

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Анализ иммунореактивности отдельных В-клеточных эпитопов антигена NS4a вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*)

Николаева Л.И.<sup>1</sup>, Белявцев А.Н.<sup>1,2</sup>, Шевченко Н.Г.<sup>1,3</sup>, Стучинская М.Д.<sup>1</sup>, Самохвалов Е.И.<sup>1</sup>, Дедова А.В.<sup>1</sup>, Сапронов Г.В.<sup>1,3</sup>, Шастина Н.С.<sup>2</sup>, Куприянов В.В.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», 119121, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия;

<sup>4</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Россия

**Введение.** Хронический гепатит С (ХГС) является распространённым инфекционным заболеванием, существенное ограничение которого ВОЗ связывает с применением новой высокоэффективной противовирусной терапии. Ранее в антигене NS4a вируса гепатита С (ВГС) были выявлены два В-клеточных эпитопа. Было показано, что антитела (АТ) в определенных титрах на протяженный С-концевой эпитоп (1687–1718 а.о.) предсказывают высокую вероятность достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) при стандартной терапии пегилированным интерфероном- $\alpha$  и рибавирином.

**Цели работы** – анализ иммунореактивности двух В-клеточных эпитопов (серединного и С-концевого) антигена NS4a и выявление возможной ассоциации АТ к ним с достижением УВО после стандартной интерферонотерапии и лечения препаратами прямого противовирусного действия (ПППД) – даклатасвиром и софосбувиром (велпанатом).

**Материалы и методы.** Исследованы образцы сывороток крови пациентов с ХГС ( $n = 113$ ), из которых 55 участников получили стандартную интерферонотерапию, 50 – лечение велпанатом, остальным 8 терапия не проводилась. Серединный В-клеточный эпитоп (позиции 24–34 а.о.) NS4a синтезирован твёрдофазным методом, а С-концевой эпитоп (34–54 а.о.) получен генно-инженерным методом. Иммуоферментный анализ (ИФА) сывороток, собранных перед началом лечения, по двум выбранным эпитопам осуществляли согласно общепринятой методике.

**Результаты.** При анализе сывороток крови пациентов ( $n = 113$ ) было установлено, что частота выявления антител к С-концевому эпитопу достоверно выше, чем к серединному ( $p = 0,01$ ). В образцах сыворотки участников, завершивших стандартную интерферонотерапию, установлена ассоциация наличия АТ к С-концевому эпитопу с достижением УВО ( $p = 0,0245$ ). В сыворотках крови участников, завершивших терапию велпанатом, тоже установлена ассоциация наличия АТ к С-концевому эпитопу с достижением УВО ( $p < 0,0001$ ). Присутствие АТ к серединному В-эпитопу не было ассоциировано с достижением УВО независимо от применённой терапии.

**Обсуждение.** Обнаруженное различие в иммунореактивности двух В-клеточных детерминант может быть связано с локализацией ближайших Th-эпитопов, с чувствительностью антигена NS4a к протеолитическим ферментам и с особенностями презентации эпитопов антигенпрезентирующими клетками. Однако надо отметить малую изученность иммунореактивности серединного В-эпитопа. Хотя ассоциация АТ к С-концевому эпитопу с достижением УВО показана несколькими научными коллективами, детальный молекулярный механизм их влияния на эффективность терапии неясен.

**Заключение.** При ХГС АТ на С-концевой эпитоп NS4a образуются достоверно чаще, чем к серединной детерминанте. Наличие антител к С-концевому эпитопу является прогностическим признаком большой вероятности достижения УВО независимо от вида терапии и титра антител.

**Ключевые слова:** В-клеточные эпитопы; антиген NS4a вируса гепатита С (ВГС); иммунореактивность, эффективность терапии

**Для цитирования:** Николаева Л.И., Белявцев А.Н., Шевченко Н.Г., Стучинская М.Д., Самохвалов Е.И., Дедова А.В., Сапронов Г.В., Шастина Н.С., Куприянов В.В. Анализ иммунореактивности отдельных В-клеточных эпитопов антигена NS4a вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 237–245. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

**Для корреспонденции:** Николаева Людмила Ивановна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: [l.i.nikolaeva@mail.ru](mailto:l.i.nikolaeva@mail.ru)

**Участие авторов:** Николаева Л.И. – концепция и дизайн исследования, тестирование антигенов и сывороток, анализ данных; Белявцев А.Н. – синтез пептида, анализ данных; Шевченко Н.Г. – формирование групп пациентов, тестирование сывороток, анализ данных; Стучинская М.Д. – синтез пептида, тестирование сывороток, анализ данных; Самохвалов Е.И. – выявление и генотипирование РНК ВГС, анализ данных; Дедова А.В. – выделение РНК ВГС, анализ данных; Сапронов Г.В. – формирование групп пациентов, анализ данных; Шастина Н.С. – синтез пептида, анализ данных; Куприянов В.В. – получение рекомбинантного белка, анализ данных. Все авторы участвовали в интерпретации данных, подготовке текста и одобрении окончательного варианта статьи перед публикацией.

**Финансирование.** Исследование было частично выполнено за счёт гранта РФФИ (проект №20-04-00705).

**Благодарности.** Авторы выражают признательность сотрудникам ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ) Минздрава России: кандидату химических наук, старшему научному сотруднику Т.М. Гараеву за помощь при выполнении пептидного синтеза и младшему научному сотруднику А.А. Вахрамееву за техническую помощь в оформлении статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (РМАНПО) Минздрава России (Протокол № 7 от 17.05.2016).

