

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Адъювантное действие дисперсного фуллера C₆₀ на иммунный ответ против конструкций, имитирующих аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С

Масалова О.В.¹, Леснова Е.И.¹, Андреев С.М.², Шершакова Н.Н.², Козлов В.В.¹, Пермякова К.Ю.^{1,3}, Демидова Н.А.¹, Валуев-Эллистон В.Т.⁴, Турецкий Е.А.^{2,5}, Иванов А.В.⁴, Николаева Т.Н.¹, Хаитов М.Р.^{2,6}, Пронин А.В.¹, Куц А.А.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия;

⁴ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, 119991, г. Москва, Россия;

⁵ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия;

⁶ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Введение. Вакцина против гепатита С пока не разработана. Рекомбинантные белки и плазмиды, кодирующие белки вируса гепатита С (ВГС), – компоненты кандидатных вакцин – индуцируют слабый иммунный ответ и требуют использования адъювантов.

Цель работы – изучить адъювантную способность водного раствора фуллера C₆₀ при иммунизации мышей рекомбинантным белком NS5B (rNS5B) ВГС – РНК-зависимой РНК-полимеразой, а также плазмидой pcNS5B, экспрессирующей этот белок.

Материалы и методы. Водный раствор дисперсного фуллера (dnC₆₀) получен методом ультрафильтрации. Мышей C57BL/6 иммунизировали rNS5B подкожно, pcNS5B – внутримышечно в смеси с разными дозами dnC₆₀ трёхкратно, затем оценивали гуморальный и клеточный ответ на ВГС.

Результаты. Показано, что иммунизация мышей rNS5B в смеси с dnC₆₀ в дозах 2–50 мкг/мышь приводила к значительной индукции гуморального ответа: дозозависимый прирост титров антител IgG1 был в 7–20 раз выше. Усиления клеточного ответа к rNS5B при введении с dnC₆₀ не наблюдалось: продукция IFN-γ лимфоцитами, стимулированными *in vitro*, не увеличивалась; антитела изотипа IgG2a – маркера Th1 звена иммунного ответа – не обнаруживались. Гуморальный ответ на ДНК-иммунизацию был слабым у мышей всех групп, получавших pcNS5B. Клеточный ответ при введении плазмиды в смеси с dnC₆₀ подавлялся. Показана обратная зависимость индекса стимуляции пролиферации лимфоцитов в ответ на специфические стимуляторы *in vitro* от дозы dnC₆₀, снижение количества клеток, синтезирующих IFN-γ, в реакции ELISpot, сокращение популяции CD8⁺-лимфоцитов.

Заключение. Дисперсный фуллерен dnC₆₀ представляется весьма обещающим адъювантом для повышения иммуностимулирующей активности слабоиммуногенных белков, к которым относятся белки ВГС, включая поверхностные, важные для протективного ответа. Для повышения способности dnC₆₀ усиливать клеточный иммунный ответ на компоненты кандидатной вакцины необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: вирус гепатита С; неструктурный белок NS5B; ДНК-иммунизация; фуллерен C₆₀; адъюванты; иммунный ответ

Для цитирования: Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуев-Эллистон В.Т., Турецкий Е.А., Иванов А.В., Николаева Т.Н., Хаитов М.Р., Пронин А.В., Куц А.А. Адъювантное действие дисперсного фуллера C₆₀ на иммунный ответ против конструкций, имитирующих аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 516–526. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

Для корреспонденции: Масалова Ольга Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: ol.mas@mail.ru

Участие авторов: Масалова О.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Леснова Е.И. – проведение экспериментов; Андреев С.М. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Шершакова Н.Н. – проведение экспериментов; Козлов В.В. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи; Пермякова К.Ю. – проведение экспериментов; Демидова Н.А. – проведение экспериментов; Валуев-Эллистон В.Т. – проведение экспериментов; Турецкий Е.А. – проведение экс-

периментов; Иванов А.В. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Николаева Т.Н. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Хаитов М.Р. – редактирование статьи; Пронин А.В. – редактирование статьи; Куц А.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 10 от 07.06.2021).

Поступила 29.10.2022

Принята в печать 10.12.2022

Опубликована 30.12.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

Adjuvant effect of dispersed fullerene C₆₀ on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein

Olga V. Masalova¹, Ekaterina I. Lesnova¹, Sergey M. Andreev², Nadezda N. Shershakova², Vyacheslav V. Kozlov¹, Kristina Yu. Permyakova^{1,3}, Natalia A. Demidova¹, Vladimir T. Valuev-Elliston⁴, Evgeny A. Turetskiy^{2,5}, Alexander V. Ivanov⁴, Tatiana N. Nikolaeva¹, Musa R. Khaitov^{2,6}, Alexander V. Pronin¹, Alla A. Kushch¹

¹Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, 115522, Moscow, Russia;

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA by K.I. Skryabin», 109472, Moscow, Russia;

⁴Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia;

⁵Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia;

⁶Pirogov Russian National Research Medical University, 119997, Moscow, Russia

Introduction. A vaccine against hepatitis C has not yet been developed. Recombinant proteins and plasmids encoding hepatitis C virus (HCV) proteins, the components of candidate vaccines, induce a weak immune response and require the use of adjuvants.

The aim of the work was to study the adjuvant action of an aqueous solution of fullerene C₆₀ during immunization of mice with HCV recombinant protein NS5B (rNS5B) that is an RNA-dependent RNA polymerase, or with NS5B-encoding pcNS5B plasmid.

Materials and methods. An aqueous solution of dispersed fullerene (dnC₆₀) was obtained by ultrafiltration. C57BL/6 mice were immunized with rNS5B subcutaneously, pcNS5B – intramuscularly mixed with different doses of dnC₆₀ three times, then the humoral and cellular response to HCV was evaluated.

Results. Mice immunization with rNS5B in a mixture with dnC₆₀ at doses of 2–50 µg/mouse significantly induced humoral response: a dose-dependent increase in IgG1 antibody titers was 7–20 times higher than in the absence of fullerene. There was no increase in the cellular response to rNS5B when administered with dnC₆₀. The humoral response to DNA immunization was weak in mice of all groups receiving pcNS5B. The cellular response was suppressed when the plasmid was injected in a mixture with dnC₆₀.

Conclusions. Dispersed fullerene dnC₆₀ is a promising adjuvant for increasing the immunostimulating activity of weakly immunogenic proteins including surface and other HCV proteins, important for a protective response. Further research is needed to enhance the ability of dnC₆₀ to boost the cellular immune response to the components of the candidate vaccine.

