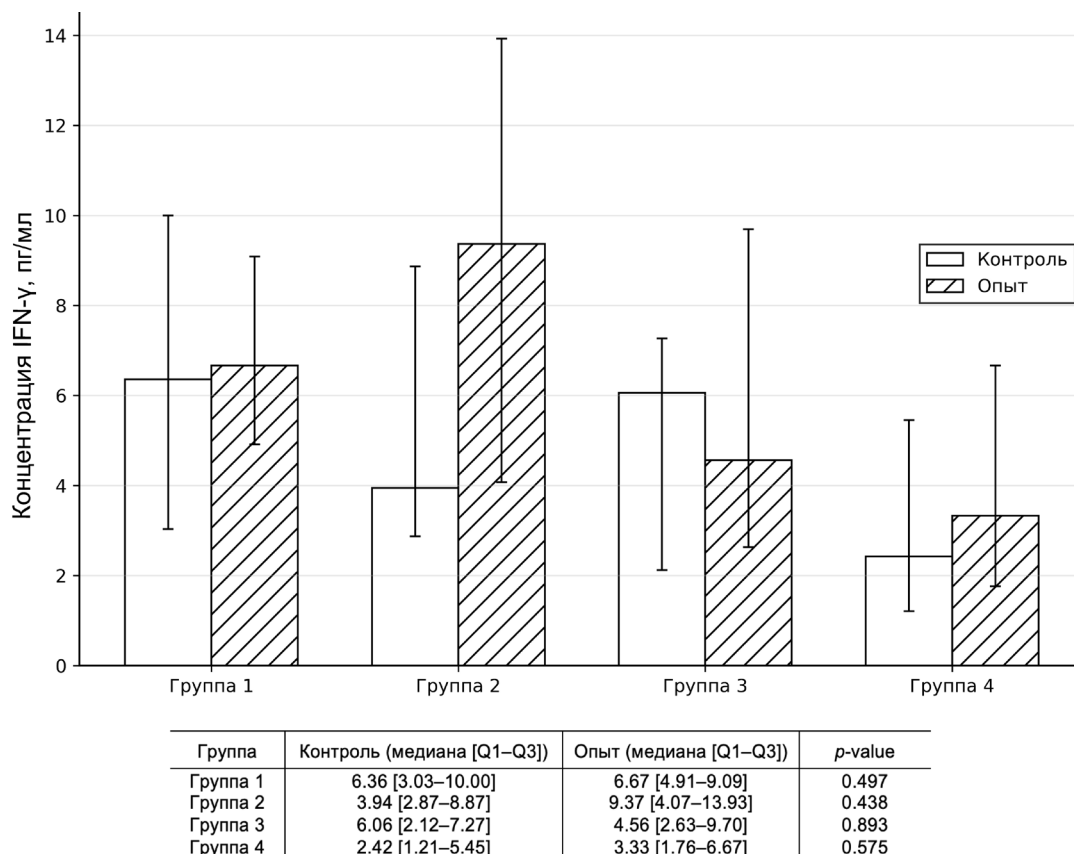


Рис. 1. Результаты определения концентрации IFN- γ в крови добровольцев методом иммуноферментного анализа после инкубации с пептидами (IX) и (XIX) (Опыт) и с физиологическим раствором (Контроль).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов. В работе использовали аминокислоты, реагенты и растворители (Novabiochem, Германия; Tokyo Chemical Industry, Япония, США; Экос-1, Россия). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: этилацетат/пиридин/уксусная кислота/вода (5 : 3 : 2 : 1) (А); хлороформ/метанол/25%-ный раствор аммиака (6 : 4 : 1) (Б); хлороформ/метанол (4 : 1) (В). Вещества обнаружи-

вали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

N-Концевую *трет*-бутильную (Boc) защитную группу удаляли 4.5 н. раствором хлороводорода в этилацетате либо 3.3 н. раствором хлороводорода в уксусной кислоте (в случае Trp-содержащих пептидов). Выходы в реакциях деблокирования были близки к количественным.