Поступила 11.05.2022

Принята в печать 24.05.2022

Опубликована 30.06.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

## The analysis of immunoreactivity of individual B-cell epitopes of hepatitis C virus (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) NS4a antigen

Lyudmila I. Nikolaeva<sup>1</sup>, Alexandr N. Belyavtsev<sup>1,2</sup>, Nadezhda G. Shevchenko<sup>1</sup>,  
Maya D. Stuchinskaya<sup>1</sup>, Evgeniy I. Samokhvalov<sup>1</sup>, Anna V. Dedova<sup>1</sup>,  
Georgy V. Sapronov<sup>1,3</sup>, Natalya S. Shastina<sup>2</sup>, Victor V. Kuprianov<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSBEI HE «MIREA – Russian Technology University», 119571, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Federal Research Center «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Russia

**Introduction.** Chronic viral hepatitis C (CHC) is a ubiquitous infectious disease, a significant limitation of which WHO attributes to the use of a new highly effective antiviral therapy. Previously, two B-cell epitopes were identified in NS4a antigen of the hepatitis C virus (HCV). It was shown that certain titers of antibodies (ABs) to the extended C-terminal epitope (1687–1718 a.a.) can predict a high probability of achieving a sustained virological response (SVR) to standard therapy with pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin.

The **aim** of the work was to determine immunoreactivity of two B-cell epitopes (middle and C-terminal) of NS4a antigen, and to estimate a possible association of ABs to them with the achievement of SVR after standard interferon therapy and treatment with direct antiviral drugs (DAAs) daclatasvir and sofosbuvir (velpanat).

**Materials and methods.** Blood serum samples of patients with CHC ( $n = 113$ ), of which 55 participants received standard interferon therapy, 50 received velpanate treatment, the remaining 8 received no therapy were examined. The middle B-cell epitope (positions 24–34 a.a.) of NS4a was synthesized by the solid-phase method, while the C-terminal epitope (34–54 a.a.) was obtained using genetically engineered techniques. Enzyme immunoassay (ELISA) testing of the sera collected before treatment was performed for the two selected epitopes according to the conventional methods.

**Results.** The antibodies to the C-terminal epitope were detected significantly more frequently than those to the middle one ( $p = 0.01$ ) when analyzing the blood sera of patients ( $n = 113$ ). The presence of ABs to the C-terminal epitope in the serum samples of participants who completed standard interferon therapy was associated with the achievement of SVR ( $p = 0.0245$ ). In the blood sera of participants who completed therapy with velpanate, an association of the presence of ABs to the C-terminal epitope with the achievement of SVR was also established ( $p < 0.0001$ ). The presence of ABs to the middle B epitope was not associated with the achievement of SVR, regardless of the therapy used.

**Discussion.** The observed difference in the immunoreactivity of the two B-cell determinants may be associated with the localization of the nearest Th-epitopes, the sensitivity of NS4a antigen to proteolytic enzymes, and

the peculiarities of epitope presentation by antigen-presenting cells. However, it should be noted that the immunoreactivity of the middle B-epitope is poorly studied. Although the association of ABs to the C-terminal epitope with the achievement of SVR has been shown by several scientific teams, the detailed molecular mechanism of their influence on the effectiveness of therapy is unclear.

**Conclusion.** In CHC, ABs to the C-terminal epitope of NS4a are produced more frequently than those to the median epitope. The presence of ABs to the C-terminal epitope is a predictive marker of a high probability of achieving SVR, regardless of the type of therapy and antibody titer.

**Keywords:** *B-cell epitopes; antigen NS4a of hepatitis C virus (HCV); immunoreactivity, therapy effectiveness*

**For citation:** Nikolaeva L.I., Belyavtsev A.N., Shevchenko N.G., Stuchinskaya M.D., Samokhvalov E.I., Dedova A.V., Sapronov G.V., Shastina N.S., Kuprianov V.V. The analysis of immunoreactivity of individual B-cell epitopes of hepatitis C virus (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) NS4a antigen. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 237–245. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

**For correspondence:** Lyudmila I. Nikolaeva, D.Sci. (Biol), Leading Researcher of the Laboratory Gene Engineering Products, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [l.i.nikolaeva@mail.ru](mailto:l.i.nikolaeva@mail.ru)

**Information about the authors:**

Nikolaeva L.I., <https://orcid.org/0000-0002-1323-5568>

Belyavtsev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-6224-1323>

Shevchenko N.G., <https://orcid.org/0000-0002-2486-4554>

Stuchinskaya M.D., <https://orcid.org/0000-0001-8544-7482>

Samokhvalov E.I., <https://orcid.org/0000-0002-1941-0996>

Dedova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-2491-9324>

Sapronov G.V., <https://orcid.org/0000-0002-2154-2904>

Shastina N.S., <https://orcid.org/0000-0001-8382-7262>

Kuprianov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8602-1974>

**Contribution:** Nikolaeva L.I. – study concept and design, antigens and sera testing, data analysis; Belyavtsev A.N. – peptide synthesis, data analysis; Shevchenko N.G. – patients groups' formation, sera testing, data analysis; Stuchinskaya M.D. – peptide synthesis, sera testing, data analysis; Samokhvalov E.I. – HCV RNA identification and genotyping, data analysis; Dedova A.V. – HCV RNA isolation, data analysis; Sapronov G.V. – patients groups' formation, data analysis; Shastina N.S. – peptide synthesis, data analysis; Kuprianov V.V. – obtaining recombinant protein, data analysis. All authors participated in data interpretation, text preparation, and approval of the final version of the article before publication.

