

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ АДЬЮВАНТОВ НА АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИЗ ФРАГМЕНТОВ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА E2 ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Е.А. Егорова^{1,2}, Т.М. Мельникова³, М.В. Мельникова^{1,4}, М.Г. Завьялова¹, Л.В. Кострюкова¹, О.В. Чибискова¹,
Р.И. Атауллаханов⁵, Е.Ф. Колесанова^{1*}

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: EKolesanova@yandex.ru

²Университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., 1

³Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Ленинский пр., 47

⁴Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий, Москва, Балтийская ул., 8

⁵Государственный научный центр "Институт иммунологии"
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Каширское ш., 24

Показано, что эффективность иммунного ответа в виде продукции специфичных антител против иммуногенных пептидных конструкций, составленных из консервативных фрагментов оболочечного белка E2 вируса гепатита С, зависит от использованных в составе препаратов адъювантов и носителей. Наиболее эффективное образование специфичных антител отмечено в ответ на введение пептидных конструкций, содержащих В- и Т-эпитопы белка E2, конъюгированных с носителем с адъювантными свойствами Иммуномакс. Антитела, полученные в ответ на иммунизацию конъюгатами пептидных конструкций с Иммуномаксом, связывали оболочечный белок E2 и гетеродимер оболочечных белков E1E2 вируса гепатита С.

Ключевые слова: пептидные вакцины; вирус гепатита С; оболочечные белки; синтез пептидов; адъюванты; Иммуномакс

DOI: 10.18097/BMCRM00227

ВВЕДЕНИЕ

Низкая эффективность иммунных ответов на пептидные вакцины, которые пытались внедрять в клиническую практику (например, на терапевтическую вакцину против гепатита С [1, 2] и против SARS-CoV2 («ЭпиВакКорона» [3-5]), не охладила интерес к подобным вакцинам. Это вызвано ранее отмеченными в обзорах преимуществами пептидных вакцин по сравнению с вакцинами на основе цельных микроорганизмов (живых и убитых), субъединичными вакцинами и вакцинами на основе рекомбинантных белков-антигенов: а) безопасные технологии производства пептидов; б) высокая степень стандартизации пептидных антигенов и отсутствие чужеродного генетического материала; в) возможность формирования эффективного иммунного ответа на антигенные детерминанты, обладающие в составе целой молекулы слабой иммуногенностью; г) исключение компонентов и фрагментов молекул патогена, вызывающих высокую реактогенность, аллергические и аутоиммунные реакции; д) возможность компоновки искусственных конструкций из нескольких различных антигенных детерминант, происходящих из разных молекул антигенов [6-9]. Однако одним из основных недостатков пептидных вакцин является их неспособность стимулировать систему врожденного иммунитета и тем самым вызывать формирование достаточно длительного иммунного ответа и иммунологической памяти [6-10]. Пептиды в составе вакцины выполняют функцию иммуногенов – молекул, на которые будет направлен специфический иммунный

ответ – образование антител, специфичных к возбудителю заболевания или его основному патогену, стимулирование цитотоксических и хелперных Т-клеток [1, 3, 6-9, 11]. Но для эффективного формирования иммунологической памяти необходимо стимулирование системы врожденного иммунитета и обеспечение достаточно длительного воздействия иммуногена на клетки иммунной системы в зародышевых центрах лимфоузлов [6, 8, 9]. Пептиды, как правило, не могут этого обеспечить из-за отсутствия соответствующей лигандной активности и неустойчивости к действию протеаз биологических жидкостей. Поэтому безусловной необходимостью для пептидных вакцин является подбор адъювантов и носителей, обеспечивающих как активацию системы врожденного иммунитета, так и повышение стабильности пептидных антигенов [8-10]. В настоящей работе было проведено сравнение эффективности иммунного ответа в виде образования специфичных антител на пептидные антигены, составленные из высококонсервативных фрагментов оболочечного белка E2 вируса гепатита С (ВГС), в сочетании с адъювантами и носителями разного типа.

МЕТОДИКА

Синтез пептидов

Пептиды синтезировали твердофазным методом на полистирол-дивинилбензольном полимере, модифицированном 4-(2',4'-диметоксифенил-



аминометил)-феноксиметильными группами (Rink amide), с емкостью 0.55 ммоль активных групп/г полимера («Applied Biosystems», США) исходя из начальной загрузки смолы в количестве, соответствовавшем 100 мкмольм активных групп, или 145.2 мг. Использовали 9-флуоренилметоксикарбонил(Fmoc)-защищенные по α -аминогруппе L-аминокислоты со следующими защитными боковых функциональных групп: Asp (D), Glu (E) – *трет*-бутоксид; Gln (Q), Asn (N), His (H) и Cys (C) – тритильной; Arg (R) – 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонильной; Lys (K) и Trp (W) – *трет*-бутилоксикарбонильной, Ser (S), Thr (T) и Tyr (Y) – *трет*-бутильной (все – «ChemPer», США). Синтез проводили на автоматическом синтезаторе 433A фирмы «Applied Biosystems» в среде N,N'-диметилформамида (ос.ч., «Спектр-хим», Россия). Fmoc-защиту с α -аминогруппы удаляли обработкой 22% раствором 4-метилпиперидина («Acros Organics», Бельгия) [11, 12]. Fmoc-аминокислоты активировали гексафторфосфатом O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруния (HBTU) и этиловым эфиром циан-гидроксииминоацетата (Охума Pure; «ChemPer») в присутствии 2,4,6-коллидина («Acros Organics») [13]. В реакциях присоединения использовали 10-кратный избыток Fmoc-аминокислот. Пептиды снимали со смолы вместе с удалением защит с боковых функциональных групп обработкой смесью трифторуксусная кислота (ТФУ):3,6-диокса-1,8-октандитиол:три-изопропилсилан:анизол:вода 183:5:2:5:5 (об./об.) в течение 2 ч [12, 13]. Пептиды осаждали смесью метил-*трет*-бутиловый эфир:гексан 1:1 (об./об) и высушивали над КОН.

