

А.Г.АБДУЛИМЕДЖИДОВА, О.В.МАСАЛОВА, С.Н. АТАНАДЗЕ, Т.И. УЛАНОВА, А.Н. БУРКОВ,  
Ю.Е. ХУДЯКОВ, Н. FIELDS, А.А. КУЩ

*Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва;  
ООО «НПО "Диагностические системы", Нижний Новгород; Россия  
Отдел гепатитов Центра по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, США*

## **ХАРАКТЕРИСТИКА ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ NS3 ВИРУСА ГЕПАТИТА С**

Рекомбинантный белок (pNS3), содержащий аминокислотные последовательности геликазного участка (1356-1459 а.о.) неструктурного белка NS3 вируса гепатита С (ВГС) экспрессирован в клетках *E. coli* и использован для иммунизации мышей BALB/c. С помощью гибридомной технологии получены 7 гибридом, продуцирующих МКА, взаимодействующие с белком pNS3 в иммунологических реакциях (ИФА и иммуноблот). Показано, что МКА выявляют 5 индивидуальных эпитопов на геликазном участке белка pNS3, 4 из которых являются конформационно-зависимыми и 1 - прерывистым (дискретным). Все МКА конкурировали с антителами из сывороток ВГС-инфицированных лиц за связывание с pNS3. Это позволяет предположить, что полученные МКА способны распознавать эпитопы натурального белка NS3 ВГС.

*Ключевые слова: вирус гепатита С, неструктурный белок NS3, моноклональные антитела, антигенные детерминанты*

Recombinant protein rNS3 imitating helicase region (1356-1459 amino acid residues) of hepatitis C virus (HCV) was expressed in *E. coli* cells and used for BALB/c mice immunization. Seven hybridoma clones producing monoclonal antibodies (MAbs) to rNS3 were obtained. All MAbs reacted in ELISA with NS3 protein from Murex anti-HCV Version III and in immunoblotting from RIBA 3. These MAbs detect 5 individual epitopes, 4 of which were conformational and 1 discontinuous. All MAbs could compete for rNS3 binding with serum antibodies from patients with chronic hepatitis C, which suggests that these MAbs can recognize the natural HCV NS3 protein.

*Key words: hepatitis C virus, nonstructural protein NS3, monoclonal antibodies, antigenic determinants*

Геном вируса гепатита С (ВГС) кодирует несколько структурных и неструктурных белков (NH<sub>2</sub>-core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH) [4, 5, 12]. Неструктурный белок NS3 ВГС выполняет ряд важных функций в жизненном цикле вируса. На N-конце белка расположен домен сериновой протеазы протяженностью 181 а.о. (1026-1207 а.о.), участвующий в нарезании неструктурных белков ВГС [8]. Кофактором этого фермента служит белок NS4A. Область сериновой протеазы вместе с белком NS2 образует домен Zn-зависимой металло-протеиназы (CYS1123, 1125, 1171 и H181175-металлосвязывающий сайт NS3). Этот домен необходим для расщепления участка NS2-NS3 на молекуле полипротеина-предшественника. С-концевая часть NS3 является АТФ-геликазой (1207-1612 а.о.), ее основная функция заключается в расплетании "плюс"- и "минус"-цепей РНК в процессе репликации генома ВГС [10]. Показано, что у большинства ВГС-инфицированных пациентов вырабатываются антитела (АТ) к белку NS3. У лиц, излечившихся после острого гепатита С, часто наблюдают снижение уровня анти-NS3-АТ, в то время как постоянно высокий титр этих АТ рассматривают в качестве маркера хронизации инфекции [2].

Основные домены и отдельные последовательности белка NS3, участвующие в осуществлении ферментативных реакций, изучены достаточно детально. В то же время об антигенной структуре белка NS3 известно относительно мало. Главная причина этого состоит в том, что большинство эпитопов белка NS3 имеет конформационно-зависимый характер, что препятствует локализации антигенных детерминант с помощью метода пептидного картирования — основного методологического подхода для изучения В-клеточных эпитопов белков ВГС [6].

**Целью** нашей работы было получение панели моноклональных антител (МКА) к рекомбинантному белку NS3 (pNS3), изучение их эпитопной специфичности и способности выявлять антигенные детерминанты натурального белка NS3, находящегося в организме больных гепатитом С и инфицированных ВГС лиц.

