



ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА АНТИГЕНА NS4A ВИРУСА ГЕПАТИТА С¹

© 2022 г. А. Н. Белявцев*, **, #, Н. С. Шастина*, В. В. Куприянов**, Л. И. Николаева**,
М. В. Мельникова***, Е. Ф. Колесанова***, М. Ю. Шимчишина*, **, И. В. Капустин****

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

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

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

****ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212 Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Поступила в редакцию 04.08.2021 г.

После доработки 19.08.2021 г.

Принята к публикации 12.10.2021 г.

Целью данного исследования было изучение влияния липидных компонентов на иммуногенность синтетического 24-членного пептида, содержащего В- и Th-эпитопы. Амидированный по С-концу синтетический пептид имел первичную структуру VIVGRILSGRPAVIPDREVLRYK, которая соответствует фрагменту антигена NS4A вируса гепатита С. Для усиления иммуногенности было выполнено ацилирование пептида по N-концевой α -аминогруппе путем присоединения липида 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат. Также получена липосомальная форма пептида с размером частиц 160 ± 20 нм и степенью включения пептида 80%. Препарат пептида в липосомах обладал стабильностью в течение трех месяцев. Изучена иммуногенность пептида, липопептида и пептида в липосомах по выработке антител В-клетками и цитокинов (IFN- γ и IL-2) специфическими CD4⁺-Т-лимфоцитами у иммунизированных лабораторных мышей. Наибольшей иммуногенностью обладал 24-членный пептид, включенный в фосфатидилхолиновые липосомы, что свидетельствует о перспективности использования данного пептида в дальнейших исследованиях по созданию кандидатной вакцины от гепатита С.

Ключевые слова: синтетический пептид, антиген NS4A вируса гепатита С, пептид в липосомах, липопептид, иммуногенность

DOI: 10.31857/S0132342322030046

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (ВГС) – этиологический агент гепатита С, который инфицирует гепатоциты и при развитии длительной хронической ин-

фекции может приводить к циррозу или гепатоцеллюлярной карциноме. В последние годы появились средства эффективной терапии гепатита С. Однако пока элиминация данной инфекции – недостижимая задача, т.к. до сих пор не создана профилактическая вакцина. В последние годы ведутся исследования, нацеленные на получение различных вариантов вакцин от гепатита С (рекомбинантных, векторных, субъединичных, пептидных и др.) [1]. Вакцинные препараты на основе синтетических пептидов привлекают разработчиков тем, что имеют минимальное количество побочных эффектов [2, 3].

Для обеспечения эффективности синтетических пептидных вакцин большое значение имеет правильный выбор целевых антигенных детерми-

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030046 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ВГС – вирус гепатита С; НАФ – неполный адъювант Фрейнда; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMSO – диметилсульфоксид; DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко; IL-2 – интерлейкин-2; IFN- γ – интерферон-гамма; NS4A – неструктурный полипептид 4А; Pam2Suc – N-[2,3-бис(пальмитоилокси)пропил]сукцинат; Pam2AP-Suc – 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат; PBS – фосфатно-солевой буфер; Th – Т-хелперный; TLR – Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor).

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 246-05-55, доб. 934; эл. почта: belyavcev@mirea.ru).

нант и адьюванта [2]. Одно из перспективных современных направлений – использование в качестве адьювантов синтетических вакцин липофильных соединений. Показано, что некоторые из них способны взаимодействовать с Toll-подобными рецепторами (TLRs) и усиливать иммунный ответ на синтетические антигенные детерминанты [4].

Исторической основой идеи конъюгирования пептидного антигена с липофильным адьювантом было исследование Т.Р. Норр в начале 1980-х гг. [5]. При разработке синтетической пептидной вакцины против гепатита В он обнаружил, что гуморальный иммунный ответ значительно усиливался после конъюгации пептида, воспроизводящего эпитопы HBs-антигена вируса гепатита В, с N α ,N ϵ -дипальмитоиллизиним. В дальнейшем были обнаружены другие свойства природных липопептидов: митогенная активность трипальмитоилированного пентапептида из бактериальной мембраны *Escherichia coli* [6] и иммунная активность выделенного из мембраны *Mycoplasma fermentans* макрофаг-активирующего липопептида, содержащего липидный компонент S-[2,3-бис(пальмитилокси)пропил]цистеин (Pam2Cys) [7]. Проявление иммуностимулирующей активности этими липофильными соединениями в составе диацильных и триацильных липопептидных лигандов сигнальных рецепторов связывают с наличием в их структуре патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, которые распознаются этими рецепторами. Благодаря наличию подобных липидных фрагментов липопептиды, содержащие антигенные детерминанты, могут проявлять самоадьювантные свойства [8]. Еще одним способом повышения иммуногенности пептидов может служить их включение в липосомы [9, 10].