Keywords: hepatitis C virus; nonstructural NS5B protein; DNA immunization; fullerene C₆₀; adjuvants; immune response

For citation: Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Yu., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R., Pronin A.V., Kushch A.A. Adjuvant effect of dispersed fullerene C₆₀ on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 516–526 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

For correspondence: Olga V. Masalova, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Engineering, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation; 123098, Moscow, Russia. E-mail: ol.mas@mail.ru

Information about the authors:

Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>
Lesnova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>
Andreev S.M., <https://orcid.org/0000-0001-8297-579X>
Shershakova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-6444-6499>
Kozlov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0502-4824>
Permyakova K.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3579-4416>
Demidova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1961-9789>
Valuev-Elliston V.T., <https://orcid.org/0000-0003-0365-570X>
Turetskiy E.A., <https://orcid.org/0000-0002-6822-3409>
Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5659-9679>
Nikolaeva T.N., <https://orcid.org/0000-0001-6226-7251>
Khaitov M.R., <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>
Pronin A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5266-9783>
Kushch A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Contribution: Masalova O.V. – the study concept design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Lesnova E.I. – conducting of the experiments; Andreev S.M. – conducting of the experiments, review and editing; Shershakova N.N. – conducting of the experiments; Kozlov V.V. – conducting of the experiments, analysis and interpretation of the data, review and editing; Permyakova K.Yu. – conducting of the experiments; Demidova N.A. – conducting of the experiments; Valuev-Elliston V.T. – conducting of the experiments; Turetskiy E.A. – conducting of the experiments; Ivanov A.V. – conducting of the experiments, review and editing; Nikolaeva T.N. – conducting of the experiments, review and editing; Khaitov M.R. – review and editing; Pronin A.V. – review and editing; Kushch A.A. – the study concept design, review and editing.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology (Protocol No 10 dated June 7, 2021).

Received 29 October 2022
Accepted 10 December 2022
Published 30 December 2022

Введение

Гепатит С признан одной из главных причин хронических заболеваний печени, включая терминальные стадии – цирроз и гепатокарциному. До 80% случаев острого гепатита С переходят в хроническую форму, вызывая хронический гепатит С, что объясняется повышенной частотой мутаций вируса гепатита С (ВГС), интерференцией вирусных белков с факторами врождённого и адаптивного иммунитета хозяина, образованием эскейп-вариантов ВГС, ускользающих от иммунного ответа [1].

Долгое время проблема эффективного лечения гепатита С оставалась нерешённой, так как стандартная терапия, основанная на сочетании пегилированного рекомбинантного интерферона (IFN) α и рибавирина, позволяла излечивать не более половины пациентов и сопровождалась серьёзными побочными эффектами [2]. В 2014 г. в терапии гепатита С произошёл прорыв: благодаря применению пангенотипных препаратов прямого противовирусного действия (ПППД), блокирующих вирусные ферменты NS3, NS5B и NS5A, число пациентов с устойчивым исчезновением вируса из периферической крови превысило 95% [3]. Это событие называют новой эрой в лечении гепатита С. Однако со временем выявился ряд фактов, показывающих, что точку в решении проблемы гепатита С ставить рано. Так, ПППД крайне дороги, что делает лечение малодоступным. Исследования последних лет показали, что исчезновение вируса при

действии ПППД не приводит к полной нормализации функций лимфоцитов: не восстанавливается пролиферация Т-клеток, продолжается синтез цитокинов, вызывающих воспаление и фиброз, наблюдается экспансия супрессорных клеток [4, 5]. Мало изучены отдалённые последствия блокирования вирусных ферментов, так как ВГС может оставаться в печени и клетках крови после исчезновения вирусной РНК в плазме периферической крови [6, 7]. При лечении ПППД часто отмечается реактивация вирусом других таксономических групп [8, 9]. Успешная элиминация ВГС с помощью ПППД не защищает от реинфекции.

Отсутствие вакцины – главное препятствие в контроле за гепатитом С [10]. Доказано, что эффективная вакцина должна стимулировать мощный мульти-эпитопный и функциональный клеточный иммунный ответ, а также индуцировать высокоактивные вируснейтрализующие антитела [11]. Усугубляет проблему разработки вакцин отсутствие адекватной лабораторной модели гепатита С на животных [12]. Поэтому на начальных этапах разработки вакцин используют стандартный подход, который заключается в анализе эффективности иммунного ответа, индуцированного вакцинами, в иммунокомпетентных мышах [13].

Основой для разработки вакцин служат генно-инженерные продукты, имитирующие последовательности ВГС: рекомбинантные белки, пептиды, представляющие В- и Т-клеточные эпитопы, ДНК в составе плазмид и вирусных векторов. Что касается рекомбинантных белков в качестве вакцинных пре-

паратов, то основная проблема состоит в их слабой иммуногенности, в том числе в недостаточной индукции В-клеточного ответа. При ДНК-иммунизации иммунный ответ носит в основном Т-клеточную направленность, тогда как образования антител практически не наблюдается. Несмотря на испытания многочисленных вакцин против гепатита С разного состава, ни одна из них пока не одобрена для применения, что в значительной степени связано с отсутствием высокоэффективных адъювантов [14, 15].

В связи с этим большой интерес представляют углеродсодержащие наноматериалы, в том числе фуллерены [16]. Они нетоксичны, биосовместимы; это сильные антиоксиданты, некоторые из них обладают выраженной противовоспалительной и противовирусной активностью [17–21], могут ингибировать фиброз печени и предотвращать цирроз в экспериментальной крысиной модели [22]. Эти препараты могут повышать иммуногенность за счёт комплексования иммуногена и формирования мультиплетной структуры, а также улучшения транспорта в антигенпрезентирующие клетки с дальнейшим процессингом. Например, фуллеренол – гидроксильированный фуллерен $C_{60}(OH)_{22}$ – испытывали как адъювант для иммунизации животных вирусными белками и ДНК-вакциной. Результаты показали, что такие наночастицы обладают иммуномодулирующей активностью, усиливая врождённый иммунный ответ через активацию различных Toll-подобных рецепторов дендритных клеток и макрофагов [23, 24]. В последние годы на основе легко масштабируемой зелёной технологии была разработана водорастворимая нанодисперсная форма немодифицированного фуллерена C_{60} (dnC_{60}); она проявляет противовоспалительный, противовирусный и ранозаживляющий эффекты и относится к группе нетоксичных субстанций [19, 25, 26].

Целью настоящей работы было выяснение способности водного раствора dnC_{60} оказывать иммуностимулирующее действие при введении мышам компонентов кандидатной вакцины против гепатита С – рекомбинантного белка NS5B ВГС – РНК-зависимой РНК-полимеразы, а также ДНК-конструкции, кодирующей этот белок.

Материалы и методы

Рекомбинантный белок NS5B ВГС (rNS5B) – полноразмерный белок без С-концевого гидрофобного участка, содержащего 21 аминокислотный остаток (а.о.), (2420–3011 а.о., генотип 1b) был экспрессирован в *Escherichia coli* и очищен на агарозе Ni-NTA (никель – нитрилоацетат), как описано ранее [27]. Его использовали как иммуноген при иммунизации мышей, как антиген для стимуляции Т-клеточных реакций *in vitro*, а также как сорбент в иммуноферментном анализе (ИФА) для оценки продукции антител.