**Funding.** The research was partly funded by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No 20-04-00705).

**Acknowledgement.** The authors are grateful to the scientists of the FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, T.M. Garaev, Ph.D. (Chem.), Senior Researcher, for help in peptide synthesis, and A.A. Vakhrameev, Junior Researcher, for technical assistance in the article preparing.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 7 dated 17.05.2016).

Received 11 May 2022

Accepted 24 May 2022

Published 30 June 2022

## Введение

Вирусный гепатит С – повсеместно распространённое инфекционное заболевание с парентеральным механизмом передачи, часто имеющее длительное хроническое течение. Отечественные и зарубежные эксперты оценивают долю лиц, имеющих антитела (АТ) к вирусу гепатита С (ВГС) в нашей стране, в 2,9–4,0%, что является высоким показателем [1–3]. Абсолютные количественные данные по носителям АТ достигают 4,2 млн человек, подавляющее большинство из которых хронически инфицированы [1]. Регистрация максимального числа случаев острого гепатита С в РФ наблюдалась в 2000 г., хронического гепатита С (ХГС) – в 2008 г. [4]. Впервые зарегистрированные случаи ХГС в 2020 г. составили 24,5 случая на 100 тыс. населения, что в 1,7 раза меньше, чем в 2009 г. [4, 5].

Этиологическим агентом заболевания является вирус гепатита С (ВГС) (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) [6]. ВГС имеет липидно-белковую оболочку и характеризуется выраженной неоднородностью размеров при выделении его из биологического материала инфицированных лиц. По данным М.Т. Saitanese и соавт., основная доля вирусных частиц имеет диаметр 67–68 нм [7]. Геном возбудителя представлен одноцепочечной молекулой +РНК (позитивной полярности) также варибельного размера, в среднем составляющего ~9,6 т.п.н. Изоляты ВГС подразделяются на 8 генотипов и несколько десятков субтипов в зависимости от генетической варибельности и филогенетического родства [8, 9].

РНК вируса кодирует большой полипротеин, который расщепляется клеточными и вирусными протеазами на структурные белки: сердцевинный (ядер-

ный, или core), и два оболочечных (E1 и E2), а также неструктурные полипептиды: виropорин (p7), две протеазы (NS2 и NS3), кофактор сериновой протеазы (NS4a), два компонента репликативного комплекса (NS4b, NS5a) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (NS5b). Ключевую роль в высечении из полипротеина неструктурных белков выполняют сериновая протеаза NS3 и её кофактор NS4a. Очевидно, именно по этой причине первый противовирусный препарат прямого действия (ПППД) – теллапревир – был разработан против сериновой протеазы; он представлял собой пептидомиметик, нарушающий протеолитическую функцию этого фермента.

Полипептид NS4a состоит из 54 аминокислотных остатков, он частично (N-концевым участком) погружён в липидный матрикс мембраны эндоплазматической сети. В серединной части кофактора находится область контакта с сериновой протеазой. Считается, что C-концевая часть молекулы не имеет вторичной структуры и экспонирована из комплекса NS3/NS4a. В составе NS4a идентифицированы два В-клеточных эпитопа: серединный (позиции 24–36 а.о.) и C-концевой (32–54 а.о.) [10, 11].

Ранее при анализе сывороток пациентов, получавших стандартную интерферонотерапию (пегилированный интерферон- $\alpha$  и рибавирин), установлена связь наличия АТ в высоком титре (более 1 : 1250) к протяжённому C-концевому фрагменту NS4a (1687–1718 а.о.) с достижением устойчивого вирусологического ответа (УВО) [12, 13]. Авторы предложили использовать факт обнаружения АТ в таком высоком титре как предиктивный признак большой вероятности достижения УВО при стандартной интерферонотерапии ХГС. Появление принципиально новой терапии ПППД сделало возможным достижение УВО в значительном количестве случаев (> 95%) [14]. Однако, принимая во внимание высокую стоимость лечения и риск его безуспешного завершения, мы считаем не менее актуальной задачей установление предикторов терапевтических неудач при назначении ПППД. Следует отметить, что иммуногенность серединного В-эпитопа NS4a ВГС и прогностическое значение АТ к этому участку до настоящего времени не исследованы.

Таким образом, целями данного исследования явились установление иммунореактивности В-клеточных эпитопов антигена NS4a и анализ возможной ассоциации АТ к данным детерминантам с достижением УВО при противовирусной терапии ХГС. Для достижения поставленных задач были получены серединный и C-концевой эпитопы, проанализировано их взаимодействие с сыворотками крови от пациентов с разными результатами лечения как при стандартной интерферонотерапии, так и при применении велпаната, ПППД.

### Материалы и методы

Образцы крови получены от пациентов ( $n = 113$ ), с подтвержденным ХГС, при их инфицированном согласии. В исследование не включались лица, имеющие ВИЧ-инфекцию (*Retroviridae: Orthoretrovirinae*:

*Lentivirus: Human immunodeficiency virus*), онко- и гематологические заболевания, а также инфицированные другими гепатотропными вирусами. Изучение биологического материала одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (РМАНПО) Минздрава России (Протокол № 7 от 17.05.2016). Группу сравнения составили здоровые ( $n = 20$ ) потенциальные кандидаты в доноры крови.

