

## Изучение перспектив использования антигена NS4A вируса гепатита С для разработки мозаичной рекомбинантной вакцины с самоадъювантными свойствами

В.В. Куприянов<sup>1</sup> (vkoup@mail.ru), Л.И. Николаева<sup>2</sup>, А.А. Зыкова<sup>1</sup>, П.И. Махновский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

### Резюме

**Целью** данного исследования было конструирование перспективных вариантов рекомбинантных белков на основе антигена NS4A вируса гепатита С для последующих работ над созданием рекомбинантной мозаичной вакцины против гепатита С. **Методами** генной инженерии были получены различные варианты рекомбинантных белков, содержащих разные фрагменты NS4A и фрагмент мышиного интерлейкина-2. Размер белковых частиц оценивали методом атомно-силовой микроскопии. Иммуногенность рекомбинантных белков проверяли на мышах Balb/c. Сыворотки оценивали, используя метод иммуноблоттинга и иммуноферментный анализ. **Результаты.** Сконструированы 6 вариантов рекомбинантных генно-инженерных конструкции на основе антигена NS4A вируса гепатита С. Удачными по эффективности экспрессии и антигенным свойствам оказались две конструкции NS4a-IL-2 и ΔNS4a-IL-2, которые представляют собой два варианта фрагментов NS4A, соединенных с фрагментом мышиного интерлейкина-2. Однако иммуногенность была выше у NS4a-IL-2. **Заключение.** Наиболее перспективным является рекомбинантный химерный белок NS4a-IL-2, который может использоваться в дальнейших разработках с целью получения вакцины против гепатита С.

**Ключевые слова:** гепатит С, вирусный полипептид NS4A, рекомбинантные белки, вакцина

### The Investigation of the Prospects for Using NS4A Antigen of Hepatitis C Virus for the Development of Recombinant Mosaic Vaccines with Self-Adjuvant Properties

V.V. Koupriyanov<sup>1</sup> (vkoup@mail.ru), L.I. Nikolaeva<sup>2</sup>, A.A. Zyкова<sup>1</sup>, P.I. Makhnovskiy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>2</sup> Federal State Budget Institution «N.F. Gamaleya Federal Centre of Epidemiology and Microbiology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

### Abstract

**The aim** of this study was to design promising variants of recombinant proteins based on NS4A antigen of hepatitis C virus (HCV) for subsequent work on the creation of a mosaic recombinant vaccine against hepatitis C. **Methods.** The recombinant proteins, containing different fragments of NS4A (belong to HCV subtype 1b) and murine interleukin-2, were prepared by genetic engineering approaches, using vectors pQE30 and pQE60 for *E. coli*. The size of the recombinant protein particles were evaluated by atomic force microscopy. Immunogenicity of these recombinant proteins was tested for Balb/c mice. The murine sera were analyzed by enzyme immunoassay. The recombinant proteins were also tested by immunoblotting with human sera specific to HCV antigens. **Results.** Six variants of recombinant genetic engineering constructions based on NS4A antigen of hepatitis C virus were designed. In the first variant amino acid sequence of NS4A was inserted using vector pQE60 into the immunodominant loop of HBc protein (core protein of hepatitis B virus). However, further analysis of the product showed the absence of virus-like particles in it. The following three constructs (with glycine linker 19s), without it and N-truncated NS4A) were done using vector pQE30. Only N-truncated NS4a product had a high expression level. Then new protein, consisted of NS4A and N-truncated murine interleukin-2 (IL-2), was obtained to enhance immunogenicity. It is known that IL-2 has adjuvant property. The new product (NS4a-IL-2) is well expressed, but it is accumulated in inclusion bodies. It was extracted with 7M guanidine chloride, purified on a Ni-sorbent and dialyzed in PBS. A shortened version of NS4A (ΔNS4a-IL-2) was also obtained with a high expression level. Taking in account that increasing the repetition of antigenic regions in recombinant constructs can enhance their immunogenicity, we obtained a recombinant protein comprising three repeat of NS4A. But its efficiency of expression was low. The construction NS4a had very poor immunogenicity, but NS4a-IL-2 (which contains the full length NS4A) displayed the best one for Balb/c mice. As it was shown earlier the immunogenicity of the protein preparation is dependent on the presence of aggregates, so we investigated our recombinant proteins for the presence of protein aggregates by atomic force microscopy. The presence of the particles with size of 6 – 8 nm was revealed in solution of NS4a-IL-2.

**Conclusion.** Only ΔNS4a-IL-2 and NS4a-IL-2 of the six constructs had high expression and antigenic properties. And only NS4a-IL-2 possessed the high immunogenic property. So, this construction can be used for subsequent work on the creation of a mosaic recombinant vaccine against hepatitis C.