Очистку пептидов проводили ВЭЖХ на обращенной фазе (колонка ZORBAX SB-C8 21 x 250 мм, 7 мкм, хроматографическая станция Agilent 1100, «Agilent», США) в градиенте концентрации ацетонитрила: 0-15 мин – от 0 до 32 %, 15-45 мин – от 32 до 38 %, 45-50 мин – 38-100 % в воде в присутствии 0.1% ТФУ при скорости элюции 15 мл/мин и регистрации абсорбции элюата при 210 нм. Полученные очищенные препараты пептидов упаривали и лиофилизировали. Степень чистоты пептидов определяли аналитической ВЭЖХ (колонка ZORBAX SB-C8 4.6x150мм, 3.5 мкм, 100 Å, градиент концентрации ацетонитрила в 0.1% водном растворе ТФУ 0-100% за 50 мин, скорость элюции 1 мл/мин) и масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре высокого разрешения MaXis 4G («Bruker Daltonics», Германия; регистрация положительно заряженных ионов в диапазоне 500-2000 Да).

Липидные наночастицы, содержащие пептиды, получали смешиванием 400 мг сквалена («Acros Organics»), 20 мг Lipoid S100 («Lipoid», Германия), 400 мг Tween 80 («Ferak Berlin GmbH», Германия), 5 мг пептида в 10.0 мл дистиллированной воды с последующим доведением pH до 7.2-7.4 раствором 1M NaOH («Merck», Германия). Смесь обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе Bandelin Sonopuls HD 2200 («Bandelin», Германия) с использованием титанового стержня KE76 при мощности 70% во льду 6 циклов по 1 мин. Число циклов обработки устанавливали по достижению постоянной величины светопропускания при 660 нм не менее 60% на спектрофотометре Agilent 8453 («Agilent», Германия) с программным обеспечением HP UV Visible ChemStation version A10.01. Полученную эмульсию

фильтровали через фильтр с порами 0.22 мкм («Merck Millipore», США). В полученном фильтрате определяли размер частиц методом динамического светорассеяния на анализаторе ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZETASIZER 6.20. После ультрафильтрации полученного препарата с использованием Vivaspin 6, 10 кДа («Sigma-Aldrich», США) в сконцентрированном в 10 раз ультрафильтрате определяли не связавшиеся с наночастицами пептиды аналитической ВЭЖХ, как указано выше. Аналогично получали липидные наночастицы без пептидов.

Конъюгаты пептидов с Иммуномаксом (ИМ) получали с использованием препарата «Иммуномакс», предоставленного «Иммафарма» (Россия) и дополнительно очищенного диализом против воды и гель-фильтрацией на колонке с TSK-75 («Toyo Soda», Япония, 950x30 мм) с элюцией водой. Для получения конъюгатов использовали лиофильно высушенную высокомолекулярную фракцию, элюировавшуюся сразу за свободным объемом колонки. Конъюгацию проводили с использованием диэтилового эфира квадратной кислоты (3,4-диэтокси-3-циклобутен-1,2-дион; ДЭКК; «Acros organics») в две стадии [14]. На первой стадии активировали ИМ ДЭКК в 0.1 M Na-фосфатном буфере, pH 7.15 при массовом соотношении ИМ:ДЭКК 1:1.7, активированный ИМ отделяли от реагента гель-фильтрацией (см. выше) и лиофилизировали. Пептиды CR4-CR5 и CR5-CR3 (табл. 1) растворяли в смеси 8M водного раствора мочевины и диметилсульфоксида (1:4 по объему) до концентрации 1.0 мг/мл. 0.5 мл раствора пептида добавляли к 0.5 мл раствора ИМ, модифицированного ДЭКК (1.5 мг), в 0.1 M фосфатном буфере, pH 7.45, после чего в реакционную смесь добавляли 50 мкл 0.5 M Na-боратного буфера, pH 8.5 и выдерживали 12 ч при 4°C. Конъюгаты диализовали последовательно против 8 M и 4 M растворов мочевины и 0.1 M фосфатного буфера. pH 7.45. Полученные растворы конъюгатов сильно опалесцировали и содержали небольшое количество осадка. Для введения мышам растворы конъюгатов разводили 0.9% раствором NaCl для инъекций до требуемой концентрации – 5 мкг, 20 мкг и 50 мкг конъюгата (в расчете на ИМ) в 100 мкл раствора.