Ранее нами был синтезирован 24-членный пептид – фрагмент антигена NS4A вируса гепатита С, содержащий консервативный В-клеточный и Т-хелперный эпитопы антигена NS4A ВГС [11, 12], показана иммунореактивность этого пептида с антителами из сывороток больных гепатитом С [13]. Таким образом, данный пептид мог бы служить компонентом вакцины против гепатита С. Однако известно, что пептиды примерно такой длины, даже содержащие и В-, и Т-эпитопы, проявляют достаточно высокую иммуногенность только в присутствии адьювантов [1]. Поэтому целью данного исследования было изучение возможности повышения иммуногенности ранее синтезированного 24-членного пептида путем конъюгации с потенциальным липофильным адьювантом 1,3-(дипальмитилоламино)пропан-2-О-сукцинатом, а также после включения в наноразмерные фосфатидилхолиновые липосомы.

Считается, что защиту от ВГС-инфекции в значительной степени обеспечивает эффективная

продукция интерферона- γ (IFN- γ) и интерлейкина-2 (IL-2) CD4⁺-Т-лимфоцитами (Th1-путь) [14]. Поэтому мы исследовали как продукцию антител, так и секрецию указанных цитокинов Т-лимфоцитами после иммунизации лабораторных мышей различными препаратами на основе 24-членного синтетического пептида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение конъюгата 24-членного пептида с липофильным адьювантом и липосомальной формы пептида. В качестве липофильного компонента, конъюгируемого с синтетическим пептидом, нами был выбран устойчивый к ферментативному расщеплению амидный аналог диацилглицеролипида – N-[2,3-бис(пальмитилокси)пропил]сукцината (Pam2Suc) [15, 16]. Ранее было показано, что Pam2Suc обладает иммуностимулирующей активностью в составе липопептидов, реализующейся путем активации дендритных клеток через Toll-подобные рецепторы 2-го типа (TLR-2) [16]. Поэтому были основания полагать, что более стабильный амидный аналог глицеролипида будет обладать по крайней мере не меньшей иммуностимулирующей активностью.

Для разработки потенциального самоадьювантного препарата, представляющего собой конъюгат амидированного по С-концу пептида VIVGRIILSGRPAVIPDREVLYRK (содержащего фрагмент последовательности антигена NS4A ВГС субтипа 1b [17]) с липофильным остатком, сначала был получен 1,3-(дипальмитилоламино)пропан-2-О-сукцинат (Pam2AP-Suc), имеющий структурное сходство с уже исследованным липофильным адьювантом Pam2Suc [16]. В структуре пропильного фрагмента Pam2Suc имеется одна аминокислотная группа (в 1-м положении), через которую он связан с сукцинилным остатком, а у пропильного фрагмента Pam2AP-Suc имеются две аминокислотные группы (в 1- и 3-м положениях), через которые он связан с остатками пальмитиновой кислоты. Pam2AP-Suc имеет структурное сходство с липофильными фрагментами лигандов TLR, иммуностимулирующее действие которых при взаимодействии с этими рецепторами уже установлено. Получение Pam2AP-Suc осуществляли ацилированием 1,3-(дипальмитилоламино)пропан-2-ола избытком янтарного ангидрида (4 экв.) в присутствии DMAP (2 экв.) в пиридине. Структура полученного соединения подтверждена методом ¹H-ЯМР-спектроскопии и элементным анализом.

Введение Pam2AP-Suc в структуру липопептида (рис. 1) проводили на смоле Ринка по окончании сборки последовательности 24-членного пептида (2.5 экв. липида на 1 экв. пептида) в смеси растворителей дихлорметан/ДМФА (1 : 1, v/v) при активации карбоксильной группы сочетанием

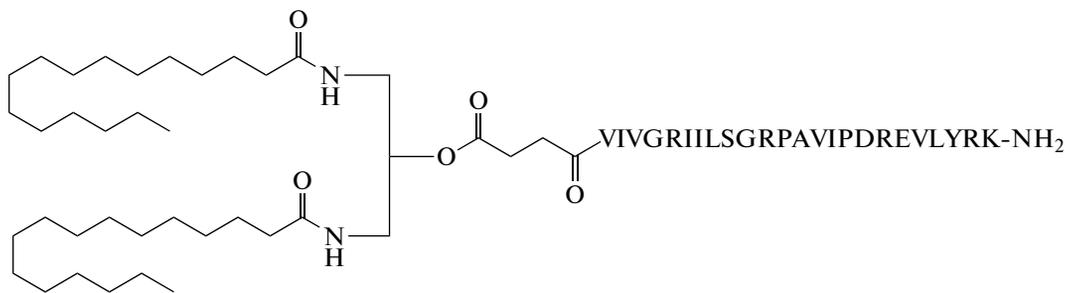


Рис. 1. Структура дипальмитоилированного липопептида Pam2AP-Suc-VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂.

Охута Pure, НВТУ и 2,4,6-коллидина с последующим деблокированием функциональных групп липопептида и отщеплением его от твердой фазы действием трифторуксусной кислоты со скэвенджерами.