Пептид VIVGRIILSGK (24–34 а.о. в антигене NS4a), почти полностью воспроизводящий серединный В-эпитоп (без аминокислотных остатков в позициях 35 и 36), получен твёрдофазным синтезом в ручном режиме на полимерном носителе (смоле) Ванга по Fmoc-протоколу (*англ.* fluorenylmethoxycarbonyl protecting group, флуоренилметоксикарбонильная защитная группа) с использованием Fmoc-защищённых L-аминокислот (Sigma-Aldrich, США; Merck, Германия). Для активации карбоксильных групп использовали метод активированных эфиров с применением конденсирующего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида ( $C_8H_{17}N_3$ ) (Merck). Очистку пептида проводили методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографической колонке ReproSil-Pur C18 (Maisch, Германия); элюент – вода/ацетонитрил (Gradient grade for far UV, Fisher Chemical, Великобритания) с 0,1% трифторуксусной кислотой ( $CF_3COOH$ ). Чистота полученного пептида по данным аналитической ВЭЖХ составила 96%.

Следующий фрагмент NS4a (34–54 а.о.), почти полностью воспроизводящий C-концевой В-эпитоп (без остатков 32 и 33), имел аминокислотную последовательность RPVVCPDREVLVEGFDEMEEC (что соответствует последовательности для ВГС субтипа 1b; база данных GenBank MN200420.1). Данный полипептид синтезировали генно-инженерными методами как рекомбинантную молекулу, соединённую с зелёным флуоресцирующим протеином (*англ.* green fluorescent protein, GFP). Исходно получали клоны *E. coli* DH5 $\alpha$ , содержащие плазмиду *pUC19* с вставкой, кодирующей целевой фрагмент белка NS4a и протеин GFP, что было подтверждено секвенированием. Затем из плазмиды уникальными рестриктазами AscI и SmaI вырезали фрагмент с нужной последовательностью и переносили его в бинарный вектор *pEff*, описанный ранее и предоставленный авторами [15]. После этого плазмиду *pEff* NS4A-GFP переносили из *E. coli* в агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* s. *radiobacter*, штамм GV3101 (pMP90). Для этого готовили компетентные клетки агробактерий и трансформировали их плазмидой *pEff* NS4A-GFP, выделенной из клеток *E. coli*. В нижнюю поверхность листьев растения *Nicotiana benthamiana* (табак Бентхама) вводили трансформированные агробактерии и получали транзиентную экспрессию, визуально наблюдаемую по свечению GFP в ультрафиолетовых лучах. С целью контроля также был получен индивидуальный рекомбинантный белок GFP.

Выделение, очистку и анализ рекомбинантных протеинов на хроматографическом металлохелатном сорбенте Ni-NTA (Qiagen, США) осуществляли согласно методике производителя последнего. Определение концентрации белка проводили в соответствии со стандартным методом Брэдфорда. Чистоту рекомбинантного белка подтверждали электрофорезом в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия ( $C_{12}H_{25}SO_4Na$ ) (ДДС), используя общепринятый метод Лэммли; показатель чистоты составил 93%.

Процедуру иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли по стандартной методике в планшетах MediSorb (Nunc, Дания), сорбируя пептид и рекомбинантный протеин в концентрации 10 мкг/1 мл в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5) на протяжении 16 ч при 4°C. Остальные этапы выполняли, как описано ранее, с разведением сывороток 1 : 10 [16]. Результаты ИФА регистрировали при помощи спектрофотометра StatFax 3200 (Awareness Technology, США), измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 650 нм. Результаты тестирования образцов представляли в виде коэффициента позитивности (КП), который рассчитывали как отношение ОП образца к пороговой величине ОП. Последнюю величину определяли как сумму средней арифметической величины ОП от 20 отрицательных образцов и трехкратной стандартной ошибки.

РНК ВГС выявляли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (нижний предел чувствительности 15 МЕ/мл), используя набор реагентов «РеалБест РНК ВГС» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Генотипирование проводили с системой специфических праймеров или методом автоматического секвенирования зон генома: 5'-нетранслируемого региона (core) и NS5b, – используя секвенатор 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Япония) [17, 18].

Наличие АТ к антигенам ВГС определяли в иммуноферментной тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр»

(ЗАО «Вектор-Бест»). Данная система, описанная ранее, позволяет выявлять АТ к четырём отдельным антигенам: core, NS3, NS4ab (единый рекомбинантный белок содержит участок С-концевой области NS4a, фрагмент выщепления и часть N-концевой области NS4b) и NS5a [19].

При обработке статистических данных применяли пакет программ Statistica v10.0 (Tulsa, США). Средние показатели ( $M$ ) в группах пациентов представляли в виде  $M \pm 2SEM$  (двойная стандартная ошибка среднего). Нормальность распределения устанавливали графическим критерием, используя пакет программ Statistica v10.0. В случае невозможности доказать параметрический характер распределения достоверность различий параметров в группах оценивали с помощью  $\chi^2$ -критерия Пирсона; при этом в случае необходимости использовали поправку Йейтса либо точный симметричный метод Фишера. Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты

В структуре антигена NS4a, иммунореактивность фрагментов которого изучалась, выявлены В-клеточные и Т-хелперные (Th) эпитопы. Схема их расположения приведена на рис. 1. Серединный В-эпитоп является консервативным, а С-концевой – типоспецифичным, в некоторых положениях аминокислотных остатков возможны вариации в зависимости от конкретного генотипа ВГС.

Перед началом анализа иммунореактивности двух эпитопов сыворотки крови от всех участников были протестированы на наличие АТ к ВГС (анти-ВГС) в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр». В группе сравнения анти-ВГС не обнаружены, в группе участников с ХГС – выявлены во всех образцах ( $n = 113$ ; 100%). К антигену NS4ab (единый рекомбинантный белок) наличие АТ установлено у 83 (73,5%) пациентов.