Иммуногенность пептидов и конъюгатов определяли по величинам титров специфичных антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных соответствующими препаратами. Каждым препаратом иммунизировали группу из 6 мышей BALB/c, включающей 3 самца и 3 самки. Препараты (табл. 2) вводили подкожно в объеме 100 мкл в 6 точек на спине три раза с интервалом две недели. Для иммунизации пептиды растворяли в 0.85% растворе NaCl с 10 mM Na-фосфатным буфером pH 7.2 (phosphate buffered saline; PBS) до концентрации пептида 1 мг/мл. Образцы с адьювантом Фрейнда (1-я иммунизация – с полным адьювантом, 2-я и 3-я – с неполным) получали смешиванием 1 объема раствора пептида с 1 объемом адьюванта. Образцы пептидов в виде механической смеси с ИМ получали смешиванием 1 объема раствора пептида и 1 объема раствора очищенного ИМ в концентрации 1.5 мг/мл. Мышей забивали декапитацией через неделю после последней инъекции, из собранной крови получали сыворотку, которую разделяли на аликвоты и хранили при -20°C до определения титров антител.

Таблица 1. Синтетические пептидные конструкции

Пептид	Аминокислотная последовательность конструкции	Мол. масса, Да (расчетная)	Мол. масса, Да (методом масс-спектрометрии, моноизотопная преобладающая)	Содержание целевого пептида в препарате, %
CR4-CR5	DYPYRLWHYGGSTGLIHLHQNIVD-VQYLYG-амид	3576.98	3576.740	90
CR5-CR3	STGLIHLHQNIVDVQYLYGGCPTDCFRKHPEATYS-амид	3959.90	3959.922	87

Определение титров антител против пептидов и оболочечных белков E2 и E1E2 ВГС методом иммуноферментного сорбционного анализа проводили, как описано ранее [15, 16], за исключением того, что пептиды CR4-CR5 и CR5-CR3 адсорбировали на поверхность лунок иммунологических планшетов высокой сорбционной емкости напрямую из 0.1 М Na-бикарбонатного буфера, pH 8.5. Белок E2 (водорастворимая форма и гетеродимер E1E2) были любезно предоставлены д-ром Ж. Дюбюиссоном, Институт биологии, Лилль, Франция.

In silico поиск Т-хелперных эпитопов в высококонсервативных фрагментах аминокислотной последовательности белков E1 и E2 проводили с помощью программных продуктов баз данных SYFPEITHI [17] и IEDB [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами был предложен подход к конструированию пептидных иммуногенов для вакцины против гепатита С, заключающийся в соединении в одной искусственной пептидной конструкции высококонсервативных В- и Т-хелперного эпитопов из состава оболочечных белков E1 и E2, причем выбранный В-эпитоп должен был обладать функциональной активностью, существенной для ВГС [19]. Эффективность этого подхода была нами подтверждена с точки зрения образования антител, специфичных как к В-эпитопам, так и к целым оболочечным белкам вируса [19]. Иммуногенность таких конструкций с образованием как пептид-, так и белок-специфичных антител была зарегистрирована только при введении с адъювантом Фрейнда (АФ), что свидетельствует о недостаточно эффективном стимулировании иммунного ответа одними пептидами и их неправильной ориентации в составе образующихся в растворе агрегатов/мицелл [19]. Однако АФ не может быть использован в вакцинах для людей из-за своей высокой реактогенности [10]. Поэтому мы тестировали иммуногенность пептидных конструкций из высококонсервативных фрагментов оболочечного белка E2 ВГС в виде препаратов с фармацевтически приемлемыми адъювантами и носителями. В состав использованных в эксперименте пептидных конструкций (табл. 1) входят высококонсервативные участки CR3, CR4 и CR5 (обозначения согласно работе [20]) белка E2.

CR3 и CR4 связывали гепарансульфаты, ответственные за первичную фиксацию вируса на клетках [21], соответственно, антитела против этих В-эпитопов могли бы блокировать первичную фиксацию вируса на клетках

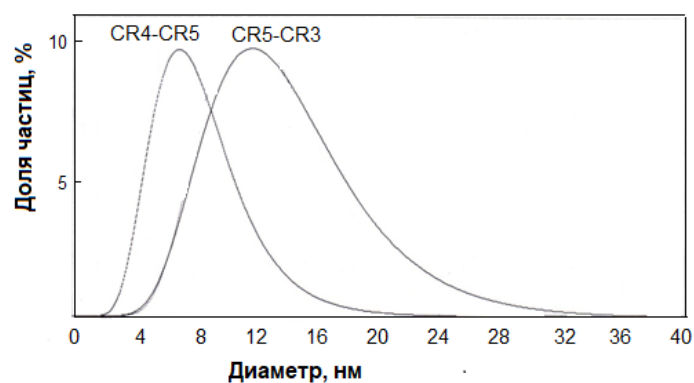


Рисунок 1. Размеры олигомеров пептидов CR4-CR5 и CR5-CR3, определенные методом динамического светорассеяния.