Синтетические олигопептиды синтезированы в НПО «Иммунотэкс» (Белки Антитела.РФ, г. Ставрополь, Россия) с чистотой более 98%, аминокислотные последовательности приведены в **таблице**. Пептиды имитировали ВГС-специфические эпитопы цитоток-

сических лимфоцитов (CTL) и Т-хелперов 1-го типа (Th1); их использовали как стимуляторы Т-клеточных реакций *in vitro*. Поиск эпитопов проводили в соответствии с картированными последовательностями [28–32] с использованием ресурса Immune Epitope Database Analysis Resource¹.

Плазмида pcNS5B, кодирующая полноразмерный белок NS5B ВГС, получена на основе вектора pcDNA3.1(+ (Invitrogen, США) и описана ранее [33, 34].

Дисперсный фуллерен dnC_{60} . Водный раствор фуллерена (dnC_{60}) был получен ультрафильтрационным методом из высокоочищенного фуллерена (99,95%, «НеоТекПродакт», Россия), как описано ранее [19, 25]. Этот метод обеспечивает высокий выход фуллерена C_{60} без использования ультразвука и нагревания, при этом гидродинамический размер частиц, определённый методом динамического светорассеяния, составляет около 200 нм. В настоящей работе исходная концентрация стерильного раствора была 1 мг/мл. Дозы рассчитывали с учётом весового содержания C_{60} , определённого по оптической плотности раствора при 340 нм (коэффициент молярной экстинкции 50 200).

Мыши. Для экспериментов *in vivo* использовали самок мышей инбредной линии C57BL/6 (H-2^b) в возрасте 6–8 недель (средний вес 20 ± 3 г), полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая».

Иммунизация мышей. Проводили две серии экспериментов по испытанию иммуностимулирующей активности dnC_{60} на модели рекомбинантного белка rNS5B и ДНК-конструкции pcNS5B. Белок rNS5B вводили мышам подкожно в корень хвоста в дозе 4 мкг/мышь либо в физиологическом растворе (ф/р), либо в смеси с dnC_{60} в дозах 2, 10 и 50 мкг/мышь. Плазмиду pcNS5B вводили в дозе 100 мкг/мышь внутримышечно в четырёхглавую мышцу бедра задних лап, в ф/р или в смеси с dnC_{60} в дозах 5 и 25 мкг/мышь. Контрольным группам мышей вводили ф/р. Иммунизацию проводили трёхкратно с интервалом 2 недели, через 7–9 дней после последней инъекции учитывали иммунный ответ индивидуально для каждой мыши ($n = 8$ в каждой группе).

Оценка иммунного ответа, гуморальный ответ. Активность взаимодействия антител к белку rNS5B ВГС в сыворотках крови мышей определяли методом непрямого ИФА, как описано ранее [33]. 96-луночные планшеты сенсibilizировали rNS5B в фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 (PBS), в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи при комнатной температуре. В качестве вторичных использовали антитела к иммуноглобулинам мышши изотипов IgG1 и IgG2a, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), в качестве субстрата пероксидазы – тетраметилбензидин (Sigma, США); оптическую плотность измеряли при 450 нм. За титр сывороток в ИФА принимали предельное разведение сыворотки

¹T Cell Epitope Prediction Tools. Available from: <http://tools.immuneepitope.org/main/tcell/>.

крови, при котором значение оптической плотности при A_{450} в 2 раза превышало значение для контрольного образца (сыворотка крови неиммунизированных мышей).

Анализ пролиферации лимфоцитов иммунизированных мышей проводили *in vitro* по включению в лимфоциты [3H]-тимидина. Для получения лимфоцитов селезенки диспергировали, клеточные суспензии процеживали через ситочки с размером пор 100 мкм (BD Falcon Cell Strainers, США), дважды отмывали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). Лимфоциты помещали в 96-луночные культуральные панели по 5×10^5 клеток в лунку в среде RPMI-1640, содержащую 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМ глутамин, 4,5 г/л глюкозы, 50 мкг/мл гентамицина, 0,2 ед/мл инсулина. К клеткам добавляли стимулятор – рекомбинантный белок NS5B в конечной концентрации 1 мкг/мл и культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 5 сут. Культуральные жидкости отбирали для анализа цитокинов, в клетки добавляли свежую среду с [3H]-тимидином (1 мКи/лунка) (ФГБУ «Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт» РАН). Через 18 ч радиоактивность в клетках измеряли с помощью β -счетчика MicroBeta2 (PerkinElmer, США). Рассчитывали индекс стимуляции пролиферации (ИСП) как отношение радиоактивности (в имп/мин) в лунках со стимуляторами к радиоактивности в лунках со средой.

Измерение концентрации IFN- γ в культуральных жидкостях, полученных после стимуляции лимфоцитов, проводили методом ИФА с помощью наборов Mouse IFN- γ ELISA development kit (HRP) (Mabtech, Швеция) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию цитокина определяли по калибровочным кривым стандартных образцов. Предел чувствительности для IFN- γ составлял 2 пг/мл.

Определение количества IFN- γ -секретирующих клеток проводили методом ELISpot с использованием тест-системы Mouse IFN- γ ELISpotPLUS kit (ALP

(Mabtech, Швеция). Изолированные спленоциты (4×10^5 клеток в лунке) инкубировали с иммобилизованными на 96-луночных планшетах антителами к IFN- γ мыши течение 2,5 сут при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в присутствии стимуляторов – rNS5B (1 мкг/мл) и пептидов (1 и 5 мкг/мл в двух повторах, данные усредняли). Окрашивание клеток проводили в соответствии с инструкцией. Окрашенные пятна (spots, споты) детектировали визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (ОАО «ЛЗОС», Россия). Результаты выражали как разницу в количестве спотов на 10^6 клеток в лунках в присутствии стимуляторов и в контрольных лунках без стимуляторов (со средой).

Определение фенотипа лимфоцитов методом проточной цитометрии. Лимфоциты, выделенные из селезенок иммунизированных мышей, анализировали методом проточной цитометрии с использованием меченных флуорохромами антител к кластерам дифференцировки CD4 и CD8 (BD Biosciences, США). Окрашивание клеток (10^6 клеток/проба) проводили по стандартной методике, рекомендованной производителем. Измерения выполняли на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (США), результаты анализировали с помощью программы BD FACSDiva v.6.1.3 (BD Biosciences, США).

Для статистической обработки результатов использовали программы Statistica 8.0 и GraphPad Prism 7. Данные представляли как среднее \pm стандартное отклонение. Для сравнения параметрических количественных данных использовали t-test (критерий Стьюдента), непараметрических – U-test (критерий Манна–Уитни). Значения $p < 0,05$ принимались как статистически значимые.