В образцах группы сравнения при анализе иммунореактивности двух В-эпитопов было установлено, что средняя величина ОП АТ на серединный эпитоп

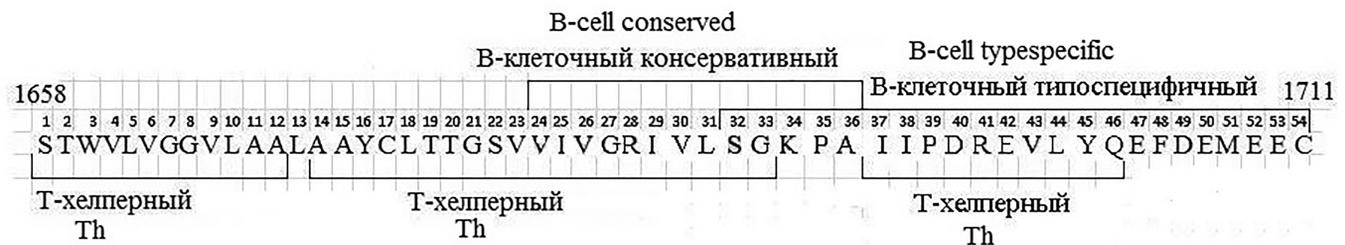


Рис. 1. Схема расположения В-клеточных и Т-хелперных (Th) эпитопов в составе антигена NS4a вируса гепатита С.

**Примечание.** Расположение эпитопов выделено рамками. Аминокислотная последовательность антигена NS4a и локализация В- и Т-клеточных эпитопов соответствуют вирусу гепатита С субтипа 1b [10, 11, 20–22]. Приведена собственная нумерация остатков в NS4a. Внизу показаны возможные вариации аминокислотных остатков (названия даны в соответствии с международной номенклатурой; сверху отмечены концевые остатки по полипротеину).

Fig. 1. Scheme of the location of B-cell and T-helper (Th) epitopes in the NS4a antigen of hepatitis C virus.

**Note.** The amino acid sequence of the NS4a antigen and localization of B- and T-cell epitopes correspond to hepatitis C virus subtype 1b [10, 11, 20–22]. The author's numbering of residues in NS4a is given. Possible variations of the amino acid residues are shown below (names are given according to the international nomenclature; endpoints numbering in polyprotein is shown at the top).

составила 0,066; на С-концевой – 0,080. При оценке взаимодействия всех образцов групп исследования и сравнения с рекомбинантным GFP не выявлено ни одного позитивного результата (средняя ОП 0,042). Данные по иммунореактивности эпитопов (серединного и С-концевого) с образцами всех пациентов представлены в **табл. 1**.

Из данные табл. 1 следует, что С-концевой эпитоп антигена NS4a (34–54 а.о.) обладает большей иммунореактивностью, АТ на него выявляются чаще, чем на серединный эпитоп ( $p = 0,01$ ). Среднее значение КП АТ к С-концевому эпитопу было выше, чем к серединному, однако ввиду широкого диапазона величин не достигло статистической значимости ( $p = 0,11$ ). Максимальная величина КП этих АТ в 4,9 раза превышал таковую для АТ к серединному эпитопу (39,785 против 8,100).

Из публикаций других авторов следует, что наличие АТ в титре более, чем 1 : 1250 к протяжённому С-концевому эпитопу (1687–1718 а.о.) NS4a перед началом лечения является предиктором эффективности стандартной интерферонотерапии [12, 13]. С учётом этого факта был выполнен сравнительный анализ наличия АТ к изучаемым эпитопам у 55 пациентов перед началом стандартной интерферонотерапии (**табл. 2**). Распределение субтипов ВГС в этой группе было следующим: 1b – 60%; 3a – 36,4%; 2a – 3,6%. Через 6 мес после окончания лечения наличие/отсутствие УВО подтверждался тестом на РНК ВГС. УВО достигли 25 участников (среди них ВГС 1b – 52%; 3a – 44%; 2a – 4%), не достигли – 30 (ВГС субтипа 1b – 66,7%; 3a – 30% и 2a – 3,3%).

Иммунореактивность обоих эпитопов в исследованной выборке образцов имела близкие значения (**табл. 2**). Несмотря на то что АТ к С-концевому эпитопу выявлялись несколько чаще и с более высокими величинами КП, различия были статистически не-

достоверны при сравнении с теми же показателями для серединного эпитопа. Сопоставление данных образцов пациентов, достигших и не достигших УВО, показало более частое выявление АТ к С-концевому эпитопу в первом случае ( $p = 0,0245$ ; 16 из 25 против 9 из 30). В отношении АТ к серединному эпитопу не установлено ассоциации их присутствия с достижением УВО ( $p = 0,6936$ ; 13 из 25 против 14 из 30). Вклад отдельных субтипов ВГС в частоту выявления АТ к С-концевому эпитопу также оказался статистически незначимым ( $p = 0,6766$ ).

В следующей группе пациентов ( $n = 50$ ) перед началом терапии велпанатом (противовирусные компоненты: ингибитор NS5a (дактасвир) и ингибитор NS5b (софосбувир), эффективны против ВГС генотипов 1–6) проанализированы количественные параметры АТ к обоим эпитопам. УВО достигли 30 участников (распределение субтипов ВГС: 1b – 53,3%; 3a – 40%; 2a – 6,7%) и не достигли – 20 (1b – 65%; 3a – 30% и 2a – 5%). Результаты взаимодействия образцов сывороток, собранных перед началом терапии велпанатом, с анализируемыми эпитопами представлены в **табл. 3**.