[22, 23]. CR5 содержит Т-хелперные эпитопы, выявленные *in silico* с использованием программных продуктов SYFPEITHI [17] и IEDB [18] и подтвержденные в экспериментах по иммунизации животных [19] и по активации Т-лимфоцитов пациентов с гепатитом С [24]. Кроме того, у пациентов с гепатитом С выявлялись антитела, специфичные по крайней мере к двум линейным В-эпитопам участка CR5 [16].

Для выяснения влияния адъюванта и носителя на иммуногенность полученных пептидных конструкций последними иммунизировали мышей в виде следующих препаратов: 1) растворов пептидов в фосфатно-солевом буфере, 2) смеси этих растворов с АФ, 3) пептидов, включенных в состав фосфолипидно-скваленовых наночастиц (ФСН), 4) конъюгатов и 5) смесей ИМ с пептидами, 6) смеси конъюгатов пептид-ИМ с ФСН и 7) конъюгатов пептидов с декстраном. Использование для иммунизации пептидов без носителей обосновано тем, что в растворах с концентрацией 1 мг/мл указанные пептидные конструкции образовывали частицы диаметром 3-12 нм (медиана 5 нм; CR4-CR5) и 5-28 нм (медиана 12 нм; CR5-CR3) (рис. 1), что свидетельствовало об олигомеризации. В ряде случаев была отмечена иммуногенность таких мицелл с образованием антипептидных антител у иммунизированных ими животных [19]. Сквален используется в качестве иммуностимулятора в составе эмульсионных адъювантов в современных вакцинах [1-3, 10, 25]. Показана также эффективность ФСН, стабилизированных фармацевтически приемлемым детергентом Tween 80, в качестве одновременно носителя и адъюванта для субъединичных вакцин [26], что обусловило нашу попытку применения ФСН для повышения иммуногенности пептидных конструкций. Пептиды включали в состав ФСН с

Tween 80 в процессе получения обработкой ультразвуком. Полученные препараты ФСН с пептидами содержали наночастицы со средним диаметром 89-99 нм. (рис. 2).

После ультрафильтрации ФСН с пептидами в сконцентрированном фильтрате пептиды обнаруживались ВЭЖХ с масс-детектированием в следовых количествах, что свидетельствовало об их довольно прочной адсорбции на ФСН либо о включении в ФСН.

Ещё одним протестированным нами носителем пептидных антигенов с адьювантной активностью был ИМ – высокомолекулярный липопроотеогликан из проростков картофеля [27], способный активировать клетки иммунной системы, ответственные за врожденный иммунитет, через посредство толл-подобных рецепторов 4 типа и зарегистрированный в качестве лекарственного препарата с иммуномодуляторной активностью [27, 28]. Ранее ИМ был успешно использован в качестве носителя при получении моноклональных антител против неструктурных белков ВГС [29]. Поскольку ИМ содержит свободные аминокислоты, пептидные конструкции, также содержащие свободные аминокислоты, конъюгировали с этим протеогликаном с использованием ДЭЖК, две карбокси-группы которого активируются при различных величинах pH и обеспечивают последовательную сшивку двух аминокислотных соединений [14]. Так как ИМ почти не содержит компонентов, поглощающих при 280 нм, конъюгацию пептидов можно было бы оценить по увеличению оптической плотности раствора конъюгата при этой длине волны, однако сильная опалесценция раствора конъюгата не позволила провести точную оценку количества связанного пептида. Сложный состав и высокая молекулярная масса компонентов ИМ также не позволяли оценить количество конъюгированного с ним пептида с помощью аминокислотного анализа либо по изменению молекулярной массы. Согласно ранее опубликованным данным о количествах молей конъюгированных пептидов на единицу массы ИМ [29] нами было принято приблизительное содержание конъюгированных пептидов в препарате конъюгата 1% от массы ИМ. Помимо конъюгатов пептидов с ИМ нами было проведено тестирование на иммуногенность механической смеси пептидных конструкций с ИМ, в которых протеогликан выступал только как адьювант, а также конъюгата пептидов с декстраном, для исследования влияния высокомолекулярного, но не иммунореактивного носителя.

Была проведена оценка эффективности и специфичности иммунного ответа на введение вышеуказанных препаратов пептидов группам мышей, состоящих из равного числа самцов и самок. Специфичность оценивалась по формированию антител как против отдельных фрагментов пептидных конструкций как В-эпитопов, так и против целого оболочечного белка E2 и гетеродимера E1E2 ВГС. В таблице 2 приведены результаты определения титров антипептидных и антибелковых антител у животных, иммунизированных препаратами пептидов в композиции или в виде конъюгатов с различными адьювантами. Как видно из таблицы, пептиды CR4-CR5 и CR5-CR3 сильно различаются по иммуногенности: пептид CR5-CR3 вызывал образование специфичных антител у мышей даже при введении без адьювантов, тогда как для получения антител против пептида CR4-CR5 даже простого добавления адьюванта было недостаточно, требовалась конъюгация