Аналитическую ВЭЖХ и масс-спектрометрию (ионизация распылением в электрическом поле (ESI MS) в режиме сканирования положительных ионов) проводили на хроматографе Agilent 1200

(Agilent Technologies, США) с масс-селективным детектором типа тройной квадруполь Agilent 6140 (США), колонка Agilent ZorbaxSBC18 RR (2.1×30 мм), размер частиц 3.5 мкм. Использовали градиент концентраций ацетонитрила 10–95% в 0.05%-ном растворе муравьиной кислоты в деионизированной воде.

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера (Wagner & Munz, Германия). Удельное вращение соединений измеряли на автоматическом поляриметре Nanon P850 Pro (Китай) при $\lambda = 589.3$ м, длина кюветы 100 мм.

Вос-Asn-Ala-OMe (I). К раствору 0.98 г (7.0 ммоль) хлоргидрата метилового эфира аланина в 6.5 мл DMF (*N,N'*-диметилформамид) добавляли 0.92 мл (8.4 ммоль) TEA (триэтиламин). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и вносили 1.98 г (7.0 ммоль) Вос-Asn-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.99 г (7.3 ммоль) HOBt (*N*-гидроксисбензотриазол) и 1.16 мл (8.4 ммоль) DIPIC (*N,N'*-диизопропилкарбодиимид). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при 0°C и 4.5 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 1 мл DMF. В фильтрат добавляли 30 мл этилацетата, полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO_3 , насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na_2SO_4 . После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролевым эфиром и сушили над P_2O_5 . После сушки в эксикаторе получили 1.85 г (83%) пептида (I). $[\alpha]_D^{25} -12.3^\circ$ (*c* 1.2 мг/мл, MeOH), R_f 0.98 (A), 0.88 (B). Масс-спектр ESI, m/z : 340.1 $[M - H + \text{Na}]^+$, 657.3 $[2M + \text{Na}]^+$.

Вос-Thr-Tyr-OH (II). К взвеси 0.91 г (5.0 ммоль) тирозина в смеси 5 мл воды и 5 мл 1 М NaOH и 0.42 г NaHCO_3 (pH 10) добавляли сукцинимидный эфир Вос-Thr-OH, полученный без выделения в диоксане из 1.09 г (5.0 ммоль) Вос-Thr-OH при добавлении 0.59 г (5.1 ммоль) HOSu и 1.07 г (5.2 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч, затем добавляли 7 мл 9%-ного раствора лимонной кислоты. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом (3×5 мл), сушили этилацетатные вытяжки над Na_2SO_4 . После сушки этилацетат упаривали, а

образовавшийся остаток растирали с петролевым эфиром и сушили над P_2O_5 . Выход соединения (II) составил 1.36 г (71%). $[\alpha]_D^{25} -32.7^\circ$ (*c* 0.92 мг/мл, MeOH), R_f 0.62 (B). ESI MS, m/z : 383.7 $[M + H]^+$, 404.3 $[M - H + \text{Na}]^+$.

Вос-Ile-Trp-OH (III). К раствору 1.02 г (5.0 ммоль) триптофана в смеси 3 мл воды и 3 мл 1 М NaOH и 0.42 г NaHCO_3 (pH 12) добавляли Вос-Ile-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1.15 г (5.0 ммоль) Вос-Ile-OH при добавлении 0.59 г (5.1 ммоль) HOSu и 1.07 г (5.2 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч, затем диоксан упаривали в вакууме, а остаток подкисляли 9%-ным раствором лимонной кислоты до pH 5. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом (3×5 мл), этилацетатные вытяжки сушили над Na_2SO_4 . После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролевым эфиром и сушили над P_2O_5 . Получили 1.25 г (60%) белого рыхлого осадка соединения (III). $[\alpha]_D^{25} -14.6^\circ$ (*c* 0.164 мг/мл, MeOH), R_f 0.78 (B). ESI MS, m/z : 418.7 $[M + H]^+$, 440.7 $[M - H + \text{Na}]^+$.