Липопептид был нерастворим в воде и образовывал устойчивые агрегаты, что существенно затруднило его очистку. Выделение липопептида осуществляли методом оФВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 205 нм, используя в качестве подвижной фазы элюент ацетонитрил/вода (с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты) при линейном градиенте ацетонитрила 5–100% за 20 мин (дополнительные материалы, рис. S1–S3). Молекулярная масса липопептида подтверждена масс-спектрометрическим анализом. Очищенный липопептид (степень чистоты по данным аналитической оФВЭЖХ >90%) был липофильно высушен.

Липосомальная форма амидированного по С-концу 24-членного пептида была получена методом пассивной загрузки [18], с экструзией – пропуском дисперсии мультиламеллярных везикул фосфатидилхолина и пептида в стерильном PBS через поликарбонатный фильтр с размером пор 100 нм. Размер частиц определяли методом светодинамического рассеяния (дополнительные материалы, рис. S4), он составил 160 ± 20 нм при концентрации пептида 1 мг/мл и степени включения ~80%. Степень включения пептида в липосомы определяли методом гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-25 с элюцией ФСБ по количеству элюировавшегося свободного пептида. Измерение размеров частиц липосом с включенным пептидом показало их стабильность в течение трех месяцев. В течение этого периода не обнаружено формирования осадка, образующегося при разрушении липосом.

Иммуногенность препаратов на основе 24-членного пептида. Сравнительный анализ иммуногенности полученных препаратов на основе 24-членного пептида проводили на модели лабораторных мышей (сток CD-1). Животных опытных групп ($n = 24$, по 6 на каждое вещество) иммунизировали индивидуальным препаратом в дозе 100 мкг на

мышь: 1) синтетическим пептидом, 2) дипальмитоильным липопептидом, 3) пептидом с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ), 4) липосомальной формой пептида (пептид в липосомах). Применяли трехкратную схему иммунизации с интервалом в две недели. Животным контрольной группы ($n = 6$) вводили по той же схеме физиологический раствор. Через 10 дней после последней иммунизации проводили эвтаназию мышей, забор селезенки и крови, определяли гуморальный иммунный ответ и продукцию цитокинов: IFN- γ и IL-2.

Все вводимые препараты вызвали формирование В-клеточного ответа у лабораторных мышей (рис. 2). В течение всего периода наблюдения после иммунизации снижения веса животных и изменения общего состояния не отмечено, что говорит об отсутствии явного токсического эффекта у исследуемых препаратов. В-клеточный ответ был минимальным на свободный 24-членный пептид, в 5.5 раз выше на липопептид, в 12.7 раз выше на пептид с НАФ и в 20 раз выше на пептид в липосомах. Таким образом, максимальный В-клеточный ответ был зафиксирован у мышей, иммунизированных пептидом в липосомах, однако внутри групп имелись индивидуальные колебания в интенсивности иммунного ответа.

Результаты анализа продукции IFN- γ и IL-2 представлены на рис. 3. Максимальный уровень выработки IFN- γ среди исследуемых препаратов был зафиксирован у мышей, иммунизированных 24-членным пептидом в липосомах. Только при использовании этого препарата из группы исследуемых веществ показано достоверное превышение (в 4.6 раза) в выработке IFN- γ относительно контрольной группы животных ($p < 0.01$). Максимальный уровень выработки IL-2 среди исследуемых препаратов был зафиксирован у мышей, иммунизированных пептидом с НАФ (превышение в 2.9 раза относительно контрольной группы), однако отличия от контрольной группы в выработке IL-2 не были статистически достоверными ($p > 0.05$).