**Key words:** hepatitis C, viral polypeptide NS4A, recombinant proteins, vaccine

## Введение

Вирусный гепатит С – повсеместно распространенное инфекционное заболевание. Количество инфицированных в мире оценивается в 170 – 200 млн человек, что составляет почти 3% населения, и их численность ежегодно увеличивается [1 – 3]. По данным зарубежных специалистов, доля инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) в РФ достигает 3 – 4%, что свидетельствует о неблагоприятной эпидемиологической ситуации [2, 4]. Острый гепатит С часто имеет скрытое течение и высокий риск перехода в хроническую форму инфекции, которая через 15 – 25 лет может привести к циррозу печени или гепатоцеллюлярной карциноме. Таким образом, гепатит С представляет серьезную проблему для здравоохранения нашей страны. Недавно разработаны и стали внедряться новые высокоэффективные препараты прямого противовирусного действия, но доступность их для больных пока ограничена по ряду причин: не все препараты разрешены к применению в нашей стране и, главное, курс терапии имеет высокую стоимость [1, 5]. Поэтому разработка отечественных средств вакцинопрофилактики и терапевтических вакцин является актуальной задачей для ограничения распространения гепатита С и, следовательно, сокращения числа пациентов, нуждающихся в комплексной противовирусной терапии.

Практически сразу после идентификации ВГС, в конце прошлого века, начались работы над созданием профилактической вакцины [6, 7]. За последние несколько десятилетий было установлено, что оболочечные белки вируса, как основа для профилактической вакцины, малоперспективны из-за покрытия оболочки вируса человеческими липопротеинами, изменчивости антигенных детерминант и низкой выработки нейтрализующих антител [8 – 10]. Неструктурные белки ВГС, выполняющие важные функции в жизненном цикле вируса и вызывающие Т- и В-клеточный ответ в ходе инфекции, рассматриваются в качестве объекта для создания терапевтических вакцин от гепатита С [11]. Однако до настоящего времени нет сообщений о готовых вакцинных препаратах.

В настоящее время на основе большого объема данных о пептидах ВГС, презентруемых иммунокомпетентными клетками в комплексе с белками главного комплекса гистосовместимости (ГКГ I и ГКГ II), стало возможным конструировать рекомбинантные мозаичные антигены из пептидов неструктурных белков ВГС (NS3, NS4A, NS4B, NS5A) и изучить их способность вызывать иммунный ответ у лабораторных животных [12 – 15]. Поэтому одним из перспективных направлений в разработке вакцин от гепатита С может стать создание рекомбинантных мозаичных иммуногенных препаратов, обладающих одновременно и адьювантными свойствами (самоадьювантными).

Интересным объектом с этой точки зрения является неструктурный полипептид ВГС NS4A, основная функция которого активация (он кофак-

тор) сериновой протеазы NS3, участвующей в нарезании вирусного полипротеина на отдельные вирусные полипептиды. Кроме этого он участвует в блокировке противовирусных внутриклеточных сигналов [16]. Ранее показана ассоциация наличия антител к NS4A и NS4B в высоком титре с достижением устойчивого вирусологического ответа при комбинированной интерферонотерапии [17, 18]. Антиген NS4A небольшой, всего 54 аминокислотных остатка; область, взаимодействующая с NS3, представлена центральным участком.

При изучении антигенных свойств отдельных пептидов, соответствующих последовательности NS4A, было установлено, что С-концевой участок NS4A является генотипзависимым. В срединной части NS4A были обнаружены генотипнезависимые зоны, они более консервативны [19]. В другой публикации отмечено, что NS4A имеет довольно высокую изменчивость [20]. Вероятно, иммунная система оказывает давление на этот антиген, что приводит к селекции устойчивых вариантов из популяции ВГС у инфицированных лиц. Однако антиген NS4A недостаточно изучен как объект для разработки мозаичной вакцины против гепатита С.

**Цель данной статьи** – продемонстрировать результаты исследования по созданию перспективных вариантов рекомбинантных белков на основе NS4A вируса гепатита С, которые хорошо экспрессируются, могут быть достаточно легко очищены и обладают выраженными антигенными и иммуногенными свойствами и имеют, благодаря фрагменту интерлейкина-2, адьювантные свойства, что позволит использовать их в разработке вакцины.

## Материалы и методы

**Генно-инженерные конструкции.** Нуклеотидные последовательности рекомбинантных белков NS4A (субтип 1b), мышинный IL-2, оптимизированные для *E. coli*, были синтезированы фирмой Евроген (Россия). Синтетический ген NS4A имел сайты клонирования SacI и EcoR5 и первоначально был клонирован в вектор pQE60 с встроенной последовательностью кор-белка вируса гепатита В (HBc). Затем, после изучения экспрессии данных белков в структуре HBc их переносили в вектор pQE30 для получения как самостоятельных рекомбинантных белков или в комбинации с другими белками. Мышиный IL-2, имевший на концах сайты BamHI и KpnI, был клонирован в pQE30. Укороченный IL-2, слитый с NS4A, получали переносом фрагмента BamHI-EcoR5 из pQE60 HBc(NS4a) в pQE30 IL-2 после рестрикции BamHI-Ecl136II. Укороченную конструкцию pQE30 ΔNS4a-IL-2 получали из полноразмерной pQE30 NS4a-IL-2 рестрикцией BamHI-Eco47I1I, обработкой фрагментом Кленова и лигированием вектора самого на себя. Для получения повторов NS4A использовали конструкцию pQE60 HBc NS4a (Ecl136II-EcoR5). Исходно были получены 3-кратные повторы, которые потом переносили в pQE30 IL-2м. В работе были использова-

ны ферменты и буферные системы фирм Сибэнзим (Россия), Fermentas (Латвия).