Вос-Thr-Tyr-Asn-Ala-OMe (IV). К раствору 0.86 г (3.4 ммоль) HCl·H-Asn-Ala-OMe (получен обработкой соединения (I) HCl в этилацетате) в 12 мл DMF добавляли 0.51 мл (3.7 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем вносили 1.30 г (3.4 ммоль) Вос-Thr-Tyr-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.46 г (3.4 ммоль) HOBt и 0.56 мл (3.6 ммоль) DIPIC. Время прохождения реакции – 20 ч. Очистку и выделение вещества (IV) проводили аналогично описанному для соединения (I). Получили 1.05 г (53%) пептида (IV). $[\alpha]_D^{25} -25.7^\circ$ (*c* 1.45 мг/мл, MeOH), R_f 0.86 (A), 0.73 (B). ESI MS, m/z : 582.7 $[M + H]^+$.

Вос-Leu-Asp(OBzl)-OH (V). К суспензии 1.11 г (5.0 ммоль) H-Asp(OBzl)-OH в 5 мл воды добавляли 0.83 мл (6.0 ммоль) TEA. Реакционная смесь становилась прозрачной, ее охлаждали и вносили Вос-Leu-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1.39 г (6.0 ммоль) Вос-Leu-OH, 0.80 г (7.0 ммоль) HOSu и 1.48 г (7.2 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при охлаждении. Очистку и выделение вещества (V) проводили аналогично описанному для соединения (II). Выход продукта составил 1.39 г (64%).

$[\alpha]_D^{25} -15.0^\circ$ (*c* 0.5 мг/мл, MeOH), R_f 0.87(B). ESI MS, m/z : 437.1 $[M + H]^+$.

Вос-Ile-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala-OMe (VI). К раствору 0.83 г (1.6 ммоль) HCl·H-Thr-Tyr-Asn-Ala-OMe (получен обработкой соединения (IV) HCl в этилацетате) 6 мл DMF добавляли 0.33 мл (2.4 ммоль) TEA. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и вносили охлажденный пентафторфениловый эфир Вос-Ile-Trp-OH в диоксане, полученный без выделения из 1.00 г (2.4 ммоль) Вос-Ile-Trp-OH при добавлении 0.51 г (2.8 ммоль) PfpOH и 0.54 г (2.6 ммоль) DCC. После окончания реакции (1 ч) осадок TEA·HCl отфильтровывали, а в фильтрат добавляли 15 мл диэтилового эфира. После переосаждения из метанола диэтиловым эфиром и сушки над P₂O₅ получили 1.28 г (89%) соединения (VI). $[\alpha]_D^{25} -32.7^\circ$ (*c* 0.92 мг/мл, MeOH), R_f 0.90 (A). ESI MS, m/z : 881.1 $[M + H]^+$, 902.2 $[M - H + Na]^+$.

Вос-Phe-Leu-Asp(OBzl)-OH (VII). К раствору 1.20 г (3.2 ммоль) HCl·H-Leu-Asp(OBzl)-OH (получен обработкой соединения (V) HCl в этилацетате) в 7.4 мл DMF добавляли 0.52 мл (3.8 ммоль) TEA, охлаждали до 0°C и вносили Вос-Phe-OPfp в DMF, полученный без выделения из 1.27 г (4.8 ммоль) Вос-Phe-OH при добавлении 0.92 г (5.0 ммоль) PfpOH и 1.24 г (6.0 ммоль) DCC. Время прохождения реакции – 2.5 ч. Очистку и выделение вещества (VII) проводили аналогично описанному для соединения (II). Выход трипептида составил 1.33 г (70%), $[\alpha]_D^{25} -32.7^\circ$ (*c* 1.0 мг/мл, MeOH), R_f 0.84 (A), 0.37 (B), ESI MS, m/z : 584.8 $[M + H]^+$.