Результаты

В первой серии экспериментов изучали способность dnC_{60} в дозах 2, 10 и 50 мкг/мышь проявлять адьювантные свойства при иммунизации рекомби-

Таблица. Характеристика синтетических олигопептидов из региона белка NS5B вируса гепатита С

Table. Characteristics of synthetic oligopeptides from hepatitis C virus NS5B protein

Обозначение Designation	Позиция аминокислотных остатков Amino acid positions	Последовательность Sequence	Характеристика эпитопа Epitope characteristics	Источник Reference
p1	2726–2733	AGLQDCTM	CTL, синтез IFN- γ CTL, IFN- γ release	N. Himoudi и соавт. [28], S. Vertuani и соавт. [32]
p2	2555–2563	TTIMAKNEV	CTL, консервативный CTL, conservative	A. Ikram и соавт. [29]
p3	2576–2584	ARLIVFPDL	CTL, протективный, синтез IFN- γ CTL, protective, IFN- γ release	N. Himoudi и соавт. [28]
p4	2594–2601	LYDVVSKL	CTL, синтез IFN- γ CTL, IFN- γ release	N. Himoudi и соавт. [28], A.C. Tan и соавт. [31]
p5	2820–2827	RHTPVNSW	CTL, протективный CTL, protective	K. Nitschke и соавт. [30]
p6	2423–2430	SYSWTGAL	Th1	A. Ikram и соавт. [29]

нантным белком rNS5B ВГС. Среднегеометрический титр антител IgG1 к NS5B, введённого в ф/р (группа 1), составил $1 : 10^5$ (рис. 1 а), антител изотипа IgG2a обнаружено не было (титр $< 1 : 100$). У мышей, которых иммунизировали белком rNS5B ВГС в смеси с dnC₆₀ (группы 2–4), был зарегистрирован дозозависимый эффект увеличения уровня антител IgG1 в 7, 10 и 20 раз соответственно ($p < 0,05$) (рис. 1 а, б); антитела изотипа IgG2a не выявлялись.

Клеточный ответ оценивали по пролиферации лимфоцитов *in vitro* и секреции ими IFN- γ в ответ на

стимуляцию rNS5B. Оба показателя были на низком уровне, варьировали среди индивидуальных мышей, статистически значимо не различаясь как между группами, которым вводили рекомбинантный белок, так и с контрольной группой, которая получала только ф/р (рис. 2).

При проведении экспериментов *in vivo* не было зарегистрировано ни падежа иммунизированных мышей, ни потери ими массы тела. Поведенческие реакции у животных контрольной и опытных групп не различались. Однако при вскрытии животных

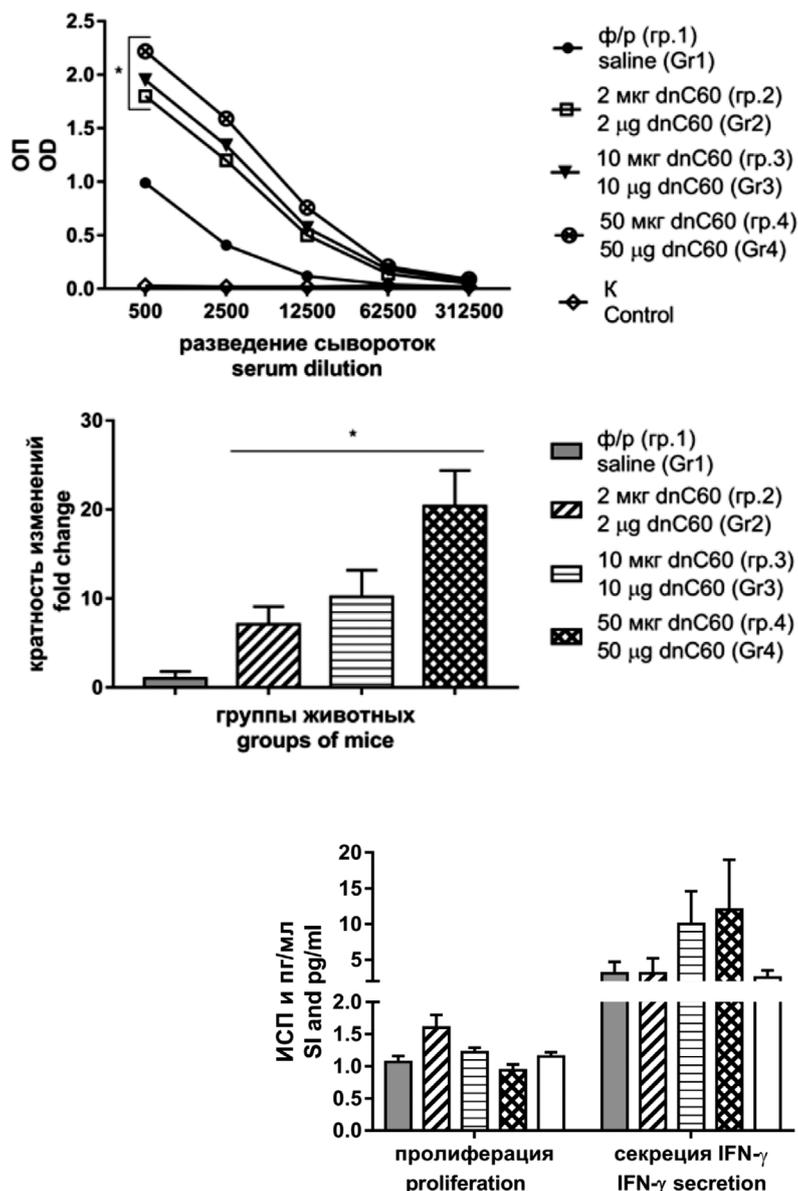


Рис. 1. Активность антител изотипа IgG1 к рекомбинантному белку rNS5B вируса гепатита С в сыворотках мышей, иммунизированных rNS5B в смеси с дисперсным фуллереном: а – кривые титрования сывороток в ИФА; б – кратность увеличения титров антител в группах мышей, за единицу принят титр антител в группе 1 ($1 : 10^5$). ОП – оптическая плотность при 450 нм.

*Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой 1, которой rNS5B вводили с физиологическим раствором.

Fig. 1. Activity of IgG1 antibodies to the recombinant HCV rNS5B protein in the sera of mice immunized with rNS5B in a mixture with dispersed fullerene: а – sera titration curves in ELISA; б – the increase of antibody titers in groups of mice, the antibody titer in group 1 ($1 : 10^5$) was taken as a unit. OD – optical density at 450 nm.

* $p < 0.05$ compared to group 1, to which rNS5B was administered with saline solution (saline).

Рис. 2. Клеточный ответ к рекомбинантному белку NS5B в спленocyтaх мышей, иммунизированных rNS5B в смеси с дисперсным фуллереном. Пролиферативный ответ лимфоцитов выражен в виде индекса стимуляции пролиферации, секреция IFN- γ – концентрация в пг/мл; индекс стимуляции пролиферации рассчитывали как отношение радиоактивности (в имп/мин) в лунках со стимуляторами к радиоактивности в лунках со средой. Контрольной группе вводили только физиологический раствор.