**Очистка рекомбинантных белков (РБ) на Ni-сорбенте.** Клетки с индуцированными РБ собирали центрифугированием (4 тыс. об/мин, 30 мин); суспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH 7,3 с лизоцимом (2 мг/мл), инкубировали (15 мин при комнатной температуре) и замораживали при -20 °С. После оттаивания обрабатывали ультразвуком (30 сек) и центрифугировали (13 тыс об/мин, 5 мин). Супернатант и осадок анализировали на наличие РБ с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с доденцилсульфатом натрия (ДСН). К осадку добавляли 1 мл 7 М гуанидин хлорида (ГХ) в 10 мМ натрий фосфатно-трисовом буфере pH 8,0 с 20 мМ имидазолом и 0,5 М хлористым натрием, обрабатывали ультразвуком и оставляли на 20 мин при комнатной температуре. Центрифугировали 10 минут при 13 тыс. об/мин. Полученный супернатант добавляли к Ni-сорбенту (Promega, США), последующие этапы выполняли по методике производителя.

**Концентрацию белка определяли** по общепринятому методу Бредфорд. Белковый состав анализировали методом электрофореза в ПААГ с ДСН по стандартной методике Лэммли. Антигенные свойства рекомбинантных белков тестировали в иммуноблоттинге с сыворотками больных.

**Атомно-силовую микроскопию** проводили на приборе Ntegra (NT-MDT, Россия).

**Для иммунизации** использовали линейных мышей Balb/c массой 18 – 20 г (возраст 6 – 8 недель). Иммунизировали каждым препаратом в дозе 50 мкг на мышь, двукратно с интервалом в 4 недели, подкожно в области верхней части спины. Один и тот же препарат вводили 5 мышам. Животных забивали путем декапитации под наркозом смеси эфира с хлороформом (1:1) с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями пра-

вил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

**Сыворотки** иммунизированных мышей исследовали методом иммуноферментного анализа по методике, описанной ранее [18].

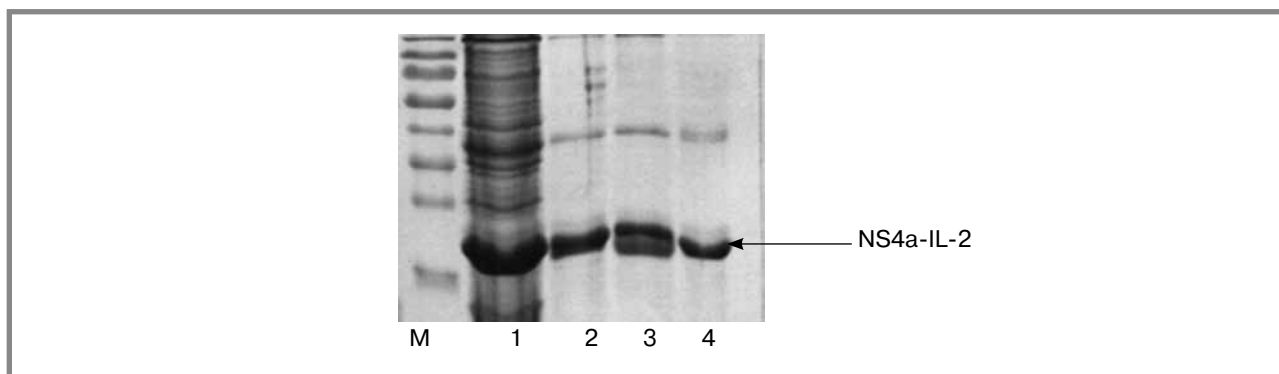
### Результаты и обсуждение

Для изучения антигенных и иммуногенных свойств вирусного антигена NS4A было получено несколько вариантов генно-инженерных конструкций. Так аминокислотная последовательность NS4A была встроена в область иммунодоминантной петли кор-белка вируса гепатита В (НВс). Этот подход широко используется для повышения иммуногенности. Однако дальнейший анализ полученного препарата показал отсутствие в нем вирусоподобных частиц (данные не представлены), наличие которых обеспечивает высокую иммуногенность. Поэтому в следующих конструкциях антиген NS4A был экспрессирован без использования белка НВс в качестве носителя.

Были получены и проанализированы ещё 3 конструкции на основе вектора рQE30, благодаря которому к N-концу рекомбинантных белков присоединяются 6 гистидиновых остатков, что позволяет проводить очистку белков на Ni-сорбенте. Первый продукт – рQE30 19s NS4a – имел очень незначительную экспрессию (20 – 30 мкг белка из 50 мл индуцированной культуры). Второй продукт – рQE30 NS4a (вариант без глицинового шарнира 19s), также плохо экспрессировался. Третий продукт – ΔNS4a (это укороченный с N-конца NS4A) – имел хорошую экспрессию до 200 – 300 мкг белка из 50 мл индуцированной культуры, несмотря на меньшую молекулярную массу. Все эти рекомбинантные белки накапливались в нерастворимой фракции, поэтому далее выполняли экстракцию и очистку (как описано в материалах и методах).