АТ к С-концевому эпитопу достоверно чаще детектировались в группе лиц, имевших УВО (30 из 30 против 6 из 20;  $p < 0,0001$ ). Выявление АТ к серединному эпитопу не имело зависимости от результата лечения (12 из 30 против 4 из 20,  $p = 0,6738$ ). Субтип ВГС не оказал значимого влияния на наличие АТ к С-концевой детерминанте ( $p = 1,0000$ ).

Таким образом, из полученных данных следует, что факт наличия АТ к С-концевому эпитопу является прогностическим признаком большей вероятности достижения УВО как при стандартной интерферонотерапии, так и в случае лечения ПППД (велпанатом). Однако ассоциация факта отсутствия АТ к С-концевому эпитопу нуждается в дополнительном изучении.

**Таблица 1.** Данные по иммунореактивности анализируемых эпитопов, полученные с образцами ( $n = 113$ ) пациентов с хроническим гепатитом С

**Table 1.** Data on the immunoreactivity of the analyzed epitopes obtained by analyzing samples ( $n = 113$ ) from patients with chronic hepatitis C

Анализируемые эпитопы Analyzed epitopes	Доля образцов с антителами, % ( $n$ ) Proportion of samples with antibody; percentage ( $n$ )	Среднее значение КП* Average PR value*	Доля образцов со значением КП < 3,000 ( $n$ ) Proportion of samples with PR value < 3.000 ( $n$ )	Доля образцов со значением КП > 3,000 ( $n$ ) Proportion of samples with PR value > 3.000 ( $n$ )	Максимальная величина КП Maximum of PR value
Серединный (24–34 а.о.) Middle (aa 24–34)	42,48 ± 4,47 (48)	1,814 ± 0,348	99,91 ± 2,37 (44)	9,09 ± 2,37 (4)	8,100
С-концевой (34–54 а.о.) C-terminal (aa 34–54)	61,06 ± 4,61 (69)	4,878 ± 1,979	55,907 ± 6,030 (38)	44,93 ± 6,03 (31)	39,785
Достоверность различий, $p$ Differences significance, $p$	0,01	0,11	< 0,01	< 0,01	0,026**

**Примечание.** \*КП – коэффициент позитивности; \*\*значения  $p$  рассчитаны с использованием образцов с КП > 8,000.

**Note.** \*PR, positivity ratio; \*\* $p$  value calculated using the samples with a PR > 8.000.

**Обсуждение**

При сравнении двух В-клеточных эпитопов NS4a, срединного и С-концевого, показано, что иммунореактивность выше у последнего. Обнаруженное различие может быть связано с локализацией ближайших Th-эпитопов. У срединного В-эпитопа имеется частичное перекрытие с аминокислотными остатками Th-эпитопа (14–33 а.о., для аллелей HLA DRB1 и DQB1) [20]. Внутри С-концевого В-эпитопа локализуется другой Th-эпитоп (34–47 а.о.) для аллелей HLA DRB1) [21]. Последний располагается после срединного В-эпитопа и может усиливать его

гуморальный ответ. Возможно, что различие в иммунореактивности двух В-эпитопов обусловлено их разной доступностью для протеолитических ферментов и чувствительностью к ним, с особенностями презентации детерминант в антигенпрезентирующих клетках. По сравнению с С-концевым эпитопом иммунореактивность у срединного эпитопа, имеющего контакт с сериновой протеазой NS3, ниже. Тем не менее ожидается, что он может представлять интерес при конструировании вакцины против гепатита С [16].

Следует отметить, что срединный В-эпитоп характеризуется консервативной последовательностью, т.е. АТ к нему генотип/субтип-независимые. Поскольку

**Таблица 2. Данные по иммунореактивности анализируемых эпитопов, полученные с образцами пациентов (n = 55) перед началом стандартной пегинтерферонотерапии**

**Table 2. Data on the immunoreactivity of the analyzed epitope obtained by analyzing patients' samples (n = 55) obtained before standard peginterferon therapy**

Анализируемые эпитопы Analyzed epitopes	Доля образцов с антителами у пациентов, достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients with SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов с УВО Mean value of PR in samples from SVR group	Доля образцов с антителами от пациентов, не достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients without SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов, не достигших УВО Mean value of PR in samples from NR group
Срединный (24–34 а.о.) Middle (aa 24–34)	52,00 ± 10,20 (13)	1,853 ± 0,448	46,67 ± 9,26 (14)	1,981 ± 0,838
С-концевой (34–54 а.о.) C-terminal (aa 34–54)	64,00 ± 9,80 (16, из них 8 с субтипом ВГС 1b) (16, of which 8 with HCV 1b)	4,789 ± 2,118	30,00 ± 8,51 (9, из них 6 с субтипом ВГС 1b) (9, of which 6 with HCV 1b)	2,647 ± 1,262
Достоверность различий, p Differences significance, p	0,921	0,200	0,288	0,520

**Примечание.** УВО – устойчивый вирусологический ответ; ВГС – вирус гепатита С.

**Note.** SVR, sustained virological response; NR, non-sustained virological response; HCV, hepatitis C virus.

**Таблица 3. Данные по иммунореактивности анализируемых эпитопов, полученные с образцами пациентов (n = 50) перед началом терапии велпанатом**

**Table 3. Data on the immunoreactivity of analyzed epitope obtained by analyzing patients' samples (n = 50) obtained before velpanate therapy**