Вос-Phe-Leu-Asp(OBzl)-Ile-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala-OMe (VIII). К раствору 0.84 г (1.0 ммоль) HCl·H-Ile-Thr-Tyr-Asn-Ala-OMe (получен обработкой соединения (V) HCl в уксусной кислоте) в 5 мл DMF вносили 0.19 мл (1.4 ммоль) TEA, охлаждали до 0°C и добавляли Вос-Phe-Leu-Asp(OBzl)-OPfp, полученный без выделения из 1.18 г (2.0 ммоль) соединения (VII) при добавлении 0.40 г (2.2 ммоль) PfpOH и 0.49 г (2.4 ммоль) DCC. После окончания реакции (1 ч) осадок TEA·HCl отфильтровывали, а в фильтрат добавляли 15 мл диэтилового эфира. После переосаждения из метанола диэтиловым эфиром и сушки над P₂O₅ получили 1.05 г (77%) соединения (VIII) в виде желтого порошка. $[\alpha]_D^{25} -41.1^\circ$

(*c* 0.82 мг/мл, MeOH), R_f 0.63 (A). ESI MS, m/z : 1346.3 $[M + H]^+$, 1368.3 $[M - H + Na]^+$.

HCl·H-Phe-Leu-Asp-Ile-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala-OMe (IX). Через раствор 0.54 г (0.4 ммоль) соединения (VIII) в 10 мл уксусной кислоты пропускали в течение 2.5 ч ток водорода в присутствии катализатора (3 мг палладиевой черни) при постоянном перемешивании и нагревании. После деблокирования пептида (контроль ТСХ) катализатор отделяли фильтрованием, а к фильтрату добавляли 13 мл 4.5 М раствора HCl в этилацетате. Реакционную смесь перемешивали в течение 40 мин, этилацетат упаривали, а к остатку добавляли 15 мл эфира. Выпадал рыхлый осадок, который отфильтровывали, промывали дважды эфиром и сушили в эксикаторе над NaOH. Выход соединения (IX) составил 0.39 г (82%). R_f 0.51 (A) $[\alpha]_D^{25} -29.7^\circ$ (*c* 0.7 г/мл, вода). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (IX) составляло 97%. ESI MS, m/z : 1156.8 $[M + H - HCl]^+$, 1178.8 $[M - H + Na - HCl]^+$.

Вос-Gly-Val-OMe (X). К раствору 1.17 г (7.0 ммоль) HCl·H-Val-OMe в 7 мл DMF добавляли 1.00 мл (9.0 ммоль) NMM (*N*-метилморфолин). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем вносили 1.22 г (7.0 ммоль) Вос-Gly-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.99 г (7.3 ммоль) HOBT и 1.31 мл (8.4 ммоль) DIPSC. Время прохождения реакции – 12 ч. Очистку и выделение вещества (X) проводили аналогично описанному для соединения (I). Получили 1.69 г (84%) пептида (X). $[\alpha]_D^{25} -25.7^\circ$ (*c* 1.0 мг/мл, MeOH), R_f 0.86 (B), 0.89 (A). ESI MS, m/z : 288.2 $[M]^+$, 597.4 $[2M - 2H + Na]^+$.

Вос-Thr(OBzl)-Gly-Val-OMe (XI). К раствору 1.26 г (5.6 ммоль) HCl·H-Gly-Val-OMe (получен обработкой соединения (X) HCl в этилацетате) в 8 мл DMF вносили 0.79 мл (7.2 ммоль) NMM. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем вносили 1.73 г (5.6 ммоль) Вос-Thr(OBzl)-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.78 г (5.8 ммоль) HOBT и 1.04 мл (6.7 ммоль) DIPSC. Время прохождения реакции – 14 ч. Обработку синтеза проводили по методике, описанной для соединения (I). Получили 1.98 г (74%) пептида (XI) $[\alpha]_D^{25} -14.8^\circ$ (*c* 4.0 мг/мл, MeOH), ESI MS, m/z : 502.3 $[M + Na]^+$, 559.3 $[M - 2H + 2K]^+$.