Известно, что IL-2 обладает адъювантными свойствами [21]. Чтобы повысить иммуногенность

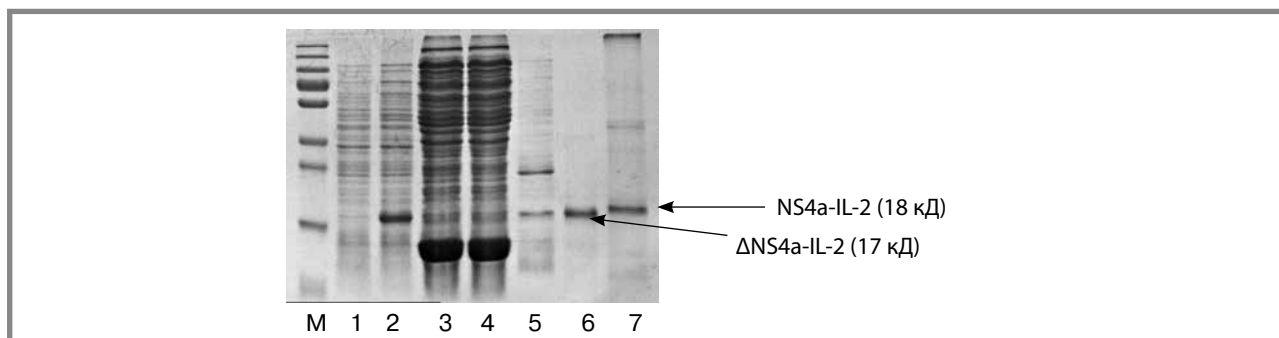
**Рисунок 1.**  
**Электрофоретический анализ NS4a-IL-2 до и после очистки**



Примечание: Образцы в треках: М – маркерные белки (10 – 100 кДа), 1 – лизат с 7 М ГХ, 2 – I фракция элюата, 3 – II фракция элюата, 4 – элюат после диализа.

**Рисунок 2.**

**Электрофоретический анализ белков клеток и рекомбинанта  $\Delta$ NS4a-IL-2**



Примечание: Образцы в треках: 1 – неиндуцированные клетки, 2 – индуцированные клетки, 3 – лизат клеток с лизоцимом, 4 – лизат клеток с лизоцимом после сорбции на Ni-сорбенте, 5 –  $\Delta$ NS4a-IL-2, очищенный из лизата с лизоцимом, 6 – NS4a-IL-2, очищенный из лизата с 7 М ГХ, 7 – NS4a-IL-2 (дан для сравнения), очищенный из лизата с 7 М ГХ, М – маркерные белки (10-100 кДа).

белка NS4A и улучшить растворимость, был получен химерный белок, состоящий из NS4A и укороченного с N-конца мышинового IL-2. Ранее было установлено, что небольшая делеция с N-конца не влияет на адъювантные свойства этого интерлейкина. Новый генно-инженерный продукт хорошо экспрессировался, но накапливался в тельцах включения. Его экстрагировали 7 М гуанидин хлоридом, чистили на Ni-сорбенте и диализовали в ФСБ. При этом он оставался в растворимой форме и мог длительно храниться при + 4 °С.

Был также получен и проанализирован укороченный вариант NS4A ( $\Delta$ NS4a-IL-2), который имел хорошую экспрессию (рис. 2, треки 5 и 6).

Как показано ранее, увеличение повторов антигенных зон в генно-инженерных конструкциях, может повысить их иммуногенность [22]. Поэтому нами была получена конструкция, которая экспрессировала белок, содержащий 3 повтора NS4A (pQE30 NS4a x 3 IL-2). Эффективность экспрессии оказалась низкой (рис. 3, трек 4ос).

С помощью иммуноблоттинга удалось оценить распределение индуцированных рекомбинантных белков, содержащих фрагменты NS4A, между растворимой фракцией (супернатант), после лизиса с лизоцимом, и нерастворимой фракцией (осадок).

Так в растворимой фракции содержалось около 5 – 10% рекомбинантных белков  $\Delta$ NS4a-IL-2 и NS4a-IL-2, но основная их масса присутствовала в осадке. Другие рекомбинантные белки (NS4a и NS4a x3-IL-2) полностью находились в нерастворимой форме (в осадке) и уровень их экспрессии был низкий.

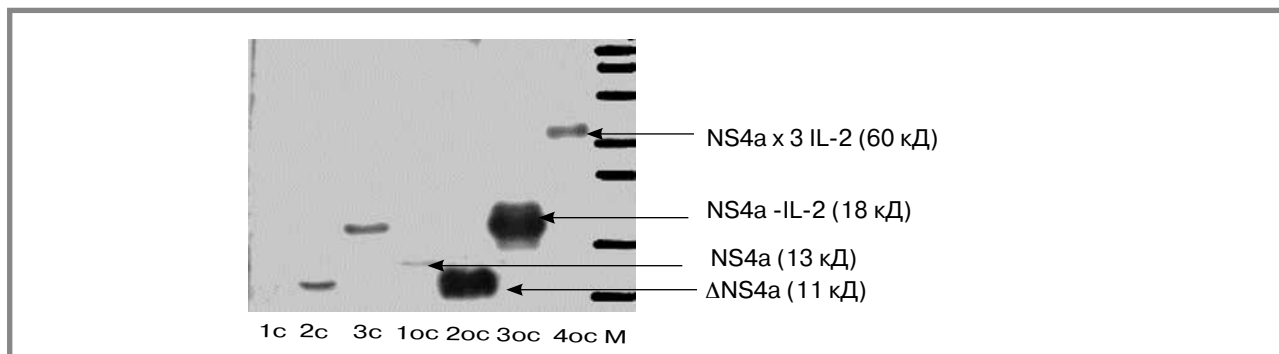
Таким образом, по эффективности экспрессии и антигенным свойствам (оцененным в иммуноблоттинге) оптимальными являются конструкции NS4a-IL-2 и  $\Delta$ NS4a-IL-2. Иммуногенные свойства этих препаратов были оценены путем иммунизации мышей.