#### **Материалы и методы.**

*Рекомбинантный белок.* Из сыворотки больного с высоким титром РНК ВГС (генотип 1b) методом ПЦР получили участок cDNA, кодирующий часть геликазного домена NS3 HCV (1356-1459 а.о.) NS3 белка ВГС.

Фрагмент был клонирован с помощью вектора p GEX-4T-2 и экспрессирован в клетках *E. coli* Jm 109 как гибрид с глутатион-5-трансферазой (GST). Белок был очищен методом аффинной хроматографии с использованием глутатион-сефарозы 4В ("Pharmacia", Швеция) [13].

*Пептиды.* Панель из 6 синтетических пептидов, содержащих по 20 а.о., и 1 протяженного пептида (92 а.о.) получали твердофазным методом и очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пептиды были представлены следующими последовательностями: 1347-1366, 1366-1385, 1381-1400, 1386-1405, 1406-1425, 1435-1454, 1363-1454 а.о. Все пептиды были синтезированы в соответствии с аминокислотной последовательностью ВГС генотипа 1b [6]. Пептид 1363-1454 а.о. был любезно предоставлен В. К. Пименовым и В. В. Новиковым (Институт эпидемиологии и микробиологии, Нижний Новгород).

*Иммунизация мышей, получение и скрининг МКА.* Мышей линии BALB/c иммунизировали 4-кратно внутрибрюшинно с интервалами 3 нед. В качестве иммунизирующего агента использовали очищенный pNS3 ВГС в концентрации 50 мкг/мышь в смеси с полным адьювантом Фрейнда ("Sigma", США). Через 3 дня после последнего введения антигена (50 мкг белка без адьюванта) проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышьяной миеломы линии SP2/0. Гибридизацию проводили по стандартному методу [7] с помощью ПЭГ-1500. Скрининг антител проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА) с использованием 3 антигенов, которые сорбировали в лунки 96-луночных панелей в фосфатном буферном растворе — PBS (рН 7,4) при комнатной температуре в течение ночи в следующих концентрациях: pNS3 — 1 мкг/мл; лизат клеток *E. coli* — 10 мкг/мл; GST — 10 мкг/мл. Вторым слоем наносили культуральные жидкости (КЖ) от гибридом в разведении 1:50 в PBST (PBS с 0,1% твина-20) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем наносили антивидовой поливалентный пероксидазный конъюгат антител к IgG, IgA и IgM мыши ("Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.", США) в растворе PBST, содержащем 10% эмбриональной бычьей и 5% нормальной козьей сывороток, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После каждого этапа несвязавшиеся реагенты отмывали забуференным физиологическим раствором с 0,1% твина-20 рН 7,4. В качестве субстрата использовали ортофенилендиаминдигидрохлорид (ОФД, "Sigma", США). В качестве отрицательного контроля использовали МКА к рекомбинантному белку core, полученные нами ранее [1], в качестве положительного — поликлональную сыворотку мыши, иммунизированной pNS3. Оптическую плотность (ОП) измеряли с помощью микроспектрофотометра Multiscan ("Titertek", Финляндия) при длине волны 492 нм. Положительными считали клоны, КЖ от которых не взаимодействовали с белками *E. coli* и GST и показывали ОП > 0,5 с рекомбинантным белком NS3. Определение титра антител проводили по той же схеме с использованием серийных разведений МКА и гипериммунной сыворотки с шагом 1:5 или 1:10.

Для получения асцитов, содержащих МКА, самкам мышей линии BALB/c, предварительно обработанным пристаном ("Merk", США), вводили внутрибрюшинно по 2—5 млн гибридных клеток. Фракцию Ig осаждали сульфатом аммония (50% насыщения) в течение ночи при 4°C и считали методом аффинной хроматографии на колонке с Protein A-Sepharose CL-4B ("Pharmacia", Швеция) по методике фирмы. МКА, секретирующие IgM, очищали троекратным осаждением сульфатом аммония, как описано выше, и диализовали против раствора PBS в течение ночи при 4°C. Концентрацию белка после очистки измеряли на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Субтипирование Ig и определение типов легких цепей МКА проводили с помощью тест-системы "Mouse-Hybridoma-Sub-typing Kit" ("Boehringer Mannheim", Германия). Очищенные МКА конъюгировали с пероксидазой хрена периодатным методом [14].