Уровень продукции цитокинов Т-лимфоцитами мышей, иммунизированных липопептидом,

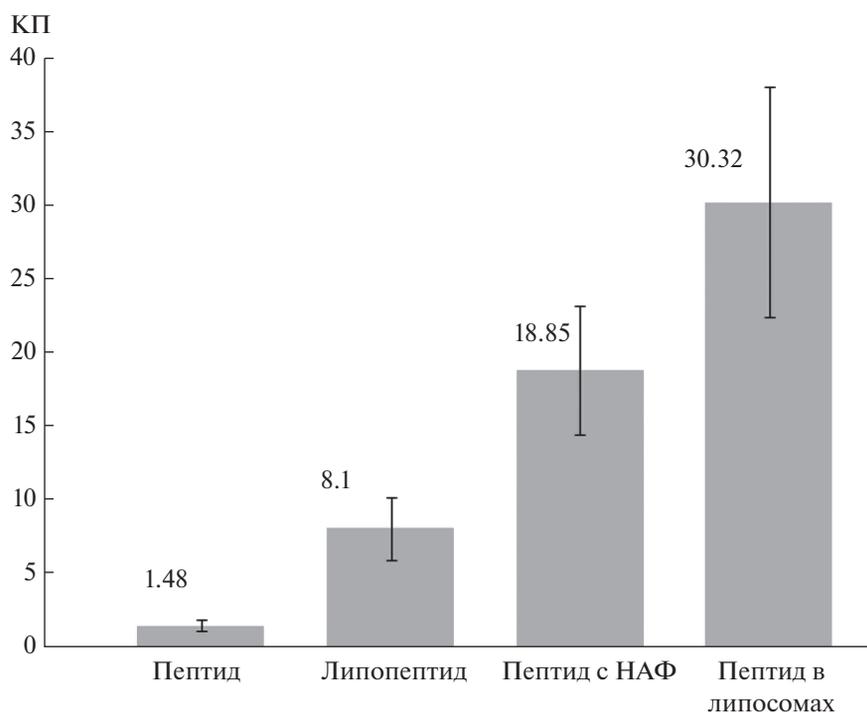


Рис. 2. Результат ИФА сывороток мышей, иммунизированных препаратами: пептид, липопептид, пептид с неполным адъювантом Фрейнда, пептид в липосомах. По оси ординат отмечена шкала единиц КП (коэффициент позитивности). КП – это отношение ОД образца сыворотки крови к пороговому значению ОД.

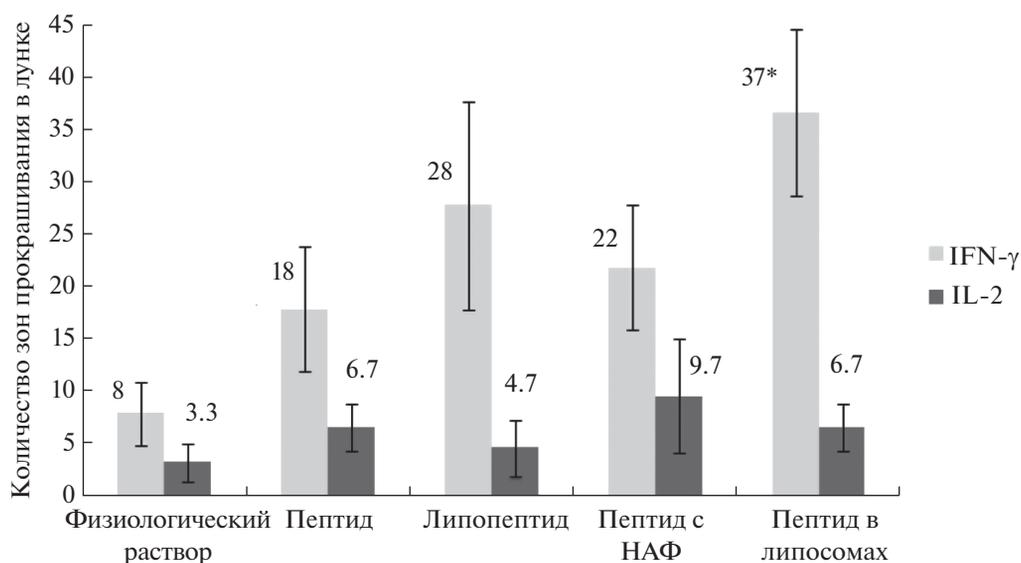


Рис. 3. Результаты анализа продукции IL-2 и IFN- γ Т-клетками иммунизированных мышей и контрольных животных (физиологический раствор). На оси абсцисс отмечены вещества, вводимые животным. * Достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0.02$).

показывает, что конъюгация 24-членного пептида с 1,3-(дипальмитилоамино)пропан-2-О-сукцинатом в незначительной степени усиливает иммунный ответ относительно исходного пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ^1H -ЯМР регистрировались на импульсном ЯМР-спектрометре DPX-300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц и

записывали в дейтерированных растворителях с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. Спектры в видимой и ультрафиолетовой областях регистрировали на спектрофотометре UV-1601 (Shimadzu, Япония). Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния на приборах Delsa Nano C (Beckman Coulter Inc., США) и Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Для регистрации результатов ИФА использовали микропланшетный анализатор (фотометр) Stat-Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Результаты анализа ELISpot регистрировали с помощью прибора AID ELISpot Reader (Autoimmun Diagnostika GmbH, Германия). Для отдельных стадий ИФА и ELISpot использовали термостатируемый инкубатор-шейкер (Biosan, Латвия). Липосомы получали с помощью миниэкструдера LiposoFast basic Avestin (США).