Как следует из таблицы 1, препарат с делецией  $\Delta$ NS4a обладал самой слабой иммуногенностью, NS4a (без делеции) несколько лучшей. Анализ конструкций с интерлейкином-2 показал, что  $\Delta$ NS4a-IL-2 обладает более низкой иммуногенностью, чем NS4a-IL-2 (который содержал полноразмерный NS4A). Поэтому в дальнейшем планируется использовать полноразмерный NS4A для создания рекомбинантной мозаичной вакцины против гепатита С.

Известно, что иммуногенность белкового препарата зависит от наличия в нем агрегатов, которые образуют молекулы белка [23]. Поэтому было проведено исследование на наличие агрегатов

**Рисунок 3.**

**Иммуноблоттинг препаратов с сывороткой больного хроническим гепатитом С**



Сокращения: с – супернатант, ос – осадок. Обозначения треков: 1с – NS4a, 2с –  $\Delta$ NS4a, 3с – NS4a-IL-2, 1ос – NS4a, 2ос –  $\Delta$ NS4a, 3ос – NS4a-IL-2, 4ос – NS4a x 3-IL-2, М – маркерные белки (10-100 кДа). Молекулярные массы рекомбинантных белков рассчитаны по массам маркерных белков.



**Таблица 1.**

**Анализ сывороток мышей после их иммунизации очищенными препаратами рекомбинантных белков**

Антиген, сорбированный в стрипах	Сыворотка к NS4a, титр антител	Сыворотка к ΔNS4a, титр антител	Сыворотка к NS4a-IL-2, титр антител	Сыворотка к ΔNS4a-IL-2, титр антител
NS4a	1:200	<1:100*	1:800	1:100
ΔNS4a	1:100	<1:100	1:400	1:100
NS4a-IL-2	1:200	<1:100	1:1600	1:200
ΔNS4a-IL-2	1:100	<1:100	1:800	1:200

Примечание: \*Титр антител менее 1:100 расценивается как низкий, наиболее значимы титры антител более 1:100

в белковых препаратах с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Анализ препаратов NS4a-IL-2 и ΔNS4a-IL-2 с помощью АСМ выявил наличие небольших частиц размером 6 – 8 нм для NS4a-IL-2, а для ΔNS4a-IL-2 ещё меньше – 2 – 3 нм (рис. 5 и 6).

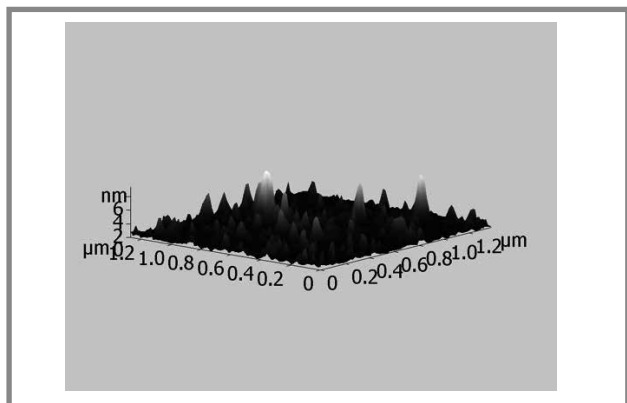
Как установлено при изучении иммунного ответа на белки ВГС и причин очень частого перехода острой фазы инфекции в хроническую, главная роль в элиминации вируса принадлежит раннему, интенсивному и направленному на многие антигены вируса иммунному ответу [24 – 27]. Предполагается, что важную роль в процессе выздоровления играет цитотоксический вирусспецифический ответ CD8+Т-лимфоцитов [25]. Другие авторы отмечают, что при хроническом течении гепатита С пролиферация CD4+CD25+Т-лимфоцитов, стимулируемая вирусными белками, может подавлять ответ на вирусные антигены цитотоксических CD8+Т-лимфоцитов, и тем самым способствует персистенции вируса у пациентов с хроническим гепатитом С [26]. Очевидно, в элиминации вируса большую роль играет соотношение между активацией CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов [27]. Большинство исследователей подчеркивают, что активность CD4+Т-хелперов играет ключевую роль в процессе выздоровления при гепатите С [24, 28]. При этом отмечается, что иммунный ответ по типу Th1, связанному с индукцией IFN- и IL-2, обеспечивает лучшую защиту, чем по типу Th2, связанному с IL-4 и IL-10.