Вос-Asp(OBzl)-Thr-OMe (XII). К раствору 0.92 г (5.4 ммоль) HCl·H-Thr-OMe в 8 мл DMF вносили 0.77 мл (7.0 ммоль) NMM. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем вносили 1.74 г (5.4 ммоль) Вос-Asp(OBzl)-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.76 г (5.6 ммоль) HOBt и 1.01 мл (6.5 ммоль) DIPSC. Время прохождения реакции – 12 ч. Очистку и выделение вещества (XII) проводили аналогично описанному для соединения (I). (I). Получили 1.61 г (68%) пептида (XII) в виде прозрачного масла. $[\alpha]_D^{25}$ –18.3° (с 1.1 мг/мл, MeOH), R_f 0.68 (Б). ESI MS, m/z : 461.4 $[M + Na]^+$, 899.8 $[2M + Na]^+$.

Вос-Val-Thr(OBzl)-Gly-Val-OMe (XIII). К раствору 1.11 г (2.6 ммоль) HCl·H-Thr(OBzl)-Gly-Val-OMe (получен обработкой соединения (XI) HCl в этилацетате) в 6 мл DMF вносили 0.36 мл (3.3 ммоль) NMM. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем вносили 0.57 г (2.6 ммоль) Вос-Val-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.36 г (2.7 ммоль) HOBt и 0.48 мл (3.1 ммоль) DIPSC. Время прохождения реакции – 12 ч. Очистку и выделение вещества (XIII) проводили аналогично описанному для соединения (I). Получили 1.02 г (68%) пептида (XIII). $[\alpha]_D^{20}$ –13.2° (с 1.5 мг/мл, MeOH), R_f 0.87 (Б). ESI MS, m/z : 600.8 $[M - H + Na]^+$, 1201.6 $[2M - 2H + 2Na]^+$.

Вос-Trp-Asp(OBzl)-Thr-OMe (XIV). К раствору 1.31 г (3.5 ммоль) HCl·H-Asp(OBzl)-Thr-OMe (получен обработкой соединения (XII) HCl в этилацетате) в 8 мл DMF вносили 0.49 мл (4.5 ммоль) NMM. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем вносили 1.06 г (3.5 ммоль) Вос-Trp-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.50 г (3.7 ммоль) HOBt и 0.65 мл (4.2 ммоль) DIPSC. Время прохождения реакции – 8 ч. Обработку синтеза проводили по методике, описанной для соединения (I). Получили 1.57 г (72%) пептида (XIV). $[\alpha]_D^{20}$ –22.4° (с 2.0 мг/мл, MeOH), R_f 0.78 (Б). ESI MS, m/z : 624.0 $[M - H]^+$, 1294.1 $[2M - 2H + 2Na]^+$.

Вос-Leu-Leu-ОН (XV). К раствору 0.66 г (5.0 ммоль) лейцина в 4 мл воды и 3 мл 1 M NaOH и 0.42 г NaHCO₃ (pH 12) добавляли Вос-Leu-OSu, полученный без выделения в диоксане из 1.55 г (6.7 ммоль) Вос-Leu-ОН при добавлении

0.92 г (8.0 ммоль) HOSu и 1.86 г (8.0 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч, затем диоксан упаривали в вакууме, а остаток подкисляли 9%-ным раствором лимонной кислоты до pH 5. Продукт трижды экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл), этилацетатные вытяжки сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся остаток растирали с петролейным эфиром и сушили над P₂O₅. Получили 1.12 г (65%) белого кристаллического вещества (XV) с т. пл. 114–118°C; $[\alpha]_D^{25}$ –36.8° (с 2.8 мг/мл, MeOH), R_f 0.67 (А). ESI MS, m/z : 267.2 $[M + Na - 100]^+$, 367.2 $[M + Na]^+$, 711.5 $[2M + Na]^+$.