Fig. 2. Cellular response to recombinant NS5B protein in splenocytes of mice immunized with rNS5B in a mixture with dispersed fullerene. The lymphocyte proliferation is expressed as a stimulation index (SI); IFN- γ secretion is a cytokine concentration in culture fluids by ELISA, in pg/ml; SI was calculated as the ratio of radioactivity (in cpm/min) in wells with stimulants to radioactivity in wells with medium alone. The control group (Control) was administered saline alone.

в группе 4, получивших 50 мкг dnC₆₀, наблюдались жировые отложения на внутренних органах – печени, желудке, селезёнке. При этом органы были слегка увеличены в размерах, нормального цвета. Можно судить о первой (начальной) степени ожирения. Ткань печени и почек при визуальной оценке не была изменена. В связи с этим в следующих экспериментах мы вдвое уменьшили максимально использованную дозу dnC₆₀.

Изучение способности dnC₆₀ проявлять стимулирующую активность проводили при иммунизации плазмидой, кодирующей ген NS5B, фуллерен вводили в дозах 5 и 25 мкг/мышь. Гуморальный ответ на ДНК-иммунизацию был слабым у мышей всех групп, получавших pcNS5B: титры антител к целевому белку обоих изотипов не превышали 1 : 100.

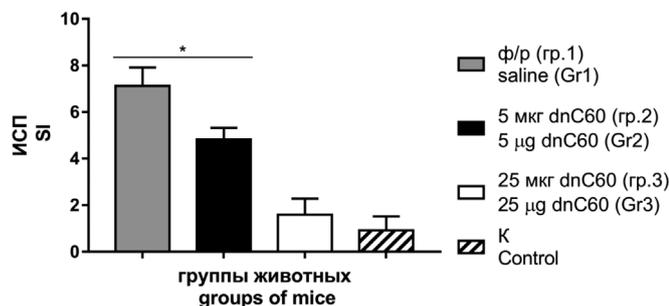


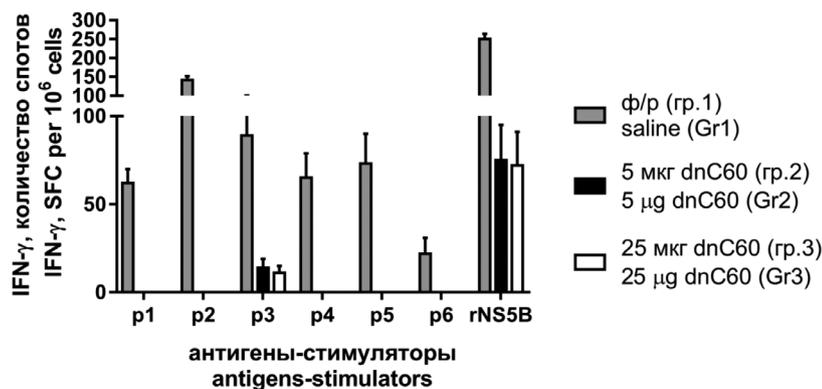
Рис. 3. Снижение пролиферативной активности *in vitro* спленоцитов мышей, иммунизированных плазмидой pcNS5B с дисперсным фуллереном, в ответ на стимуляцию белком гNS5B. Индекс стимуляции пролиферации рассчитывали как отношение радиоактивности (в имп/мин) в лунках со стимулятором (гNS5B) к радиоактивности в лунках со средой.

*Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, которой вводили только физиологический раствор.

Fig. 3. Reduction of lymphocyte proliferation of mice immunized with pcNS5B plasmid with dispersed fullerene in response to *in vitro* stimulation by гNS5B protein.

The stimulation index (SI) was calculated as the ratio of radioactivity (in cpm/min) in wells with stimulants to radioactivity in wells with medium alone.

* $p < 0.05$ compared to the control group (Control), which was administered saline alone.



В процессе оценки Т-клеточного иммунного ответа показано, что при стимуляции спленоцитов, полученных от мышей, иммунизированных pcNS5B, была выявлена активная пролиферация лимфоцитов в ответ на гNS5B. При этом ИСП у мышей группы 1 достигал 8 (рис. 3). При иммунизации плазмидой в смеси с dnC₆₀ наблюдалась обратная зависимость показателя ИСП от дозы dnC₆₀.

Анализ количества лимфоцитов, синтезирующих IFN-γ, проводили *in vitro* методом ELISpot. В качестве стимуляторов клеток использовали гNS5B и 6 пептидов, имитирующих Т-клеточные эпитопы белка. Как показано на рис. 4, все антигены вызывали формирование спотов в группе 1, в группах 2 и 3 – только один из пептидов и гNS5B, но в значительно меньшем количестве.

Подсчёт популяций Т-клеток в селезёнках иммунизированных мышей проводили методом проточной цитометрии. Установлено статистически значимое снижение ($p < 0,0001$) Th/CD4⁺ во всех экспериментальных группах, получивших плазмиду, по сравнению с контрольной группой, которой вводили только ф/р, показатели не зависели от концентрации dnC₆₀ (рис. 5). В случае CTL/CD8⁺ наблюдалась другая картина: данная популяция клеток была снижена только в группах 2 и 3, иммунизированных с добавлением dnC₆₀ ($p < 0,0001$).

Обсуждение

В качестве кандидата для включения в вакцину был выбран неструктурный белок NS5B ВГС, так как это один из важнейших ферментов вируса и мишень для действия ряда ПППД; в нём картировано самое большое число, по сравнению с другими вирусными белками, консервативных Т-клеточных эпитопов, важных для индукции эффективного иммунного ответа [35]. Результаты работы показали высокую эффективность водного раствора дисперсного фуллерена в стимуляции гуморального ответа на белок NSB: при трёхкратном введении прирост титров антител в зависимости от дозы dnC₆₀ был в 7–20 раз выше. Ранее на модели рекомбинантного белка NS4 ВГС мы показали, что водорастворимые производные фуллерена C₆₀ с глюкозаминилмурамилдипептидом и натриевой со-

Рис. 4. Различия в количестве IFN-γ-синтезирующих клеток, полученных от мышей, иммунизированных плазмидой pcNS5B в присутствии/отсутствии dnC₆₀. Результаты представлены как разница в количестве спотов на 10⁶ клеток в лунках со стимуляторами и в контрольных лунках без стимуляторов (со средой); p1–p6 – пептиды, перечисленные в таблице, представляющие последовательности вируса гепатита С.

Fig. 4. Differences in the number of IFN-γ-synthesizing cells obtained from mice immunized with pcNS5B plasmid in the presence/absence of dnC₆₀. The results are presented as a difference in the number of spot-forming cells (SFC) per 10⁶ cells in wells with stimulants and in control wells without stimulants (with medium alone); p1–p6 are peptides listed in Table representing HCV sequences.