Способность МКА связываться с пептидами анализировали с помощью тИФА. Пептиды сорбировали в лунки 96-луночной панели в концентрации 10 мкг/мл в растворе PBS и инкубировали 2 ч при 37°C,

затем при комнатной температуре в течение ночи. Возможное неспецифическое связывание МКА с пептидами блокировали 2% бычьим сывороточным альбумином (БСА). МКА наносили в концентрации 1 мкг/мл в PBST с 10% эмбриональной бычьей сывороткой. После инкубации 2 ч при 37°C наносили антимишинный конъюгат. Положительным считали результат, если показатель ОП в 3 раза превышал значение отрицательного контроля.

Взаимодействие МКА с белком NS3 в составе коммерческих тест-систем "Murex-anti-HCV", Version III (Англия) и "Рекомби-Бест анти-ВГС-подтверждающий тест" (Новосибирск, Россия) оценивали в тИФА, заменяя конъюгат против Ig человека на конъюгат против Ig мыши.

*Конкурентный тИФА.* Для выяснения эпитопной специфичности МКА использовали метод конкурентного тИФА. В лунки 96-луночной панели, предварительно сенсibilизированные рNS3

(1 мкг/мл), наносили очищенные МКА в концентрациях, уменьшающихся от 50 мкг/мл до 0, и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем вносили конъюгированные с пероксидазой МКА в разведениях, позволяющих получить ОП в пределах 1 — 1,5 при взаимодействии с рNS3 в отсутствие конкурирующих АТ. На последнем этапе проводили спектрофотометрическое измерение активности МКА, как описано выше. Конкурентные отношения между МКА выражали как процент подавления связывания меченых МКА с рNS3 конкурирующими немечеными МКА.

Аналогичную методику использовали для выяснения способности МКА конкурировать с антителами из сывороток ВГС-инфицированных лиц за связывание с рNS3. Для этого использовали 8 сывороток от пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) в разведении 1:20. Наличие высокоактивных АТ к NS3 ВГС в сыворотках (ОП > 3,0) было показано с помощью подтверждающей тест-системы "ИФА-анти-ВГС-спектр" (Нижний Новгород, Россия). В качестве отрицательного контроля использовали 3 сыворотки доноров, не содержащие АТ к ВГС.

*т И ФА с денатурированным рекомбинантным белком NS3.* Денатурацию рNS3 проводили путем обработки раствора рNS3 (30 мкг/мл) додецил-сульфатом натрия (ДСН) и β -меркаптоэтанолом (МЭ), взятыми в эквимоллярных количествах до конечной концентрации 0,025 и 0,075%, в течение 2 ч при 4°C при постоянном встряхивании. Затем рNS3 на различных стадиях денатурации разводили (до 1 мкг/мл) и сорбировали на дно 96-луночной панели при комнатной температуре в течение ночи. После этого выполняли ИФА с МКА, как описано выше. Оценивали изменение связывания МКА с рNS3 в нативном и денатурированном состоянии, результаты выражали в процентах.

*Иммуноблот.* Анализ взаимодействия МКА с рекомбинантным белком NS3 в тест-системе "Chiron R1BA HCV 3.0 (R1BA 3)" ("Organon Diagnostics". США) проводили в соответствии с рекомендациями фирмы, заменив античеловеческий конъюгат на антимишинный.

**Результаты.** После 5-й (бустерной) иммунизации титр АТ к NS3 в гипериммунной сыворотке в тИФА был оценен как  $10^{-8}$ , к белку GST —  $5 \cdot 10^{-3}$ , к клеткам *E. coli* —  $1 \cdot 10^{-3}$ . В результате гибридизации было получено около 600 положительных клонов, КЖ от которых при связывании с рNS3 в реакции тИФА давали ОП > 0,5 и не взаимодействовали с белками GST и *E. coli*. Наиболее активно с рNS3 взаимодействовали КЖ от 31 клона (ОП > 1,5). Большинство гибридных клеток оказались нестабильными по продукции МКА; в результате клонирования методом предельных разведений было отобрано 7 гибридом, стабильно секретирующих МКА к рNS3.