Одной из причин развития хронического гепатита С считается преобладание Th2 над Th1 [24 – 26].

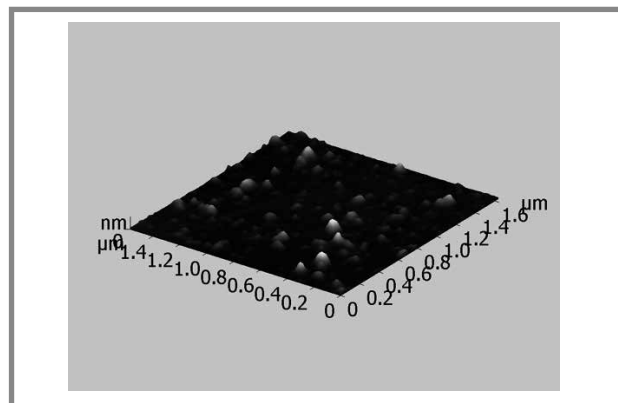
Использование IL-2 в качестве адьюванта может иметь положительное влияние на формирование иммунного ответа Th1-клетками. Как показано в данном исследовании, IL-2 слитый с NS4A обладает заметно большей иммуногенностью, чем NS4A сам по себе. Специфичность взаимодействия антител больного хроническим гепатитом С с рекомбинантным белком NS4a-IL-2, по данным иммуноблотинга, была хорошо выражена (рис. 3). В то же время, полноразмерный NS4A является лучшим иммуногеном, чем имеющий делецию на N-конце вариант. Это согласуется с результатами анализа аминокислотной последовательности NS4A на информационных сайтах, предсказывающих иммуногенную активность составляющих её пептидов [13 – 15].

Исследование препаратов NS4a-IL-2 и Δ NS4a-IL-2 с помощью атомно-силовой микроскопии показало наличие небольших частиц размером 6 – 8 нм для NS4a-IL-2, а для ΔNS4a-IL-2 частиц размером – 2 – 3 нм. Как установлено ранее, наиболее эффективными иммуногенами является белковые частицы размером 50 – 100 нм [23]. Вероятно, повышение иммуногенности NS4A в химерном белке NS4a-IL-2 связано, не только с образованием агрегатов, но и с природой самого IL-2, который является одним из основных сигнальных белков иммунной системы [28, 29]. IL-2 необходим для проли-

**Рисунок 5.**  
**Объемное (3D) изображение NS4a-IL-2 по данным АСМ**



**Рисунок 6.**  
**3D-изображение ΔNS4a-IL-2 по данным АСМ**



ферации и регуляции жизнеспособности Т-клеток, синтеза цитокинов эффекторными Т-клетками и индукции регуляторных Т-клеток.

Ряд авторов отмечают перспективность использования химерных белков с IL-2 в качестве кандидатов для разработки вакцин [21]. Они полагают, что химерный белок, связываясь с интерлейкиновым рецептором (CD25), легче проникает в дендритные клетки, и те более эффективно активируют Т-клеточный иммунный ответ.

## Выводы

1. Методами генной инженерии были сконструированы 6 вариантов рекомбинантных белковых конструкции на основе антигена NS4A вируса гепатита С.

2. Удачными по экспрессии и антигенным свойствам оказались две конструкции NS4a-IL-2 и ΔNS4a-IL-2, которые представляют два варианта фрагментов NS4A, соединенных с фрагментом мышинового интерлейкина-2.

3. Наиболее перспективным из сконструированных рекомбинантных белков для разработки вакцинных препаратов против гепатита С является химерный белок NS4a-IL-2, который содержит полноразмерный NS4A и обладает наибольшей иммуногенностью, благодаря присутствию фрагмента IL-2, выполняющего роль адъюванта. ■

*Авторы выражают благодарность О.А. Тихоновой за помощь в выполнении иммуноферментного анализа. Исследование поддержано грантом РФФИ 16-04-00450 А.*