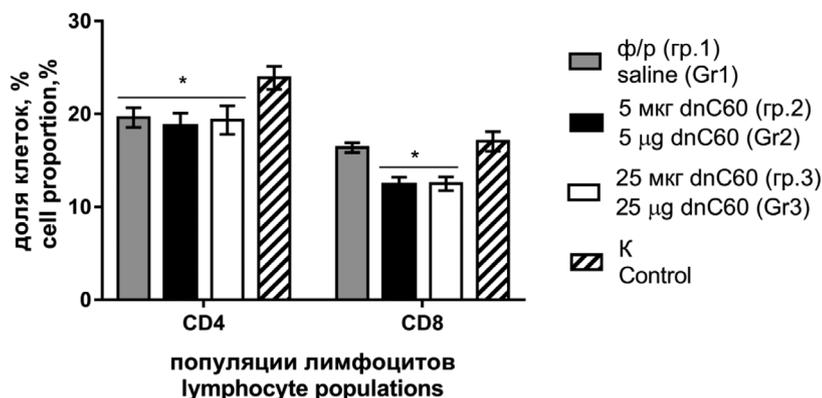


Рис. 5. Определение доли лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ в группах мышей, иммунизированных плазмидой pcNS5B в сочетании с дисперсным фуллереном, методом проточной цитометрии.

*Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, которой вводили только физиологический раствор.

Fig. 5. Determination of the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the spleen of mice immunized with pcNS5B plasmid in combination with dispersed fullerene by flow cytometry.

* $p < 0.05$ compared to the control group (Control), which was administered saline alone.

лью аминокaproновой кислоты на порядок усиливали гуморальный ответ, при этом антиген вводился в дозе в 5 раз большей (20 мкг/мышь) по сравнению с использованной в настоящей работе (4 мкг). Эти препараты, однако, не были эффективны при инъекции малых доз антигена и стимулировали иммунный ответ только после 4–5 иммунизаций [36]. Следует также отметить, что в работе китайских учёных применение C₆₀(OH)₂₂ в сочетании с тремя белками ВГС повышало гуморальный ответ только к одному из них, притом менее значительно (в 4 раза) и после 4 иммунизаций [23].

Введение белка подкожно с максимально использованной дозой dnC₆₀ 50 мкг/мышь вызывало некоторые побочные эффекты. Ранее показано, что при однократном введении фуллерена C₆₀ независимо от пути введения (внутривенный, внутрибрюшинный, интрагастральный) препарат не обладает острым токсическим эффектом в большом диапазоне доз, вплоть до 2700 мкг/мышь [37]. Острой токсичности мы также не наблюдали; возможно, жировые отложения на внутренних органах могут объясняться неоднократной (трёхкратной) иммунизацией, а также путём введения препарата. Интересно, что при изучении противоаллергических свойств dnC₆₀ на модели atopического дерматита у мышей показаны различные эффекты при накожном и подкожном введении препарата: только при накожной экспликации увеличивалась выработка ключевых цитокинов Th1-профиля интерлейкина (IL) 12 и IFN-γ; в большей степени повышалась экспрессия маркера активации Т-регуляторных клеток Foxp3, блокирующих клеточный иммунный ответ [21].

Клеточный ответ к rNS5B при иммунизации белком с dnC₆₀ не усиливался, о чём свидетельствует отсутствие значимого увеличения пролиферации и продукции IFN-γ стимулированными лимфоцитами *in vitro*, а также антител изотипа IgG2a – маркера Th1 звена иммунного ответа. Для изучения влияния дисперсного фуллерена на клеточный ответ при ДНК-иммунизации мышей иммунизировали плазмидой pcNS5B совместно с dnC₆₀. Установлено, что внутримышечная иммунизация плазмидой в физиологическом растворе вызывает на достаточно высоком уровне пролифера-

цию лимфоцитов в ответ на специфический антиген и синтез IFN-γ не только к rNS5B, но и к ряду пептидов – эпитопов CTL и Th1. Оказалось, что добавление dnC₆₀ дозозависимо ингибирует клеточный ответ. В группах мышей, получивших плазмиду с дисперсным фуллереном, снижалась доля CD8⁺-лимфоцитов. Доля CD4⁺-лимфоцитов также была снижена по сравнению с контрольными мышами, но не с группой, получившей pcNS5B без dnC₆₀.

Полученные данные согласуются с опубликованными ранее результатами о противовоспалительной активности фуллерена и дополняют их. Так, показано, что некоторые производные фуллерена C₆₀ ингибируют активацию одного из основных провоспалительных транскрипционных факторов NF-κB [38]. С использованием экспериментальной модели на мышах в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) установлено, что введение dnC₆₀ ингибирует продукцию цитокинов Th1-, Th2- и Th17-профиля [39]. Аналогичные данные получены японскими исследователями: водная наносуспензия кристаллического фуллерена частично подавляла ГЗТ-опосредованное воспаление, при этом также выявлено снижение секреции IL-6, IL-17 и относительный рост популяции Т-регуляторных клеток [40].

Заключение

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что препарат dnC₆₀ представляется весьма обещающим адьювантом для повышения иммуногенности слабоиммуногенных белков, к которым относятся белки ВГС, включая поверхностные, важные для протективного ответа. Однако для повышения способности dnC₆₀ усиливать клеточный иммунный ответ на компоненты кандидатной вакцины против гепатита С необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>.
2. Pawlotsky J.M. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 169–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00005-6>