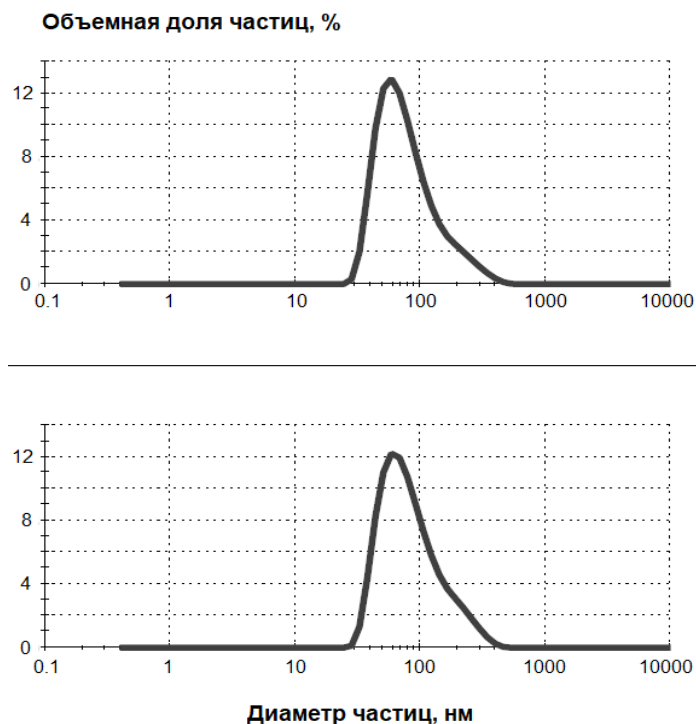


Рисунок 2. Распределение фосфолипидно-скаленовых наночастиц с пептидами по размерам: верхний график – ФСН с пептидом CR4-CR5, нижний – ФСН с пептидом CR5-CR3

этого пептида с ИМ - носителем с адьювантными свойствами. В случае пептида CR4-CR5 важными были, по-видимому, и фиксация антигена на высокомолекулярном носителе, и стимулирование иммунной системы в направлении образования специфичных антител. Конъюгат данного пептида с ИМ вызвал образование антител, связывающихся с нативными оболочечными белками ВГС–E2 и гетеродимером E1E2, что может свидетельствовать о формировании пептидом CR4-CR5 в составе конъюгата структуры, близкой к таковой в составе оболочечного белка. Возможно, однако, что эта структура не представляет собой линейный участок, поскольку антител против отдельных частей пептида (CR4 и CR5) в сыворотках крови иммунных животных не выявлено.

Иммуногенность пептида CR5-CR3 также была заметно повышена при конъюгации с ИМ: более высокого титра антител удалось добиться при 100-кратно более низкой дозе пептида. Интересно отметить, что при введении этого пептида с АФ не отмечено, в отличие от свободного пептида, образование белок-специфичных антител; вероятно, АФ предотвращал формирование пептидом структуры, близкой к таковой в белке. В сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгатом ИМ-CR5-CR3, были выявлены антитела против фрагмента CR3 в титрах 1:500-1:1000; антитела против фрагмента CR5 не были обнаружены. ФСН в качестве адьюванта оказались менее эффективными, чем ИМ. Однако добавление ФСН к конъюгату ИМ-CR5-CR3 немного повысило эффективность образования специфичных антител.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИМ как носитель с адьювантными свойствами оказался наилучшим из исследованных адьювантов для пептидных иммуногенных конструкций, составленных из высококонсервативных фрагментов оболочечного белка

Таблица 2. Титры антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных пептидами в композициях с различными адьювантами

Пептид, доза ^а	Состав пептид-содержащей композиции	Кол-во животных ^б		С антителами к E2 и E1E2	Титры антител ^в		
		с антипептидными антителами	с антипептидными антителами		антипептидные	анти-E2	анти-E1E2
CR4-CR5, 50 мкг	PBS	0	0		-	-	-
CR4-CR5, 20 мкг	АФ в PBS	0	0		-	-	-
CR4-CR5, 5 мкг	ФСН в PBS	0	0		-	-	-
CR4-CR5, 50 мкг	ИМ в PBS	0	0		-	-	-
CR4-CR5,0.5 мкг	ИМ-CR4-CR5 в PBS	1+3(67%)	1+3(67%)		1:700	1:20	1:25
CR4-CR5,0.2 мкг	ИМ-CR4-CR5 в PBS	0+2(33%)	0+2(33%)		1:250	-	-
CR4-CR5,0.2 мкг	ИМ-CR4-CR5 + ФСН в PBS	2+3(83%)	2+2(67%)		1:1500	1:20	1:25
CR4-CR5, 5 мкг	Dextran-CR4-CR5 в PBS	0	0		-	-	-
CR5-CR3, 50 мкг	PBS	83	2+3(83%)		1:700	1:30	1:65
CR5-CR3, 5 мкг	PBS	0	0		-	-	-
CR5-CR3, 20 мкг	АФ в PBS	6(100%)	0		1:800	-	-
CR5-CR3, 5 мкг	ФСН в PBS	1+2(50%)	0		1:150	-	-
CR5-CR3, 50 мкг	ИМ в PBS	1+3(67%)	1+3(67%)		1:400	1:40	1:80
CR5-CR3,0.5 мкг	ИМ-CR5-CR3 в PBS	2+3(83%)	2+3(83%)		1:1500	1:100	1:163
CR5-CR3,0.2 мкг	ИМ-CR5-CR3 в PBS	6(100%)	3+2(83%)		1:1000	1:23	1:31
CR5-CR3,0.2 мкг	ИМ-CR5-CR3 + ФСН в PBS	2+3(83%)	2+3(83%)		1:2000	1:70	1:100