Реактивы. В работе использовали диметилформамид (о.с.ч.) (Компонент-Реактив, Россия); хлороформ (х.ч.), метанол (х.ч.), диэтиловый эфир (ч.д.а.), хлористый метилен (х.ч.), пиридин (ч.д.а.) (Химмед, Россия). Хлороформ очищали перегонкой над хлористым кальцием, хлористый метилен перегоняли над пентоксидом фосфора, диэтиловый эфир — над гидроксидом калия. DMF очищали молекулярными ситами. В работе использовали следующие реагенты: этиловый эфир циангидроксииминоацетата (Охута Pure), 2,4,6-коллидин, *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурония гексафторфосфат (НВТУ) (Chemper, США); 4-диметиламинопиридин (DMAР), янтарный ангидрид, TFA (Sigma-Aldrich, США); соляную кислоту (Химмед, Россия); уксусную кислоту, триизопропилсилан (TIS), тиоанизол, соевый фосфатидилхолин (Lipoid GmbH, Германия). 1,3-(Дипальмитоиламино)пропан-2-ол был получен в лаборатории ранее по описанной методике [15]. Пептид VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂ был синтезирован ранее на амидной смоле Ринка [13]; часть пептида не удаляли со смолы и не снимали защитные группы с боковых функциональных групп аминокислотных остатков.

Хроматография. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Sorbfil (Сорбполимер, Россия). Обнаружение пятен на хроматограммах осуществляли в УФ-свете, обработкой 10%-ной H₂SO₄ в метаноле, комплексом [ФМК + Se₂SO₄], нингидрином с последующим нагреванием до 150°C во всех случаях.

Колоночную хроматографию проводили на Silica gel (0.040–0.063 мм) (Merck, Германия). Очистку липопептида производили методом полупрепаративной оФВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 с использованием диодно-матричного детектора. Применяли колонку Reprosilpur Basic C18 (250 × 4.6 мм I.D., S – 5 мкм), элюент – вода/ацетонитрил с 0.1% TFA при градиенте кон-

центрации ацетонитрила 5–100% за 20 мин, скорость потока 1 мл/мин, $t_R = 18.4$ мин. Оптическое поглощение элюента при аналитической и препаративной ВЭЖХ измеряли в диапазоне длин волн 205–220 нм.

Синтез 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцината. Раствор 200 мг (0.36 ммоль) 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-ола, 88 мг (0.72 ммоль) DMAР, 143 мг (1.42 ммоль) янтарного ангидрида в пиридине (15 мл) кипятили в течение 8 ч, добавляли хлороформом (70 мл), затем полученный раствор промывали 0.1 М раствором HCl (1 × 75 мл) до слабокислой реакции, органическую фазу промывали водой (2 × 75 мл), сушили над сульфатом натрия, упаривали, целевое вещество выделяли методом колоночной адсорбционной хроматографии на силикагеле, элюируя системой растворителей хлороформ–метанол (2.5→5% метанола).

Выход 90 мг (37%), R_f 0.43 (хлороформ : метанол, 8.5 : 1.5), $T_{пл}$ 122–124°C (кристаллизация из гексана).

¹H-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆, δ , м.д.): 0.85 (т, 6H, 2CH₃, Pam), 1.21–1.28 (м, 48H, 24CH₂, Pam), 1.44–1.52 (м, 4H, 2 β -CH₂, Pam), 2.02–2.18 (м, 4H, 2 α -CH₂, Pam), 2.38–2.46 (м, 4H, 2CH₂, Suc), 4.07–4.34 (м, 4H, 2CH₂, проп), 4.71–4.93 (м, 1H, CH, проп), 6.47–6.69 (м, 2H, 2NH).

Синтез конъюгата 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцината с амидированным по C-концу 24-членным пептидом (липопептида). К связанному со смолой Ринка защищенному по боковым функциональным группам пептиду VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK (0.08 ммоль) добавляли предварительно активированный по карбоксильной группе сочетанием Охута Pure, НВТУ и 2,4,6-коллидина 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-О-сукцинат (0.2 ммоль), перемешивали смесь в течение 16 ч, затем промывали ДМФА и хлористым метиленом. Липопептид отщепляли от смолы Ринка и деблокировали его боковые функциональные группы действием трифторуксусной кислоты с добавлением по 2.5% скэвнджеров – тиоанизола, триизопропилсилана и воды, далее смывали с фильтра из пористого стекла хлористым метиленом, концентрировали на роторном испарителе, осаждали из хлористого метилена диэтиловым эфиром, отделяя осадок центрифугированием, высушивали и выделяли с помощью оФВЭЖХ.

Выход 0.054 г (20%); ESI-MS, m/z : найдено [$M + 3H$]³⁺ 1123.8; [$M + 4H$]⁴⁺ 843.1; [$M + 5H$]⁵⁺ 674.6; вычислено M_r (C₁₆₃H₂₈₈N₄₀O₃₅) 3368.34.