## Литература

- Wendt A., Adhoute X., Castellani P., Ansaldi C., Benali S. et al. Chronic hepatitis C: future treatment. Clin. Pharmacol. 2014; 6: 1 – 17.
- Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J. Hepatology. 2014; 61: S45 – S57.
- World Health Organization. Fact sheet. July 2016.
- Mohd Hanafian K., Groeger J., Flexman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology. 2013; 57: 1333 – 1342.
- Terrault N., Monto A., Stinchon M.R., Rusie E., Moreo K. New therapies, evidence, and guidance in hepatitis C management: expert practices and insights from an educational symposium at the AMCP 27th Annual Meeting Expo. J. Manag. Care Spec. Pharm. J. Manag. Care Spec. Pharm. 2015; 21: S1 – 14.
- Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A.L., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. Isolation of a cDNA clone from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science. 1989; 244: 359 – 362.
- Choo Q.-L., Kuo G., Ralson R., Weiner A., Chien D., Van Nest G. et al. Vaccination of chimpanzees against infection by hepatitis C virus. PNAS USA. 1994; 88: 2451 – 2455.
- Catanese M.T., Uryu K., Kopp M., Edwards T.J., Andrus L., Rice W.J. et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. PNAS USA. 2013; 110: 9505 – 9510.
- Ray R., Meyer K., Banerjee A., Basu A., Coates St., Abrignani S. et al. Characterization of antibodies induced by vaccination with hepatitis C virus envelope glycoproteins. J. Infect. Dis. 2010; 202: 862 – 6.
- Meyer K., Banerjee A., Frey Sh.E., Belshe R.B., Ray R. A weak neutralizing antibody response to hepatitis C virus envelope glycoprotein enhances virus infection. PLoS One. 2011, 6: e23699.
- Folgoni A., Capone S., Ruggeri L., Meola A., Sporeno E., Ercole B.B. et al. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. Nat. Med. 2006; 12: 190 – 197.
- Klade C.S., Wedemeyer H., Berg T., Hinrichsen H., Cholewinska G., Zeuzem S. et al. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. Gastroenterol. 2008; 134: 1385 – 1395.
- Биоинформационный сайт: www.bioinformation.net
- Kangueane P., Sakharkar M.K. T-epitope designer: a HLA-peptide binding prediction server. Bioinformatics. 2005; 1: 21 – 24.
- Singh H., Raghava G.P.S. ProPre 1: prediction of promiscuous MHC class-1 binding sites. Bioinformatics. 2003; 19: 1009 – 14.
- Li X.D., Sun L., Seth R.B., Pineda G., Chen Z.J. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. PNAS USA. 2005; 102: 17717 – 17722.
- Desombere L., Van Vlierberghe H., Wieland O., Hultgren C., Sallberg M., Quiroga J. et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. J. Med. Virol. 2007; 79: 701 – 713.
- Nikolaeva L.I., Makashova V.V., Petrova E.V., Shipulin G.A., Samokhvalov E.I., Tokmalaev A.K. et al. The decline in antibodies to hepatitis C virus during antiviral therapy. Biochemistry (Moscow) Series B: Biomedical chemistry. 2009; 3: 202 – 209.
- Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fieds H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. Virology. 1999; 257: 177 – 190.
- Bern dez-Aguirre A.D., Padilla-Noriega I., Zenteno E., Reyes-Leyva J. Identification of amino acid variants in the hepatitis C virus non-structural protein 4A. Tohoku J. Exp. Med. 2009; 218: 165 – 175.
- Faulkner L., Buchan G., Lockhart E., Slobbe L., Wilson M., Baird M. IL-2 linked to a peptide from influenza hemagglutinin enhances T cell activation by affecting the antigen-presentation function of bone marrow-derived dendritic cells. Int. Immunol. 2001; 13: 713 – 721.
- Wolf A.I., Mozdzanowska K., Williams K.L., Singer D., Richter M., Hoffmann et al. Vaccination with M2e-based multiple antigenic peptides: characterization of the B cell response and protection efficacy in inbred and outbred mice. PLoS One. 2011; 6: e28445.
- Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. Nature Rev. Immunol. 2010; 10: 787 – 796.
- Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Wieland S., Pemberton J., Steiger C. et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. PNAS USA, 2002; 99: 15661 – 15668.
- Thimme R., Lohmann V., Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. Antiviral Research. 2006; 69: 129 – 1241.
- Lancaster T., Sanders E., Christie M.L., Brooks C., Green S., Rosenberg M.C. Quantitative and functional differences in CD8+T-lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. J. Viral. Hepatitis. 2002; 9: 18 – 28.
- Boettler T., Spangenberg H.C., Neumann-Haefelin C., Panther E., Urbani S., Ferrari C. et al. T cells with a CD4+CD25+regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+T cells during chronic hepatitis C virus infection. 2005; 79: 7860 – 7867.
- Semmo N., Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. World J. Gastroenterol. 2007; 13: 4831 – 4838.
- Lan R.Y., Selmi C., Gershwin M.E. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). J. Autoimmun. 2008; 31: 7 – 12.

## References

- Wendt A., Adhoute X., Castellani P., Ansaldi C., Benali S. et al. Chronic hepatitis C: future treatment. Clin. Pharmacol. 2014; 6: 1 – 17.
- Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J. Hepatology. 2014; 61: S45 – S57.
- World Health Organization. Fact sheet. July 2016.
- Mohd Hanafian K., Groeger J., Flexman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology. 2013; 57: 1333 – 1342.