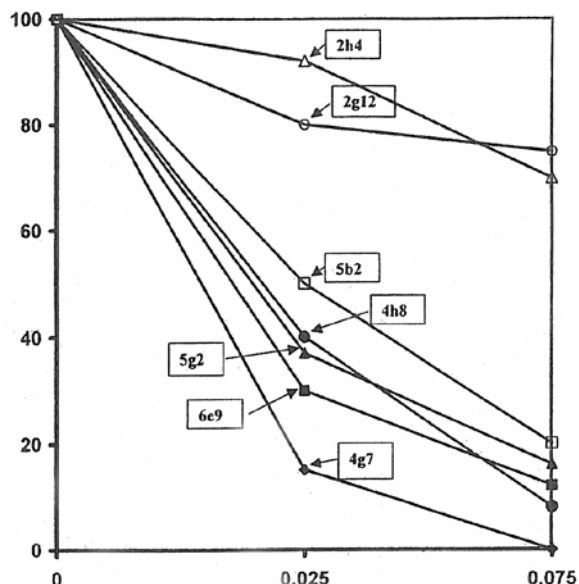


Рис. Влияние денатурации белка рNS3 на активность взаимодействия с МКА.

По оси ординат — изменение связывания МКА с рNS3 в тИФА (в % от контроля); по оси абсцисс концентрация денатурирующего агента (ДСН-МЭ; в %). За 100% принята активность взаимодействия МКА с нативным (необработанным) рNS3. В рамках указаны обозначения МКА.

Характеристики МКА представлены в табл. 1. Было установлено, что 6 гибридом продуцировали МКА класса IgG и клетки одного клона — IgM. Наиболее высокой активностью в отношении рNS3 обладали 5 МКА: 2h4, 2g12, 4g7, 6e9 и 5g2. Данные табл. 1 показывают, что все МКА проявляли высокую активность при взаимодействии с рNS3, входящим в состав коммерческой тест-системы "Murex-anti-HCV". Активность взаимодействия с рNS3 из набора "Рекомби-Бест анти-ВГС" значительно различалась. Все МКА взаимодействовали с рекомбинантным белком с33с в тест-системе "RIBA 3" (см. табл. 1). В реакции тИФА МКА не реагировали с короткими 20-мерными пептидами (результаты не представлены). С пептидом, содержащим 92 а.о., МКА 6e9 и 4g7 взаимодействовали активно, МКА 2g12, 2h4, 5b2 и 5g2 — слабо и МКА 4h8 не взаимодействовали (см. табл. 1).

Таблица 1

Характеристика МКА к рNS3 ВГС

МКА	Класс Ig и тип легкой цепи	Активность по отношению к NS3 в тИФА*	Активность в ИФА в тест-системах (ОП)**		Активность в тест-системе "RIBA3"	Активность в тИФА с пептидом 1363-1454 а.о. (ОП)**
			"Murex-anti-HCV"	"Рекомби-Бест анти-ВГС"		
2g12	G1, k	10 <sup>6</sup>	> 3,0	1,6	+	0,3
2h4	G1, k	10 <sup>7</sup>	> 3,0	1,6	+	0,2
5b2	G1, k	10 <sup>5</sup>	> 3,0	0,6	+	0,2
5g2	G1, k	10 <sup>6</sup>	> 3,0	0,4	+	0,2
6e9	G1, k	10 <sup>6</sup>	> 3,0	1,3	+	2,5
4h8	G1, k	10 <sup>5</sup>	> 3,0	—	+	—
4g7	M, k	10 <sup>7</sup>	> 3,0	1,3	+	1,5

Примечание. \* - обратные величины титров; \*\* - значение в ИФА приведено для очищенных Ig в концентрации 1 мкг/мл; ОП – отрицательного контроля = 0,05

Для решения вопроса о том, к каким антигенным детерминантам, линейным или конформационно-зависимым, направлены МКА, анализировали их взаимодействие с денатурированным рNS3. Для разрушения третичной структуры белка использовали ДСН-МЭ в возрастающих концентрациях. Полученные данные представлены на рисунке. Они показывают, что активность МКА 5g2, 5b2, 4h8 и 6e9 при взаимодействии с денатурированным рNS3 уменьшалась на 80—90%, а в случае 4g7 полностью исчезала. При этом изменение активности зависело от степени денатурации белка. Взаимодействие МКА 2h4 и 2g12 с денатурированным рNS3 снижалось в меньшей степени, на 25—30%.