Примечание. а - дозировка указана в расчете на одно животное, б - самцы + самки, в - средние геометрические величины титров антител в сыворотках крови иммунизированных животных

Е2 ВГС. Неясно, в чём состоит различие в механизме презентации антигенов, связанных с ИМ и с ФСН, поскольку тонкие механизмы стимулирования иммунного ответа скваленом пока не исследованы [25]. В отношении ИМ можно полагать, что активация им дендритных клеток через посредство TLR4 активирует механизмы врождённого иммунитета, задействуемые в дальнейшем в формировании адаптивного иммунитета, включая образование специфических антител [27-30]. Кроме того, конъюгация пептидов с ИМ может способствовать их стабилизации, увеличивать проникновение в антигенпрезентирующие клетки и создавать пул медленно высвобождаемого иммуногена в месте введения. Вероятно, следует рассматривать ИМ как один из наиболее эффективных адъювантов для пептидных вакцин.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведение исследования на лабораторных животных было одобрено Этической комиссией при ИБМХ, протокол №2 от 12.02.2015 г.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д-ру Ж. Дюбюиссону (Институт биологии, Лилль, Франция) за предоставленные препараты белка Е1 и гетеродимера Е1Е2, А.В. Талановой и Ю.Ю. Худоклиновой (ИБМХ) за помощь в работе с животными, а также ООО «Иммафарма» за предоставление препарата «Иммуномакс». Синтез масс-спектрометрический анализ пептидов выполняли с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» ИБМХ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Разработка структуры пептида CR5-CR3 была осуществлена в рамках Госконтракта №14N08.12.0025 от 08.08.2013 г. с Минобрнауки РФ. Пилотные эксперименты были выполнены в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 0518-2014-0003), работа завершена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2021-2030 годы (тема № 122030100170-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Р.И. Атауллаханов и Т.М. Мельникова являются авторами патента РФ 2 563 818 от 21.11.2013 г., описывающего способ получения ИМ и его иммуностимулирующую активность [27]. Е.А. Егорова и Е.Ф. Колесанова являются авторами патента РФ 2 675 108 от 15.06.2015 г. «Композиция на основе синтетических пептидов и липидов для вакцины против гепатита С», описывающего иммуногенную композицию, в состав которой входит пептид CR5-CR3; владельцем патента является ИБМХ. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Предварительные результаты работы по тестированию иммуногенности конъюгатов пептидов CR4-CR5, CR5-CR3 с ИМ в сравнении с композициями пептидов с фосфолипидными наночастицами размером 20 нм были представлены в виде стендовых сообщений на форуме «Дни иммунологии в