Получение липосомальной формы 24-членного пептида VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂. Раствор 34 мг фосфатидилхолина в хлороформе упаривали на роторном испарителе для получения липидной пленки, добавляли 2 мг 24-членно-

го пептида, растворенного в стерильном PBS (рН 7.4, 1 мг/мл), и встряхивали на вортексе для получения солюбилизованных с пептидом мультиламеллярных везикул [19]. Полученные мультиламеллярные везикулы пропускали через поликарбонатный фильтр (размер пор 100 нм) ручного экструдера 21 раз для получения однослойных липосом с включенным пептидом. Полученные липосомы пропускали через колонку с сефадексом G25 (эксклюзионную хроматографию проводили на колонке Illustra NAP-5 GE Healthcare Life Science (Великобритания) с сорбентом Sephadex G25 Medium), элюируя PBS, и определяли степень включения пептида в липосомы (по суммарной оптической плотности фракций, соответствующих свободному пептиду, рассчитывали количество и долю не включенного в липосомы пептида). На колонку наносили 0.5 мл раствора липосомальной формы пептида с концентрацией в нем пептида 1 мг/мл, после выхода фракций липосом с включенным пептидом собирали две фракции свободного пептида объемом по 2 мл (спектрофотометрически при 210 нм определена их оптическая плотность: 0.291 и 0.125). Затем по закону Бугера–Ламберта–Бера определяли концентрацию пептида в этих фракциях и рассчитывали эффективность включения (ЭВ) по формуле:

$$\text{ЭВ} = ((0.5 - V_1C_1 - V_2C_2)/0.5) \times 100\%,$$

где V – объем соответствующей фракции, C – концентрация пептида во фракции.

Размер липосом с включенным пептидом определяли методом динамического рассеяния света. Перед иммунизацией пептид в липосомах пропускали через стерилизующий фильтр 200 нм.

Иммунизация животных. Для иммунизации использовали лабораторных мышей-альбиносов (сток CD-1, питомник ФГБУН НИЦБМТ ФМБА России, филиал “Андреевка”, возраст 3 недели, вес 18–20 г, самки, $n = 30$). Животные были разделены на 5 групп по 6 особей. Каждая группа была иммунизирована индивидуальным препаратом: пептидом, липопептидом, пептидом с неполным адьювантом Фрейнда, пептидом в липосомах. Перед иммунизацией липопептид (1 мг) растворяли в 100 мкл 10%-ного DMSO/DPBS (раствор Дульбекко), после чего доводили до 1 мл DPBS. Доза антигенной нагрузки составляла 100 мкг на мышью для всех препаратов. Пятая группа была контрольной – животные получали инъекцию стерильного физиологического раствора (100 мкл). При иммунизации мышью был выполнен легкий наркоз медицинским эфиром. Введение образцов было выполнено подкожно в верхнюю часть спины. Применяли трехкратную схему иммунизации с интервалом в две недели. Для выявления наличия явных признаков токсического эффекта от вводимых соединений осуществляли ежедневный осмотр общего состояния мышью и взвешивание:

после первой инъекции каждые 3 дня, после второй – каждые 7-е сутки. Через 10 дней после последней иммунизации была выполнена эвтаназия мышью, забор селезенки и крови (после цервикальной дислокации и декапитации).

Клетки селезенки мышью культивировали, используя стерильные планшеты (Nunc, Дания), среду RPMI-1640 с аланилглутамином (ПанЭко, Россия) и сыворотку крови эмбриональную телячью (HyClone, США). Для подсчета клеток использовали набор Cell Counting Kit-8 (Sigma-Aldrich, США), для стимуляции клеток – набор PepTivator HCV 1b NS4 (Meltanyi Biotec, Германия).

Имуноферментный анализ. Пептид, растворенный в 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9.25) в концентрации 0.01 мг/мл, сорбировали в течение 16 ч при температуре 4°C в лунки полистирольного планшета (Nunc, Дания). После блокирования свободных зон лунок в течение 1 ч при 37°C бычьим сывороточным альбумином в PBS (1 мг/мл; Sigma, США) проводили имуноферментный анализ по методике, описанной в работе [13]. По завершении реакции регистрировали оптическую плотность (OD) в лунках на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм. Статистически достоверно отличающимися от контроля считали величины OD, превышающие сумму среднего арифметического OD лунок, в которых анализировали образцы от контрольной группы мышью, и тройного стандартного отклонения.

Выделение лимфоцитов из селезенки мышью. Селезенку подопытных мышью гомогенизировали в DPBS (Thermo Fisher Scientific/Gibco, Великобритания) в конической пробирке с пластиковым пестиком. К гомогенату добавляли коллагеназу (100 ед./мл) и 3 мМ CaCl₂, инкубировали 3 ч при 37°C, периодически перемешивая. Клеточную суспензию фильтровали через стерильное сито с размером пор 30 мкм. Эритроциты удаляли с помощью лизирующего раствора следующего состава: 150 мМ хлорид аммония (11.85 г/л), 10 мМ бикарбонат калия, 0.1 мМ ЭДТА, рН 7.2–7.4. Отмывали клетки DPBS с 3-кратным осаждением центрифугированием в течение 5 мин при 300 g. Полученные образцы содержали спленоциты и Т-лимфоциты. После этого клетки подсчитывали в камере Горяева с окрашиванием трипановым синим, суспендировали в среде RPMI 1640 с аланилглутамином и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, затем сеяли в 96-луночный планшет для ELISpot в концентрации 1×10^5 – 2.5×10^5 клеток на лунку. Клетки стимулировали пептидом VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂ (10 мкг/мл) и пептидами из набора PepTivator HCV 1b NS4 (10 мкг для стимуляции 1×10^8 клеток). Неспецифическую стимуляцию клеток проводили смесью форбол-12-миристан-13-ацетата

(20 нг/мл; Invitrogen, США) и иономицина (1 мкг/мл; Invitrogen, США).