Анализируемые эпитопы Analyzed epitopes	Доля образцов с антителами у пациентов, достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients with SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов с УВО Mean value of PR in samples from SVR group	Доля образцов с антителами от пациентов, не достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients without SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов, не достигших УВО Mean value of PR in samples from NR group
Срединный (24–34 а.о.) Middle (aa positions 24–34)	40,00 ± 9,10 (12)	1,996 ± 1,134	20,00 ± 9,18(4)	1,864 ± 1,194
С-концевой (позиции 34–54 а.о.) C-terminal (aa 34–54)	98,15 ± 1,85* (30, из них 17 с субтипом ВГС 1b) (30, of which 17 with HCV 1b)	5,407 ± 2,854	30,00 ± 10,51 (6, из них 4 с субтипом ВГС 1b) (6, of which 4 with HCV 1b)	1,306 ± 0,128
Достоверность различий, p Differences significance, p	< 0,0001	0,280	0,715	>0,500

**Примечание.** \*С учётом поправки на объём выборки, при этом все участники имели эти антитела; УВО – устойчивый вирусологический ответ; ВГС – вирус гепатита С.

**Note.** \*Adjusted for the group size, but all participants displayed the antibody; SVR, sustained virological response; NR, non-sustained virological response; HCV, hepatitis C virus.

ку С-концевой эпитоп является типоспецифичным, возможны различия при взаимодействии с ним АТ от лиц, инфицированных вирусом различных генотипов. В представленном исследовании распределение пациентов по доминирующим генотипам (1b и 3a) в группах участников, прошедших стандартную интерферонотерапию и лечениеПППД, оказалось весьма близким (субтип 1b – 60,0 и 58,0%; 3a – 36,4 и 36,0% соответственно). В группе с УВО распределение участников по субтипам ВГС было следующим: при пегинтерферонотерапии 1b – 52%, 3a – 44%; в случае использованияПППД 1b – 53,3% и 3a – 40%. Указанные значения также очень близки к приведённым выше.

Таким образом, различное влияние субтипов ВГС на наличие АТ не установлено. Этот феномен, вероятно, связан с присутствием в С-концевом эпитопе почти консервативного мотива в позиции 39–50 а.о. [23]. В то же время установлены основные особенности области С-концевого эпитопа, характерные только для субтипов 2a и 3a: L (лейцин) в позиции 37, K (лизин) – в 41 и Y (тирозин) в позиции 48 [22]. При сравнении с последовательностью рекомбинантного белка (RPVVC PDREVLVYEGFDEMEEC) можно видеть, что в позиции 37 имеет место синонимичная замена V (валин) → L (гидрофобные аминокислоты); в позиции 41 – также синонимичная замена R (аргинин) → K (положительно заряженные аминокислоты). Только в позиции 48 присутствует синонимичная замена F (фенилаланин) → Y (гидрофобная молекула на незаряженную полярную). Тем не менее обе аминокислоты принадлежат к группе ароматических, стерически сходны между собой и различаются наличием/отсутствием одной гидроксильной группы. Возможно, поэтому показатели выявления АТ к С-концевому эпитопу у пациентов с субтипами 1b, 2a и 3a не имели существенных различий.

В проведённом исследовании показано, что факт наличия АТ к С-концевому В-эпитопу перед началом противовирусной терапии (как стандартной интерферонотерапии, так иПППД) статистически достоверно ассоциирован с достижением УВО. Некоторые участники, не достигшие УВО, тоже имели эти антитела (табл. 2 и табл. 3). Вероятно, необходим комплекс других предиктивных признаков, чтобы с большей точностью оценить вероятность достижения УВО. Помимо этого, нами подтверждены данные других авторов о прогностической роли АТ к С-концевому В-эпитопу антигена NS4a при интерферонотерапии, но без обязательного наличия их высокого титра [12, 13]. Однако надо отметить, что детальный механизм влияния АТ к С-концевому В-эпитопу NS4a на достижение УВО неясен. Результаты настоящей работы могут представлять интерес для разработки и развития прогностических критериев персонализированной терапии ХГС.

### Заключение

Основываясь на результатах исследования, представляется возможным сделать следующие выводы:

1. Из двух проанализированных В-эпитопов антигена NS4a у пациентов с ХГС достоверно чаще выявлялись АТ к С-концевому эпитопу (около 61%).
2. Наличие АТ к С-концевому эпитопу NS4a перед началом лечения было ассоциировано с достижением УВО как при стандартной интерферонотерапии, так и при леченииПППД.
3. Наличие АТ к срединному эпитопу до начала терапии не имело ассоциации с достижением УВО.
4. АТ к С-концевому эпитопу являются прогностическим признаком большей вероятности достижения УВО при лечении ХГС.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Чуланов В.П., Пименов Н.Н., Мамонов Н.А., Сагалова О.И., Шестакова И.В., Покровский В.И. Хронический гепатит С как проблема здравоохранения России сегодня и завтра. *Тепаневрологический архив*. 2015; 87(11): 5–10. <https://doi.org/10.17116/terarkh201587115-10>
2. Daw M.A., El-Bouzedi A.A., Ahmed M.O., Dau A.A., Agnan M.M., Drah A.M. Geographic integration of hepatitis C virus: A global threat. *World J. Virol.* 2016; 5(4): 170–82. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i4.170>
3. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolono A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(34): 7824–40. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i34.7824>
4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году». Москва; 2015.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; с. 158. Доступно на: <https://36.rospotrebnadzor.ru/documents/public-reports>
6. Smith D.B., Bercher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., et al. Proposal update to the taxonomy of the genera *Hepacivirus* and *Pegivirus* within the *Flaviviridae* family. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(11): 2894–907. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000612>
7. Catanese M.T., Uryu K., Kopp M., Edwards T., Andrus L., Rice W.J., et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(23): 9505–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307527110>
8. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J., et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014; 59(1): 318–27. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
9. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(11): 1722–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401>
10. Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E. Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J. Med. Virol.* 1998; 56(2): 105–11. [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)
11. Chien D.Y., McFarland J., Tabrizi A., Kuo C., Houghton M., Kuo G. Distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core, NS4, and NS5 region polypeptides. In: Nishio-ka N., Suzuki S., Mishiro S., Oda T., eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo: Springer-Verlag; 1994: 320–4.
12. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sällberg 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(6): 701–13. <https://doi.org/10.1002/jmv.20846>
13. Orlent H., Desombere I., Hansen B., Van Vlierberghe H., Haagmans B., De Knecht J., et al. Baseline anti-NS4a antibodies in combination with on-treatment quantitative HCV-RNA reliably identifies non responders to peginterferon-ribavirin combination therapy after 4 weeks of treatment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 22(12): 1443–8. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32833ef6e3>
14. Falada-Nwulia O., Soares-Cuervo C., Nelson D.R., Fried M.W., Segals J.B., Sulkowski M.S. Oral direct-acting agent therapy for

- hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* 2017; 166(9): 637–48. <https://doi.org/10.7326/M16-2575>
15. Mardanova E.S., Blokhina E.A., Tsybalova L.M., Peyret H., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of Potato Virus X. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 247. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00247>
  16. Белявцев А.Н., Мельникова М.В., Шевченко Н.Г., Сапронов Г.В., Вахренев Р.Г., Шастина Н.С., и др. Синтез и анализ свойств иммуногенного фрагмента полипептида NS4A вируса гепатита С. *Биоорганическая химия.* 2021; 47(3): 341–7. <https://doi.org/10.31857/S0132342321030039>
  17. Ohno O., Mizokami M., Wu R.R., Saleh M.G., Ohba K., Orito E., et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(1): 201–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.1.201-207.1997>
  18. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
  19. Nikolaeva L.I., Blokhina N.P., Tsurikova N.N., Voronkova N.V., Miminoshvili M.I., Braginsky D.M., et al. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. *J. Viral. Hepat.* 2002; 9(6): 429–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2002.00369.x>
  20. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., et al. Broad specificity of virus-specific CD4<sup>+</sup> T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12584–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12584-12595.2002>
  21. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruener N.H., Jung M.C., Schraut W., Schirren C.A., et al. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J. Virol.* 2005; 79(19): 12425–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
  22. Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., et al. NS4A as a marker of HCV history suggests that different HCV genotypes originally evolved from genotype 1b. *Virol. J.* 2011; 8: 317. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
  23. Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fields H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. *Virology.* 1999; 257(1): 177–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9612>
  7. Catanese M.T., Uryu K., Kopp M., Edwards T., Andrus L., Rice W.J., et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(23): 9505–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307527110>
  8. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J., et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014; 59(1): 318–27. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
  9. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(11): 1722–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401>
  10. Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E. Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J. Med. Virol.* 1998; 56(2): 105–11. [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)
  11. Chien D.Y., McFarland J., Tabrizi A., Kuo C., Houghton M., Kuo G. Distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core, NS4, and NS5 region polypeptides. In: Nishioka N., Suzuki S., Mishiro S., Oda T., eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease.* Tokyo: Springer-Verlag; 1994: 320–4.
  12. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sällberg 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(6): 701–13. <https://doi.org/10.1002/jmv.20846>
  13. Orlent H., Desombere I., Hansen B., Van Vlierberghe H., Haagsmans B., De Knecht J., et al. Baseline anti-NS4a antibodies in combination with on-treatment quantitative HCV-RNA reliably identifies non responders to peginterferon-ribavirin combination therapy after 4 weeks of treatment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 22(12): 1443–8. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283ef6e3>
  14. Falada-Nwulia O., Soares-Cuervo C., Nelson D.R., Fried M.W., Segasl J.B., Sulkowski M.S. Oral direct-acting agent therapy for hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* 2017; 166(9): 637–48. <https://doi.org/10.7326/M16-2575>
  15. Mardanova E.S., Blokhina E.A., Tsybalova L.M., Peyret H., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of Potato Virus X. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 247. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00247>
  16. Belyavtsev A.N., Shastina N.S., Shevchenko N.G., Nikolaeva L.I., Melnikova M.V., Vahrenev R.G., et al. Synthesis and analysis of properties of an immunogenic fragment from NS4A polypeptide of hepatitis C virus. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. 2021; 47(3): 713–18. <https://doi.org/10.1134/S1068162021030031> (in Russian)
  17. Ohno O., Mizokami M., Wu R.R., Saleh M.G., Ohba K., Orito E., et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(1): 201–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.1.201-207.1997>
  18. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
  19. Nikolaeva L.I., Blokhina N.P., Tsurikova N.N., Voronkova N.V., Miminoshvili M.I., Braginsky D.M., et al. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. *J. Viral. Hepat.* 2002; 9(6): 429–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2002.00369.x>
  20. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., et al. Broad specificity of virus-specific CD4<sup>+</sup> T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12584–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12584-12595.2002>
  21. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruener N.H., Jung M.C., Schraut W., Schirren C.A., et al. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J. Virol.* 2005; 79(19): 12425–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
  22. Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., et al. NS4A as a marker of HCV history suggests that different HCV genotypes originally evolved from genotype 1b. *Virol. J.* 2011; 8: 317. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
  23. Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fields H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. *Virology.* 1999; 257(1): 177–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9612>

## REFERENCES