5. Terrault N., Monto A., Stinchon M.R., Rusie E., Moreo K. New therapies, evidence, and guidance in hepatitis C management: expert practices and insights from an educational symposium at the AMCP 27th Annual Meeting Expo. *J. Manag. Care Spec. Pharm.* 2015; 21: S1 – 14.
6. Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A.L., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. Isolation of a cDNA clone from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 244: 359 – 362.
7. Choo Q.-L., Kuo G., Ralson R., Weiner A., Chien D., Van Nest G. et al. Vaccination of chimpanzees against infection by hepatitis C virus. *PNAS USA.* 1994; 88: 2451 – 5.
8. Catanese M.T., Uryu K., Kopp M., Edwards T.J., Andrus L., Rice W.J. et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particle. *PNAS USA.* 2013; 110: 9505 – 9510.
9. Ray R., Meyer K., Banerjee A., Basu A., Coates St., Abrignani S. et al. Characterization of antibodies induced by vaccination with hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Infect. Dis.* 2010; 202: 862 – 866.
10. Meyer K., Banerjee A., Frey Sh.E., Belshe R.B., Ray R. A weak neutralizing antibody response to hepatitis C virus envelope glycoprotein enhances virus infection. *PLoS One.* 2011; 6: e23699.
11. Folgoni A., Capone S., Ruggeri L., Meola A., Sporeno E., Ercole B.B. et al. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat. Med.* 2006; 12: 190 – 197.
12. Klade C.S., Wedemeyer H., Berg T., Hinrichsen H., Cholewinska G., Zeuzem S. et al. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterol.* 2008; 134: 1385 – 1395.
13. Available at: [www.bioinformatics.net](http://www.bioinformatics.net).
14. Kangueane P., Sakharkar M.K. T-epitope designer: a HLA-peptide binding prediction server. *Bioinformatics.* 2005; 1: 21 – 24.
15. Singh H., Raghava G.P.S. ProPre 1: prediction of promiscuous MHC class-1 binding sites. *Bioinformatics.* 2003; 19: 1009 – 1014.
16. Li X.D., Sun L., Seth R.B., Pineda G., Chen Z.J. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *PNAS USA.* 2005; 102: 17717 – 17722.
17. Desombere L., Van Vlierberghe H., Wieland O., Hultgren C., Sallberg M., Quiroga J. et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 2007; 79: 701 – 713.
18. Nikolaeva L.I., Makashova V.V., Petrova E.V., Shipulin G.A., Samokhvalov E.I., Tokmalaev A.K. et al. The decline in antibodies to hepatitis C virus during antiviral therapy. *Biochemistry (Moscow) Series B: Biomedical chemistry.* 2009; 3: 202 – 209.
19. Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fieds H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. *Virology* 1999, 257, 177 – 190.
20. Berm dez-Aguirre A.D., Padilla-Noriega I., Zenteno E., Reyes-Leyva J. Identification of amino acid variants in the hepatitis C virus non-structural protein 4A. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009; 218: 165 – 175.
21. Faulkner L., Buchan G., Lockhart E., Slobbe L., Wilson M., Baird M. IL-2 linked to a peptide from influenza hemagglutinin enhances T cell activation by affecting the antigen-presentation function of bone marrow-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* 2001; 13: 713 – 721.
22. Wolf A.I., Mozdzanowska K., Williams K.L., Singer D., Richter M., Hoffmann et al. Vaccination with M2e-based multiple antigenic peptides: characterization of the B cell response and protection efficacy in inbred and outbred mice. *PLoS One.* 2011; 6: e28445.
23. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Rev. Immunol.* 2010; 10: 787 – 796.
24. Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Wieland S., Pemberton J., Steiger C. et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *PNAS USA.* 2002; 99: 15661 – 15668.
25. Thimme R., Lohmann V., Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Research.* 2006; 69: 129 – 141.
26. Lancaster T., Sanders E., Christie M.L., Brooks C., Green S., Rosenberg M.C. Quantitative and functional differences in CD8+T-lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *J. Viral. Hepatitis.* 2002; 9: 18 – 28.
27. Boettler T., Spangenberg H.C., Neumann-Haefelin C., Panther E., Urbani S., Ferrari C. et al. T cells with a CD4+CD25+Regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+T cells during chronic hepatitis C virus infection. 2005; 79: 7860 – 7867.
28. Semmo N., Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13: 4831 – 4838.
29. Lan R.Y., Selmi C., Gershwin M.E. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *J. Autoimmun.* 2008; 31: 7 – 12.

## КОРОТКОЙ СТРОКОЙ

## Национальная иммунобиологическая компания разработала новую комбинированную вакцину «Вактивир» для профилактики кори, краснухи и паротита

Национальная иммунобиологическая компания («Нацимбио») совместно с дочерней компанией НПО «Микроген» разработали комбинированную вакцину «Вактивир» для профилактики кори, краснухи и паротита. Трехвалентная вакцина успешно завершила доклинические испытания и исследования I фазы.

«Вактивир – живая вакцина полностью отечественного производства. После окончания клинических исследований и государственной регистрации планируется, что «Вактивир» будет применяться у детей соответствующего возраста в рамках Национального календаря профилактических прививок» – рассказала генеральный директор «Нацимбио» Марьям Хубиева.

«К настоящему времени клиническое исследование, которое завершится в третьем кварта-

ле 2017 года, уже успешно прошли с участием 50 детей в возрасте шести лет. Ожидается, что вакцина получит государственную регистрацию в конце 2018 года» – сказал генеральный директор НПО «Микроген» Кирилл Гайдаш.

Сегодня в России зарегистрированы несколько вакцин для профилактики кори, краснухи и паротита: отечественные моновакцины (корь, краснуха, паротит), комбинированная двухвалентная (паротит-корь) и зарубежные комбинированные трехвалентные (корь-краснуха-паротит). Все эти иммунобиологические препараты безопасны, малореактогенны и высокоиммуногенны, обеспечивают защитный уровень антител у 95 – 98 % вакцинируемых.

Источник: <http://nacimbio.ru>