Вос-Leu-Leu-Trp-Asp(OBzl)-Thr-OMe (XVI). К раствору 1.29 г (2.3 ммоль) HCl·H-Trp-Asp(OBzl)-Thr-OMe (получен обработкой соединения (XIV) HCl в уксусной кислоте) в 5 мл DMF вносили 0.75 мл (6.9 ммоль) NMM. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем вносили 0.79 г (2.3 ммоль) Вос-Leu-Leu-ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.32 г (3.4 ммоль) HOBt и 0.44 мл (2.8 ммоль) DIPSC. Время прохождения реакции – 12 ч. Очистку и выделение вещества (XVI) проводили аналогично описанному для соединения (I). После сушки этилацетат упаривали, а продукт растирали с эфиром. Получили 1.25 г (64%) пептида (XVI). $[\alpha]_D^{20}$ –19.9° (с 0.8 мг/мл, MeOH), R_f 0.80 (А). ESI MS, m/z : 850.0 $[M - H]^+$, 1746.8 $[2M - 2H + 2Na]^+$.

Вос-Leu-Leu-Trp-Asp(OBzl)-Thr-ОН (XVII). К раствору 1.10 г (1.3 ммоль) соединения (XVI) в 7.8 мл метанола добавляли 0.78 мл 2 M NaOH. Ход реакции омыления отслеживали хроматографически. После окончания реакции (2 ч) в реакционную смесь вносили 4.5 M HCl раствор в этилацетате (pH 3–4), упаривали в вакууме досуха, к образовавшему остатку добавляли 4 мл метанола, не растворившийся осадок NaCl отфильтровывали, к фильтрату приливали 15 мл эфира. После переосаждения из метанола эфиром и сушки в эксикаторе над P₂O₅ получили 0.79 г (73%) вещества (XVII) с т. пл. 127–128°C; $[\alpha]_D^{20}$ –10.3° (с 0.8 мг/мл, MeOH), R_f 0.70 (Б). ESI MS, m/z : 859.42 $[M - H + Na]^+$.

Вос-Leu-Leu-Trp-Asp(OBzl)-Thr-Val-Thr-(OBzl)-Gly-Val-OMe (XVIII). К раствору 0.55 г (0.9 ммоль) HCl·H-Val-Thr(OBzl)-Gly-Val-OMe (получен обработкой соединения (XIII) HCl в

уксусной кислоте) в 5 мл DMF вносили 0.12 мл (1.1 ммоль) NMM, охлаждали до 0°C и добавляли 0.75 г (0.9 ммоль) Boc-Leu-Leu-Trp-Asp(OBzl)-Thr-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд последовательно добавляли 0.16 г (1.2 ммоль) HOBt и 0.20 мл (1.3 ммоль) DIPIC. Время прохождения реакции – 12 ч. После окончания реакции осадок NMM-HCl отфильтровывали, а в фильтрат добавляли 15 мл диэтилового эфира. После переосаждения из метанола диэтиловым эфиром и сушки над P₂O₅ получили 0.97 г (66%) соединения (XVIII). $[\alpha]_D^{25}$ –32.7° (с 1.0 мг/мл, MeOH), R_f 0.58 (A). ESI MS, m/z : 1345.4 $[M + H]^+$, 1366.4 $[M - H + Na]^+$.