Методика выполнения ELISpot. Для оценки продукции IFN- γ и IL-2 использовали тест-системы Mouse IL-2 ELISPOT Kit и Mouse Interferon gamma ELISPOT Kit (Abcam, Великобритания). Непосредственно перед экспериментом в стерильных условиях в лунки планшета добавляли клетки и оставляли в CO₂-инкубаторе на 15 ч. Затем неадсорбированные клетки удаляли из планшета и отмывали лунки 4 раза по 100 мкл PBS (pH 7.4) с 0.1% Tween 20 (с инкубацией 10 мин при 4°C после добавления PBS). Далее добавляли по 100 мкл антицитоклиновых антител, конъюгированных с авидином, и инкубировали 1.5 ч при комнатной температуре. По завершении инкубации удаляли жидкость из планшета и добавляли по 100 мкл PBS (pH 7.4) с 0.1% Tween 20 (отмывка), повторяли 4 раза по 100 мкл (с интервалом 5 мин). Добавляли по 100 мкл конъюгата стрептавидина с щелочной фосфатазой и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Промывали 4 раза PBS (pH 7.4) с 0.1% Tween 20 по 100 мкл с интервалом 5 мин. Снимали с планшета верхнюю и нижнюю крышки и промывали в струе дистиллированной воды 3 раза. Удаляли избыток воды на фильтровальной бумаге и добавляли субстрат щелочной фосфатазы. Инкубировали 10–15 мин при комнатной температуре до появления пятен без фона. Затем промывали в струе дистиллированной воды 3 раза. Остатки воды удаляли на фильтровальную бумагу, планшет высушивали. Для более полного проявления пятен планшет оставляли в холодильнике при 4°C на ночь. Далее с использованием автоматического считывающего устройства AID ELISpot Reader регистрировали покрашенные зоны цитокинов.

Расчет статистической достоверности различий выполняли с использованием *t*-критерия Стьюдента и χ^2 Пирсона (статистически значимыми считали отличия при $p < 0.02$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе влияния липидного компонента на иммуногенность синтетического 24-членного пептида VIVGRILSGRAVIPDREVLRYK-NH₂, фрагмента антигена NS4A ВГС, содержащего В- и Th-эпитопы, обнаружено значительное усиление иммуногенности при включении пептида в наноразмерные фосфатидилхолиновые липосомы. Липопептид, состоящий из 24-членного пептида и 1,3-(дипальмитоиламино)пропан-2-*O*-сукцината, был менее иммуногенным, чем немодифицированный пептид с неполным адьювантом Фрейнда.

Формирование высокого уровня иммунной активности после иммунизации 24-членным пептидом в липосомах показывает, что подобный

препарат как компонент кандидатной вакцины от гепатита С перспективен для дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Н.И. Журило за получение ЯМР-спектров, В.А. Щелконогову за содействие в получении липосомальной формы пептида и исследовании характеристик пептида в липосомах (работа выполнена при использовании оборудования Центра коллективного пользования РТУ МИРЭА (соглашение № 075-15-2021-689 от 01.09.2021, уникальный идентификационный номер 2296.61321X0010)), И.А. Вострову, И.Е. Соколову, Р.Г. Вахреневу и Е.А. Ручко за анализ реакционной смеси и выделение липопептида методом офВЭЖХ, А.В. Панову и Е.Я. Табор за содействие в приобретении необходимых тест-систем.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведение данного исследования на лабораторных животных было одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колесанова Е.Ф., Соболев Б.Н., Мойса А.А., Егорова Е.А., Арчаков А.И. // Биомед. химия. 2015. Т. 61. С. 254–264. <https://doi.org/10.18097/PBMC20156102254>
2. Мойса А.А., Колесанова Е.Ф. // Биомед. химия. 2011. Т. 57. С. 14–30.
3. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Даниленко Е.Д., Нечаева Е.А., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Гудымо А.С., Боднев С.А., Онхонова Г.С., Слепцова Е.С., Кузубов В.И., Рыднюк Н.Н., Гинько З.И., Петров В.Н., Моисеева А.А., Торжкова П.Ю., Пьянков С.А., Трегубчак Т.В., Антонец Д.В., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А. // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11. № 2. С. 283–296. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699>
4. Schromm A.B., Howe J., Ulmer A.J., Wiesmuller K.H., Seyberth T., Jung G., Rössle M., Koch M.H.J., Gutsmann T., Brandenburg K. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 11030–11037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700287200>