3. Spearman C.W., Dusheiko G.M., Hellard M., Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet*. 2019; 394(10207): 1451–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32320-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32320-7)
4. Osuch S., Metzner K.J., Caraballo Cortes K. Reversal of T cell exhaustion in chronic HCV infection. *Viruses*. 2020; 12(8): 799. <https://doi.org/10.3390/v12080799>
5. Telatin V., Nicoli F., Frasson C., Menegotto N., Barbaro F., Castelli E., et al. In chronic hepatitis C infection, myeloid-derived suppressor cell accumulation and T cell dysfunctions revert partially and late after successful direct-acting antiviral treatment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 190. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00190>
6. Elmasry S., Wadhwa S., Bang B.R., Cook L., Chopra S., Kanel G., et al. Detection of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved a sustained virologic response to direct-acting antiviral agents for recurrent infection after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2017; 152(3): 550-53.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.002>
7. Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
8. Holmes J.A., Yu M.L., Chung R.T. Hepatitis B reactivation during or after direct acting antiviral therapy – implication for susceptible individuals. *Expert Opin. Drug Saf.* 2017; 16(6): 651–72. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1325869>
9. Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>
10. Verma R., Khanna P., Chawla S. Hepatitis C vaccine. Need of the hour. *Hum. Vacc. Immunother.* 2014; 10(7): 1927–9. <https://doi.org/10.4161/hv.29033>
11. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
12. Ploss A., Kapoor A. Animal models of hepatitis C virus infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(5): a036970. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036970>
13. Ahlén G., Frelin L. Methods to evaluate novel hepatitis C virus vaccines. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1403: 221–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_11
14. Andrianov A.K., Fuerst T.R. Immunopotentiating and delivery systems for HCV vaccines. *Viruses*. 2021; 13(6): 981. <https://doi.org/10.3390/v13060981>
15. Sepulveda-Crespo D., Resino S., Martinez I. Innate immune response against hepatitis C virus: targets for vaccine adjuvants. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(2): 313. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020313>
16. Gaur M., Misra C., Yadav A.B., Swaroop S., Maolmhuaidh F.O., Bechelany M., et al. Biomedical applications of carbon nanomaterials: fullerenes, quantum dots, nanotubes, nanofibers, and graphene. *Materials (Basel)*. 2021; 14(20): 5978. <https://doi.org/10.3390/ma14205978>
17. Barzegar A., Naghizadeh E., Zakariazadeh M., Azamat J. Molecular dynamics simulation study of the HIV-1 protease inhibit ion using fullerene and new fullerene derivatives of carbon nanostructures. *Mini Rev. Med. Chem.* 2017; 17(7): 633–47. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160609080157>
18. Hurmach V., Platonov M., Prylutska S., Klestova Z., Cherepanov V., Prylutsky Y., et al. Anticoronavirus activity of water-soluble pristine C60 fullerenes: in vitro and in silico screenings. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1352: 159–72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5_10
19. Klimova R., Andreev S., Momotyuk E., Demidova N., Fedorova N., Chernoryzh Y., et al. Aqueous fullerene C60 solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2019; 28(6): 487–99. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2019.1706495>
20. Reina G., Peng S., Jacquemin L., Andrade A.F., Bianco A. Hard nanomaterials in time of viral pandemics. *ACS nano*. 2020; 14(8): 9364–88. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04117>
21. Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J. Nanobiotechnology*. 2016; 14: 8. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0159-z>
22. Kuznietsova H., Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., et al. Water-soluble pristine C60 fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 8061246. <https://doi.org/10.1155/2020/8061246>
23. Liu J., Feng X., Chen Z., Yang X., Shen Z., Guo M., et al. The adjuvant effect of C60(OH)22 nanoparticles promoting both humoral and cellular immune responses to HCV recombinant proteins. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019; 97: 753–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.088>
24. Xu L., Liu Y., Chen Z., Li W., Liu Y., Wang L., et al. Morphologically virus-like fullereneol nanoparticles act as the dual-functional nanoadjuvant for HIV-1 vaccine. *Adv. Mater.* 2013; 25: 5928–36. <https://doi.org/10.1002/adma.201300583>
25. Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev I., et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2015; 23(9): 792–800. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2014.998758>
26. Shershakova N.N., Andreev S.M., Tomchuk A.A., Makarova E.A., Nikonova A.A., Turetskiy E.A., et al. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by “green technology”. *Nanomedicine*. 2023; 47: 102619. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102619>
27. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
28. Himoudi N., Abraham J.D., Fournillier A., Lone Y.C., Joubert A., Op De Beeck A., et al. Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12735–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12735-12746.2002>
29. Ikram A., Zaheer T., Awan F.M., Obaid A., Naz A., Hanif R., et al. Exploring NS3/4A, NS5A and NS5B proteins to design conserved subunit multi-epitope vaccine against HCV utilizing immunoinformatics approaches. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 16107. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34254-5>
30. Nitschke K., Barriga A., Schmidt J., Timm J., Viazov S., Kuntzen T., et al. HLA-B*27 subtype specificity determines targeting and viral evolution of a hepatitis C virus-specific CD8+ T cell epitope. *J. Hepatol.* 2014; 60(1): 22–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.08.009>
31. Tan A.C., Eriksson E.M., Kedzierska K., Deliyannis G., Valkenburg S.A., Zeng W., et al. Polyfunctional CD8(+) T cells are associated with the vaccination-induced control of a novel recombinant influenza virus expressing an HCV epitope. *Antiviral Res.* 2012; 94(2): 168–78. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.009>
32. Vertuani S., Bazzaro M., Gualandi G., Micheletti F., Marastoni M., Fortini C., et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32(1): 144–54. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200201\)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200201)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X)
33. Масалова О.В., Леснова Е.И., Иванов А.В., Пичугин А.В., Пермьякова К.Ю., Смирнова О.А. и др. Сравнительный анализ иммунного ответа на ДНК-конструкции, кодирующие неструктурные белки вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(2): 21–8.
34. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isagulians M.G. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024957>
35. Rao X., Hoof I., van Baarle D., Kesmir C., Textor J. HLA preferences for conserved epitopes: a potential mechanism for hepatitis C clearance. *Front. Immunol.* 2015; 6: 552. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00552>
36. Масалова О.В., Шепелев А.В., Атанадзе С.Н., Парнес З.Н., Романова В.С., Вольпина О.М. и др. Иммуностимулирующее действие водорастворимых производных фуллерепа – перспектив-

ных адъювантов для вакцин нового поколения. Доклады РАН. 1999; 369(3): 411–3.

37. Шершакова Н.Н., Барабошкина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю. и др. Отсутствие острой токсичности у водного раствора фуллерена C₆₀. *Immunologiya*. 2016; 37(6): 325–9. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-325-329>

38. Funakoshi-Tago M., Miyagawa Y., Ueda F., Mashino T., Moriwaki Y., Tago K., et al. A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF-kappaB activation. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 40: 254–64. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.031>

39. Башкатова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Изучение модулирующей активности производных фуллерена C60 на реакцию гиперчувствительности замедленного типа. *Физиология и патология иммунной системы*. 2012; 16(2): 17–27.

40. Yamashita K., Sakai M., Takemoto N., Tsukimoto M., Uchida K., Yajima H., et al. Attenuation of delayed-type hypersensitivity by fullerene treatment. *Toxicology*. 2009; 261(1-2): 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.034>