HCl-H-Leu-Leu-Trp-Asp-Thr-Val-Thr-Gly-Val-OMe (XIX). Через раствор 0.81 г (0.6 ммоль) соединения (XVIII) в 10 мл уксусной кислоты пропускали в течение 2.5 ч ток водорода в присутствии катализатора (3 мг палладиевой черни) при постоянном перемешивании и нагревании. После деблокирования пептида (контроль ТСХ) катализатор отделяли фильтрованием, а к фильтрату добавляли 15 мл 3 М раствора HCl в уксусной кислоте. Реакционную смесь перемешивали в течение 40 мин, раствор упаривали, а к остатку добавляли 15 мл эфира. Выпадал рыхлый осадок, который отфильтровывали, промывали дважды эфиром и сушили в эксикаторе над NaOH. Выход соединения (XIX) составил 0.47 г (75%), R_f 0.76 (A) $[\alpha]_D^{25}$ –19.7° (с 0.95 мг/мл, вода). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (XIX) составляло 98%. ESI MS, m/z : 1018.5 $[M + H - HCl]^+$, 1037.2 $[M - H + Na - HCl]^+$, 2112.9 $[2M + 2Na - HCl]^+$.

Добровольцы. Обследовали 55 добровольцев в возрасте 20–26 лет, чьи образцы венозной крови были собраны в июле 2024 г. Участники заполняли ретроспективную анкету, давали добровольное информированное согласие. Вопросы в анкетах подразделялись на обязательные и дополнительные. Обязательный блок вопросов касался того, когда и чем переболел и вакцинирован. Дополнительный блок включал вопросы, содержащие указания на инфекционный анамнез, наличие стресса и приема глюкокортикостероидов до исследования, реакции на вакцины в анамнезе, результаты типирования. У каждого добровольца осуществляли забор 5 мл венозной крови из кубитальной вены в стеклянную пробирку со 100 мкл гепарина (100 ед.).

Иммуноферментный анализ. В микропробирки, содержащие 50 мкл раствора пептидов (IX) и (XIX) с концентрацией 1 мкг/мл (“опыт”) и 50 мкл физиологического раствора (“контроль”), вносили по 2 мл крови добровольцев. Пробирки встряхивали 5–10 с, затем инкубировали 24 ч при 37°C. В качестве стандартного раствора для определения IFN-γ использовали надосадочную жидкость, полученную при центрифугировании микропробирок на 3000 об/мин в течение 10 мин. Определение концентрации IFN-γ каждого участника проводили однократно в пробирках контрольного и опытного образцов методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических тест-систем ЗАО “Вектор-Бест” (Новосибирск, Россия) на фотометре универсальном Ф 300ТП (Витязь, Беларусь) с программным обеспечением Medarm при длине волны 450 нм.

Статистический анализ проводили с использованием языка программирования Python 3.9 в облачной среде Google Colab. Для анализа применяли следующие пакеты: NumPy 1.21.0 – для работы с массивами данных, SciPy 1.7.0 – для статистического анализа (критерий Уилкоксона для парных выборок), Pandas 1.3.0 – для обработки табличных данных и Matplotlib 3.4.0 – для визуализации результатов. Код для анализа доступен по запросу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы осуществлен синтез пептидов Phe-Leu-Asp-Ile-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala и Leu-Leu-Trp-Asp-Thr-Val-Thr-Gly-Val – фрагментов (432–440 а.о.) гемагглютинирина вируса А и (454–462 а.о.) нейраминидазы вируса гриппа В соответственно. Предложен метод оценки иммуногенности данных пептидов, основанный на определении концентрации IFN-γ, ключевого маркера специфического Т-клеточного иммунного ответа. В настоящем исследовании не было получено статистически значимых различий внутри групп добровольцев, имеющих различия в статусе вакцинации и инфекционного анамнеза.

В дальнейшем требуется проведение серии экспериментов с достаточным (рассчитанным) количеством добровольцев для увеличения выборки формируемых групп, а также, возможно, с подбором концентраций пептидов, оптимизации инкубации и выбора метода детекции IFN-γ. После

оптимизации и валидации настоящего метода можно перейти к клинической диагностике клеточного иммунного ответа на вирус гриппа А.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена с использованием бюджетных средств Института биоорганической химии НАН Беларуси и Витебского государственного медицинского университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты, выполненные в данном исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Программа исследования одобрена Этическим комитетом Витебского государственного медицинского университета (протокол № 2 от 29.02.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ЯВВ, ГОВ; экспериментальные работы – ЦАМ, ГОВ, МВП, написание статьи – ГОВ, ЦАМ, МВП, ЯВВ; анализ данных – ЦАМ, ЯВВ, ГОВ; администрирование проекта – ГОВ.