Санкт-Петербурге» в 2015 г. и на 36 Европейском пептидном симпозиуме в Лейпциге (Германия) в 2016 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klade, C.S., Wedemeyer, H., Berg, T., Hinrichsen, H., Cholewinska, G., Zeuzem, S., Blum, H., Buschle, M., Jelovcan, S., Buerger, V., Tauber, E., Frisch, J., Manns, M.P. (2008) Therapeutic Vaccination of Chronic Hepatitis C Nonresponder Patients with the Peptide Vaccine IC41. *Gastroenterology*, **134**(5), 1385-1395. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.058
2. Firbas, C., Boehm, T., Buerger, V., Schuller, E., Sabarth, N., Jilma, B., Klade, C.S. (2010) Immunogenicity and safety of different injection routes and schedules of IC41, a Hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine. *Vaccine*, **28**(12), 2397-407. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.12.072 - P.2397-2407
3. Ryzhikov, A.B., Ryzhikov, E.A., Bogryantseva, M.P., Danilenko, E.D., Imaidinov, I.R., Nechaeva, E.A., Pyankov, O.V. et al. (2021) Immunogenicity and Protectivity of the Peptide Vaccine against SARS-CoV-2. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, **76**(1), 5–19. DOI: 10.15690/vramn1572
4. Barchuk, A., Bulina, A., Cherkashin, M., Berezina, N., Rakova, T., Kuplevatskaya, D., Skougarevskiy, D., Okhotin, A. (2022) Gam-COVID-Vac, EpiVacCorona, and CoviVac effectiveness against lung injury during Delta and Omicron variant surges in St. Petersburg, Russia: a test-negative case-control study. *Respiratory Research*, **23**(1), 276. DOI: 10.1186/s12931-022-02206-3
5. Matveeva, O., Ershov, A. (2022) Retrospective Cohort Study of the Effectiveness of the Sputnik V and EpiVacCorona Vaccines against the SARS-CoV-2 Delta Variant in Moscow (June-July 2021). *Vaccines (Basel)*, **10**(7), 984. DOI: 10.3390/vaccines10070984
6. Moysa, A.A., Kolesanova, E.F. (2011) Synthetic peptide vaccines. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **57** (1), 14-30. DOI: 10.18097/PBMC20115701014
7. Chandpa, H.H., Panda, A.K., Meena, C.L., Meena, J. (2023) Beyond the polysaccharide and glycoconjugate vaccines for Streptococcus pneumoniae: Does protein/peptide nanovaccines hold promises? *Vaccine*, **41**(50), 7515-7524. DOI: 10.1016/j.vaccine.2023.11.020
8. Koirala, P., Shalash, A.O., Chen, S.R., Faruck, M.O., Wang, J., Hussein, W.M., Khalil, Z.G., Capon, R.J., Monteiro, M.J., Toth, I., Skwarczynski, M. (2024) Polymeric Nanoparticles as Oral and Intranasal Peptide Vaccine Delivery Systems: The Role of Shape and Conjugation. *Vaccines (Basel)*, **12**(2), 198. DOI: 10.3390/vaccines12020198
9. Román-Cruz, V.C., Miller, S.M., Schoener, R.A., Lukaszewicz, C., Schmidt, A.K., DeBuysscher, B.L., Burkhart, D., Seco, P.R., Evans, J.T. (2024) Adjuvanted Vaccine Induces Functional Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* Filamentous Bacteriophages. *Vaccines (Basel)*, **12**(2), 115. DOI: 10.3390/vaccines12020115
10. Huang, Z., Gong, H., Sun, Q., Yang, J., Yan, X. (2024) Research progress on emulsion vaccine adjuvants. *Heliyon*, **10**(3), e24662. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e24662
11. Aleshina, E.Y., Pyndyk, N.V., Moisa, A.A., Sanzhakov, M.A., Kharybin, O.N., Nikolaev, E.N., Kolesanova, E.F. (2008) Synthesis of b-amyloid fragment 5 RHDSGY10 and its isomers with the use of new solid-phase peptide synthesis schedule. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **54**(2), 184-191.
12. Kolesanova, E.F., Farafonova, T.E., Aleshina, E.Y., Pyndyk, N.V., Veremieva, M.V., Novosylina, A.V., Kovalenko, M.I., Shalak, V.F., Negrutskii, B.S. (2014) Preparation of monospecific antibodies against isoform 2 of translation elongation factor 1A (eEF1A2). *Biomeditsinskaya Khimiya*, **60**(1), 51-62. DOI: 10.18097/PBMC20146001051
13. Belyavtsev, A.N., Shastina, N.S., Kupriyanov, V.V., Nikolaeva, L.I., Mel'nikova, M.V., Kolesanova, E.F., Shimchishina, M.Y., Kapustin, I.V. (2022) The influence of lipid components on the immunogenicity of synthetic fragment of the virus hepatitis C antigen NS4A. *Bioorganicheskaya Khimiya*, **48**, 453-460 DOI: 10.31857/S0132342322030046
14. Hou, S.J., Saksena, R., Kovác, P. (2008) Preparation of glycoconjugates by dialkyl squarate chemistry revisited. *Carbohydrate Research*, **343**(2), 196-210. DOI: 10.1016/j.carres.2007.10.015
15. Kuzmina, T.I., Olenina, L.V., Sanzhakov, M.A., Farafonova, T.E., Abramihina, T.V., Dubuisson, J., Sobolev, B.N., Kolesanova, E.F. (2009) Antigenicity and B-epitope mapping of hepatitis C virus envelope protein E2. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **55**(1), 32-40.
16. Olenina, L.V., Nikolaeva, L.I., Sobolev, B.N., Blokhina, N.P., Archakov, A.I., Kolesanova, E.F. (2002) Mapping and characterization of B cell linear epitopes in the conservative regions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of Viral Hepatitis*, **9**(3), 174-182. DOI: 10.1046/j.1365-2893.2002.00358.x
17. Schuler, M.M., Nastke, M.-D., Stevanović, S. (2007) SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction. *Methods in Molecular Biology*, **409**, 75-93. DOI: 10.1007/978-1-60327-118-9_5
18. Vita, R.R., Overton, J.A., Greenbaum, J.A., Ponomarenko, J., Clark, J.D., Cantrel, J.R., Wheeler, D.K., Gabbard, J.L., Hix, D., Sette, A., Peters, B. (2015) The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Research*, **43**(Database issue), D405–D412. DOI: 10.1093/nar/gku938
19. Kolesanova, E.F., Sobolev, B.N., Moisa, A.A., Egorova, E.A., Archakov, A.I. (2015) The way to the peptide vaccine against hepatitis C. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(2), 254-264. DOI: 10.18097/PBMC20156102254