REFERENCES

- Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>.
- Pawlotsky J.M. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 169–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00005-6>
- Spearman C.W., Dusheiko G.M., Hellard M., Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet*. 2019; 394(10207): 1451–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32320-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32320-7)
- Osuch S., Metzner K.J., Caraballo Cortes K. Reversal of T cell exhaustion in chronic HCV infection. *Viruses*. 2020; 12(8): 799. <https://doi.org/10.3390/v12080799>
- Telatin V., Nicoli F., Frasson C., Menegotto N., Barbaro F., Castelli E., et al. In chronic hepatitis C infection, myeloid-derived suppressor cell accumulation and T cell dysfunctions revert partially and late after successful direct-acting antiviral treatment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 190. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00190>
- Elmasry S., Wadhwa S., Bang B.R., Cook L., Chopra S., Kanel G., et al. Detection of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved a sustained virologic response to direct-acting antiviral agents for recurrent infection after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2017; 152(3): 550–53.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.002>
- Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
- Holmes J.A., Yu M.L., Chung R.T. Hepatitis B reactivation during or after direct acting antiviral therapy – implication for susceptible individuals. *Expert Opin. Drug Saf.* 2017; 16(6): 651–72. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1325869>
- Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>
- Verma R., Khanna P., Chawla S. Hepatitis C vaccine. Need of the hour. *Hum. Vacc. Immunother.* 2014; 10(7): 1927–9. <https://doi.org/10.4161/hv.29033>
- Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
- Ploss A., Kapoor A. Animal models of hepatitis C virus infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(5): a036970. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036970>
- Ahlén G., Frelin L. Methods to evaluate novel hepatitis C virus vaccines. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1403: 221–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_11
- Andrianov A.K., Fuerst T.R. Immunopotentiating and delivery systems for HCV vaccines. *Viruses*. 2021; 13(6): 981. <https://doi.org/10.3390/v13060981>
- Sepulveda-Crespo D., Resino S., Martinez I. Innate immune response against hepatitis C virus: targets for vaccine adjuvants. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(2): 313. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020313>
- Gaur M., Misra C., Yadav A.B., Swaroop S., Maolmhuaidh F.O., Bechelany M., et al. Biomedical applications of carbon nanomaterials: fullerenes, quantum dots, nanotubes, nanofibers, and graphene. *Materials (Basel)*. 2021; 14(20): 5978. <https://doi.org/10.3390/ma14205978>
- Barzegar A., Naghizadeh E., Zakariazadeh M., Azamat J. Molecular dynamics simulation study of the HIV-1 protease inhibit ion using fullerene and new fullerene derivatives of carbon nanostructures. *Mini Rev. Med. Chem.* 2017; 17(7): 633–47. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160609080157>
- Hurmach V., Platonov M., Prylutska S., Klestova Z., Cherepanov V., Prylutsky Y., et al. Anticoronavirus activity of water-soluble pristine C60 fullerenes: in vitro and in silico screenings. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1352: 159–72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5_10
- Klimova R., Andreev S., Momotyuk E., Demidova N., Fedorova N., Chernoryzh Y., et al. Aqueous fullerene C60 solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2019; 28(6): 487–99. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2019.1706495>
- Reina G., Peng S., Jacquemin L., Andrade A.F., Bianco A. Hard nanomaterials in time of viral pandemics. *ACS nano*. 2020; 14(8): 9364–88. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04117>
- Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyschnikov O., et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J. Nanobiotechnology*. 2016; 14: 8. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0159-z>
- Kuznietsova H., Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., et al. Water-soluble pristine C60 fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 8061246. <https://doi.org/10.1155/2020/8061246>
- Liu J., Feng X., Chen Z., Yang X., Shen Z., Guo M., et al. The adjuvant effect of C60(OH)₂₂ nanoparticles promoting both humoral and cellular immune responses to HCV recombinant proteins. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019; 97: 753–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.088>
- Xu L., Liu Y., Chen Z., Li W., Liu Y., Wang L., et al. Morphologically virus-like fullereneol nanoparticles act as the dual-functional nanoadjuvant for HIV-1 vaccine. *Adv. Mater.* 2013; 25: 5928–36. <https://doi.org/10.1002/adma.201300583>
- Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev I., et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2015; 23(9): 792–800. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2014.998758>
- Shershakova N.N., Andreev S.M., Tomchuk A.A., Makarova E.A., Nikonova A.A., Turetskiy E.A., et al. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by “green technology”. *Nanomedicine*. 2023; 47: 102619. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102619>
- Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
- Himoudi N., Abraham J.D., Fournillier A., Lone Y.C., Joubert A., Op De Beeck A., et al. Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12735–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12735-12746.2002>
- Ikram A., Zaheer T., Awan F.M., Obaid A., Naz A., Hanif R., et al. Exploring NS3/4A, NS5A and NS5B proteins to design conserved subunit multi-epitope vaccine against HCV utilizing immunoinformatics approaches. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 16107. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34254-5>
- Nitschke K., Barriga A., Schmidt J., Timm J., Viazov S., Kuntzen T., et al. HLA-B*27 subtype specificity determines targeting and viral evolution of a hepatitis C virus-specific CD8+ T cell epitope. *J. Hepatol.* 2014; 60(1): 22–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.08.009>
- Tan A.C., Eriksson E.M., Kedzierska K., Deliyannis G., Valkenburg S.A., Zeng W., et al. Polyfunctional CD8(+) T

- cells are associated with the vaccination-induced control of a novel recombinant influenza virus expressing an HCV epitope. *Antiviral Res.* 2012; 94(2): 168–78. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.009>
32. Vertuani S., Bazzaro M., Gualandi G., Micheletti F., Marastoni M., Fortini C., et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32(1): 144–54. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200201\)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200201)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X).
 33. Masalova O.V., Lesnova E.I., Ivanov A.V., Pichugin A.V., Permyakova K.Yu., Smirnova O.A., et al. Comparative analysis of the immune response to DNA constructions encoding hepatitis C virus nonstructural proteins. *Voprosy virusologii.* 2013; 58(2): 21–8. (in Russian)
 34. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isagulians M.G. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One.* 2011; 6(9): e24957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024957>
 35. Rao X., Hoof I., van Baarle D., Kesmir C., Textor J. HLA preferences for conserved epitopes: a potential mechanism for hepatitis C clearance. *Front. Immunol.* 2015; 6: 552. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00552>
 36. Masalova O.V., Shepelev A.V., Atanadze S.N., Parnes Z.N., Romanova V.S., Vol'pina O.M., et al. Immunostimulating effect of water-soluble fullerene derivatives--perspective adjuvants for a new generation of vaccine. *Doklady RAN.* 1999; 369(3): 411–3. (in Russian)
 37. Shershakova N.N., Baraboshkina E.N., Andreev S.M., Shabanova D.D., Smirnov V.V., Kamyshnikov O.Yu., et al. Fullerene C60 aqueous solution does not show acute toxicity. *Immunologiya.* 2016; 37(6): 325–9. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-325-329> (in Russian)
 38. Funakoshi-Tago M., Miyagawa Y., Ueda F., Mashino T., Moriwaki Y., Tago K., et al. A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF-kappaB activation. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 40: 254–64. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.031>
 39. Bashkatova E.N., Andreev S.M., Shershakova N.N., Babakhin A.A., Shilovskiy I.P., Khaitov M.R. Study of modulating effects of fullerene [C60] adducts on the reaction of delayed-type hypersensitivity. *Fiziologiya i patologiya immunnoy sistemy.* 2012; 16(2): 17–27. (in Russian)
 40. Yamashita K., Sakai M., Takemoto N., Tsukimoto M., Uchida K., Yajima H., et al. Attenuation of delayed-type hypersensitivity by fullerene treatment. *Toxicology.* 2009; 261(1-2): 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.034>