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. Influenza (Seasonal). World Health Organization. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
2. Hagiwara Y., Harada K., Nealon J., Okumura Y., Kimura T., Chaves S.S. // PLoS One. 2022. V. 17. P. e0272795–e0272813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272795>
3. Murchu E., Comber L., Jordan K., Hawkshaw S., Marshall L., O'Neill M., Ryan M., Teljeur C., Carnahan A., Pérez J.J., Robertson A.H., Johansen K., Jonge J., Krause T., Nicolay N., Nohynek H., Pavlopoulou I., Pebody R., Penttinen P., Soler-Soneira M., Wichmann O., Harrington P. // Rev. Med. Virol. 2023. V. 33. P. e2331. <https://doi.org/10.1002/rmv.2330>
4. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. // Crit. Care Med. 2016. V. 37. P. 487–500. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584801>
5. Krammer F., Smith G.J., Fouchier R.A., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G. // Nat. Rev. Dis. Primers. 2018. V. 4. P. 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
6. Найхун А.Н., Лосев И.В. // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60. С. 11–16.
7. Kim S.-H., España E., Padasas B.T., Son J.-H., Oh J., Webby R.J., Lee Y.-R., Park C.-S., KimInfluenza J.-K. // Immune Netw. 2024. V. 24. P. e19. <https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e19>
8. Coughlan L., Lambe T. // Vaccines (Basel). 2015. V. 3. P. 293–319. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020293>
9. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейер М., Лобзин Ю.В. // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7. С. 10–22.
10. Krit N.A., Filatova M.P., Kovalchuk O.V., Beschastnaya N.V. // Bioorg. Khim. 1981. V. 7. P. 965–970.
11. Цыганков А.М., Грибовская О.В., Мартинович В.П., Голубович В.П., Хайрулина Н.В., Янченко В.В. // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2024. Т. 21. С. 53–61. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-53-61>

Assessment of Adaptive Immune Response Against Influenza Using Synthetic Peptides

O. V. Gribovskaya^{*, #}, A. M. Tsygankov^{**}, V. P. Martinovich^{*}, and V. V. Yanchenko^{**}

[#] Phone: +3 (751) 737-387-53; e-mail: olymelnik@yandex.ru

^{*} Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Akad. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220084 Belarus

^{**} Vitebsk State medical University, prosp. Frunze 27, Vitebsk, 210023 Belarus

This study tested a method for assessing the immunogenicity of synthetic peptides, which could form the basis for a clinical diagnostic method for the cellular immune response to influenza A virus. The two peptides used are identical in amino acid composition to the 9-mer epitopes of influenza virus surface proteins relevant to the vaccine strains of the Northern Hemisphere for the 2023–2024 season and represent a fragment (432–440 aa) of influenza A virus hemagglutinin (Phe-Leu-Asp-Ile-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala) and a fragment (454–462 aa) of influenza B virus neuraminidase (Leu-Leu-Trp-Asp-Thr-Val-Thr-Gly-Val). The peptides were synthesized using classical methods of peptide chemistry, with activated esters and the carbodiimide method as the main condensation methods. Fifty-five volunteers aged 20–26 years participated in the clinical study. Gamma interferon (IFN- γ) levels were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. No statistically significant results were obtained for all pairwise comparisons of IFN- γ concentrations in 55 cases. This method needs to be optimized for clinical diagnosis of the cellular immune response to influenza A virus.

Keywords: peptide synthesis, gamma interferon, influenza virus, adaptive immune response