5. Hopp T.P. // *Mol. Immunol.* 1984. V. 21. P. 13–16.
[https://doi.org/10.1016/0161-5890\(84\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0161-5890(84)90084-1)
6. Lex A., Wiesmüller K.H., Jung G., Bessler W.G. // *J. Immunol.* 1986. V. 137. P. 2676–2681.
7. Mühlradt P.F., Kieß M., Meyer H., Süßmuth R., Jung G. // *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. P. 1951–1958.
<https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1951>
8. Moyle P.M., Toth I. // *Curr. Med. Chem.* 2008. V. 15. P. 506–516.
<https://doi.org/10.2174/092986708783503249>
9. Schwendener R.A., Ludewig B., Cerny A., Engler O. // In: *Liposomes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. V. 605 / Ed. Weissig V. New York: Humana Press, 2010. P. 163–175.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_11
10. Huang W.-C., Deng B., Lin C., Carter K.A., Geng J., Razi A., He X., Chitgupi U., Federizon J., Sun B., Long C.A., Ortega J., Dutta S., King C.R., Miura K., Lee S.-M., Lovell J.F. // *Nat. Nanotechnol.* 2018. V. 13. P. 1174–1181.
<https://doi.org/10.1038/s41565-018-0271-3>
11. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Grüner N.H., Jung M.-C., Schraut W., Schirren C.-A., Heeg M., Scholz S., Witter K., Zahn R., Vogler A., Zachoval R., Pape G.R., Diepolder H.M. // *J. Virol.* 2005. V. 19. P. 12425–12433.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
12. Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E. // *J. Med. Virol.* 1998. V. 56. P. 105–111.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199810\)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199810)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c)
13. Белявцев А.Н., Мельникова М.В., Шастина Н.С., Вахренев Р.Г., Шевченко Н.Г., Сапронов Г.В., Колесанова Е.Ф., Николаева Л.И. // *Биоорг. химия.* 2021. Т. 47. С. 341–347. [Belyavtsev A.N., Melnikova M.V., Shastina N.S., Vachrenev R.G., Shevchenko N.G., Sapronov G.V., Kolesanova E.F., Nikolaeva L.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 713–718.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162021030031>
14. Semmo N., Klenerman P. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 4831–4838.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i36.4831>
15. Mergen F., Lambert D.M., Poupaert J.H., Bidaine A. // *Chem. Phys. Lipids.* 1991. V. 59. P. 267–272.
16. Zeng W., Eriksson E., Chua B.Y., Grollo L., Jackson D. // *Amino Acids.* 2010. V. 39. P. 471–480.
<https://doi.org/10.1007/s00726-009-0463-0>
17. Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., Ashfaq U.A., Asad S., Gull S., Shahid I., Hassan S. // *Virol. J.* 2011. V. 8. P. 317.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
18. Антонова Н.А., Сорокоумова Г.М., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Абаимов Д.А., Попенко В.И., Швец В.И. // *Тонкие химические технологии.* 2016. Т. 11. С. 55–62.
<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2018-13-2-55-62>
19. Щелконогов В.А., Сорокоумова Г.М., Баранова О.А., Чеканов А.В., Ключкова А.В., Казаринов К.Д., Соловьева Э.Ю., Федин А.И., Швец В.И. // *Биомед. химия.* 2016. Т. 62. № 5. С. 577–583.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20166205577>

Effect of Lipid Components on Immunogenicity of Synthetic Fragment of Hepatitis C Virus NS4A Antigen

A. N. Belyavtsev*, **, #, N. S. Shastina*, V. V. Kupriyanov**, L. I. Nikolaeva**, M. V. Melnikova***, E. F. Kolesanova***, M. Yu. Shimchishina*, **, and I. V. Kapustin****

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

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

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

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

****Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, ul. Admirala Makarova 10, Moscow, 125212 Russia

The aim of this study was to investigate the effect of lipid components on the immunogenicity of a synthetic 24-peptide containing B- and Th-epitopes. The synthetic amidated at the C-terminus peptide had the primary structure VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK, that is corresponds to fragment of the NS4A antigen of the hepatitis C virus. To enhance the immunogenicity, the peptide was acylated at the N-terminus with a lipophilic compound 1,3-(dipalmitoylamino)propane-2-O-succinate. A liposomal form of the peptide with a particle size of 160 ± 20 nm and a degree of peptide inclusion of 80% was also obtained. The particle size stability of this preparation has been shown for 3 months. The immunogenicity of peptide, lipopeptide and peptide in liposomes was studied for the production of antibodies by B-cells and cytokines (IFN- γ and IL-2) by specific CD4⁺ T-lymphocytes in laboratory mice. The 24-mer peptide included in phosphatidylcholine liposomes had the highest immunogenicity, that indicates the prospects of using this peptide in further research on the design of a vaccine against hepatitis C.

Keywords: antigen NS4A HCV, synthetic peptide, lipophilic adjuvant, liposome peptide, immunogenicity, lipopeptide