20. Sobolev, B.N., Poroikov, V.V., Olenina, L.V., Kolesanova, E.F., Archakov, A.I. (2000) Comparative analysis of amino acid sequences from envelope proteins isolated from different hepatitis C virus variants: possible role of conservative and variable. *Journal of Viral Hepatitis*, **7**(5), 368-374. DOI: 10.1046/j.1365-2893.2000.00242.x4
21. Olenina, L.V., Kuzmina, T.I., Sobolev, B.N., Kuraeva, T.E., Kolesanova, E.F., Archakov, A.I. (2005) Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of Viral Hepatitis*, **12**(6), 584-593. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2005.00647.x
22. Zeisel, M.B., Felmler, D.J., Baumert, T.F. (2013) Hepatitis C virus entry. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **369**, 87-112. DOI: 10.1007/978-3-642-27340-7_4
23. Farafonova, T.E., Olenina, L.V., Kolesanova, E.F. Putative hepatitis C virus cell receptors. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **54**(2), 154-166.1.
24. Semmo, N., Klenerman, P. (2007) CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.*, **13**(36), 4831-4838. DOI: 10.3748/wjg.v13.i36.4831
25. Margaroni, M., Tsanaktidou, E., Agallou, M., Kiparissides, C., Kammona, O., Karagouni, E. (2024) Development of a novel squalene/ α -tocopherol-based self-emulsified nanoemulsion incorporating Leishmania peptides for induction of antigen-specific immune responses. *International Journal of Pharmacology*, **649**, 123621. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123621
26. Fox, C.B., Baldwin, S.L., Duthie, M.S., Reed, S.G., Vedvick, T.S. (2012) Immunomodulatory and physical effects of phospholipid composition in vaccine adjuvant emulsions. *AAPS PharmSciTech*, **13**(2), 498-506. DOI: 10.1208/s12249-012-9771-x
27. Ataullakhanov, R.I., Pichugin, A.V., Mel'nikova, T.M., Khaitov, R.M. (2015) A method for producing a substance with antimicrobial, antiviral and immunostimulating activity, in particular, against dendritic cells, a substance obtained by this method, and a pharmaceutical composition based on it. Russian State Patent Agency Certificate, No.2 563 818 of 21.11.2013.
28. Nikonova, A.A., Pichugin, A.V., Chulkina, M.M., Lebedeva, E.S., Gaisina, A.R., Shilovskiy, I.P., Ataullakhanov, R.I., Khaitov, M.R., Khaitov, R.M. (2018) The TLR4 agonist Immunomax affects the phenotype of mouse lung macrophages during respiratory syncytial virus infection. *Acta Naturae*, **10**(4), 95-99]
29. Masalova, O.V., Lesnova, E.I., Pichugin, A.V., Mel'nikova, T.M., Ulanov, T.I., Burkov, A.N., Ataullakhanov, R.I., Kushch, A.A. (2008) Issledovanie immunogennosti kovalentnykh konyugatov nestrukturnykh belkov virusa gepatita C s Immunomaksom. *Immunologiya*, **29**, 338-345.
30. Hernandez, A., Patil, N.K., Stother, C.L., Luan, L., McBride, M.A., Owen, A.M., Burelbach, K.R., Williams, D.L., Sherwood, E.R., Bohannon, J.K. (2019) Immunobiology and application of toll-like receptor 4 agonists to augment host resistance to infection. *Pharmacological Research*, **150**, 104502. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104502

Поступила: 10.07.2024
 После доработки: 03.12.2024
 Принята к публикации: 27.12.2024

THE INFLUENCE OF ADJUVANTS ON ANTIGENIC PROPERTIES OF PEPTIDE CONSTRUCTS COMPOSED OF HEPATITIS C VIRUS ENVELOPE PROTEIN E2 FRAGMENTS

E.A. Egorova^{1,2}, T.M. Melnikova³, M.V. Melnikova^{1,4}, M.G. Zavyalova¹, L.V. Kostryukova¹, O.V. Chibiskova¹, R.I. Ataullakhanov⁵, E.F. Kolesanova^{1}*

¹Institute of Biomedical Chemistry, 8 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: EKolesanova@yandex.ru

²Sirius University of Science and Technology, 1 Olympic Ave., Sirius Federal Territory, Russia

³N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 47 Leninsky Ave., Moscow, Russia

⁴Research Zakusov Institute of Pharmacology, 8 Baltiyskaya str., Moscow, Russia

⁵National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, 24 Kashirskoe Rd., Moscow, Russia

Effectiveness of the immune response in the form of the production of specific antibodies against immunogenic peptide constructs composed of conservative fragments of the hepatitis C virus envelope protein E2 depended on the adjuvants and carriers used in their preparations. The most effective formation of specific antibodies was observed in response to the injection of peptide constructs containing B- and T-epitopes of the E2 protein conjugated with a carrier with adjuvant properties, Immunomax. Antibodies obtained in response to immunization with conjugates of peptide constructs with Immunomax bound both hepatitis C virus envelope protein E2 and the heterodimer of envelope proteins E1E2.

Key words: peptide vaccines; hepatitis C virus; envelope proteins; peptide synthesis; adjuvants; Immunomax

FUNDING

Design of peptide CR5-CR3 structure was performed in the frame of the State contract No. 14N08.12.0025, 08.08.2013 with the Ministry of Education and Science of the Russian Federation. Pilot experiments were performed in the frame of the Program of basic scientific research of the State Academies of sciences for 2013-2020 years (theme No. 0518-2014-0003), the research was finished in the frame of the Program of basic scientific research of the State Academies of sciences for 2021-2030 years (theme No. 122030100170-5).

Received: 10.07.2024, revised: 03.12.2024, accepted: 27.12.2024