Таблица 1

Анализ МКА в конкурентном тИФА

Конкурирующие немеченые АТ	Конъюгаты МКА						
	I		II		III	IV	V
	2g12	2h4	5b2	5g2	6e9	4h8	4g7
МКА:							
2g12	+++	+++	+++	++	—	↑	++
2h4	+++	+++	+++	++	—	—	++
5b2	++	++	++	++	++	++	+
5g2	++	++	++	++	+	+	+
6e9	+	+	+	+	+++	+++	+
4h8	↑	—	+	+	+++	+++	+++
4g7	↑	—	↑	—	+	+	+++
АТ из сывороток больных:							
94	+	++	+++	+++	++	++	++
11	+	+	++	++	+	+++	++
33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
21	++	++	+++	+++	+++	++	++
87	++	++	+++	+++	+++	+++	++
95	+	++	+++	+++	+++	4+	++
70	—	+	++	++	+	++	++
44	++	+++	+++	+++	+++	++	++

Примечание. Степень подавления связывания конъюгатов МКА с рNS3: +++ 75—100%; ++ 50-74%; + 25—49%; - менее 25%; Т — увеличение связывания.

Представляло интерес выяснить, с одним или несколькими эпитопами взаимодействуют полученные МКА. Для этого был проведен конкурентный тИФА. Анализировали взаимодействие конъюгированных МКА с рNS3 в присутствии немеченых МКА. Данные реципрокного конкурентного анализа представлены в табл. 2. Они показывают, что МКА 2h4 и 2g12, а также МКА 4h8 и 6e9 полностью подавляли связывание друг друга с рNS3. Между МКА 5b2 и 5g2 наблюдалось симметричное активное подавление связывания с рNS3, свидетельствующее о конкурентных отношениях. Конъюгат МКА 4g7 подавлял связывание немеченых МКА 4h8, 2g12 и 2h4, однако немеченые МКА 4g7 слабо изменяли связывание конъюгатов МКА 6e9 и 4h8 и не обладали способностью конкурировать с конъюгатами МКА 2h4 и 5g2. При других изученных сочетаниях МКА односторонне, несимметрично блокировали связывание друг друга с рNS3. Было установлено, что МКА 2g12, 4h8 и 4g7 не только не конкурировали, но даже усиливали связывание конъюгатов других МКА с рекомбинантным антигеном. Таким образом, по характеру конкуренции МКА можно условно разделить на 4 группы: 2h4-2g12, 5b2-5g2, 4h8-6e9 и 4g7.

Конкурентный вариант тИФА был использован для изучения способности МКА конкурировать с поликлональными АТ к NS3, присутствующими в сыворотках больных (ХГС). Результаты опытов показали, что все МКА были способны конкурировать с АТ за связывание с рNS3, но степень ингибирования различалась (см табл. 2). Наиболее активно блокировали связывание сывороточных АТ МКА 5b2, 5g2, 4h8, 6e9, 4g7, в меньшей степени — МКА 2g12 и 2h4. Сыворотки доноров, не

содержащие АТ к ВГС, не конкурируют с МКА за связывание с рNS3 (результаты не представлены).

**Обсуждение.** Проведенный ранее анализ специфичности АТ к белку NS3 показал, что 90% АТ, обнаруженных в сыворотках больных гепатитом С и ВГС-инфицированных лиц, вырабатывается к геликазному домену и только 10% — к сериновой протеазе [3]. Это указывает на более высокую антигенность участка, обладающего активностью геликазы. Было установлено также, что в геликазном домене наибольшее количество В-клеточных эпитопов сосредоточено внутри участка 1363-1454 а.о. [9]. Используя для иммунизации мышей рекомбинантный белок, имитирующий часть геликазного региона NS3 ВГС, мы рассчитывали получить высокий гуморальный ответ мышей. Действительно, в результате гибридизации спленоцитов иммунизированной мыши с миеломой получено 600 клонов, продуцирующих МКА к геликазному домену NS3, которые не взаимодействовали с GST и белками *E.coli*. Эти данные свидетельствуют о высокой степени очистки и антигенности белка, экспрессированного в бактериальной системе. Скрининг с использованием 3 антигенов позволил отобрать 7 гибридом, стабильно продуцирующих МКА к рNS3. Различная эпитопная специфичность полученных МКА была доказана с помощью нескольких методов. Во-первых, различалась реактивность МКА с тремя независимо полученными антигенами NS3: рNS3, использованным для иммунизации; рNS3, входящим в состав тест-системы "Рекомби-Бест", и протяженным пептидом (1363-1454 а.о.). Различия в активности взаимодействия одних и тех же МКА с рNS3 и пептидом, аминокислотные последовательности которых очень близки, можно объяснить, учитывая, что белки слияния и даже минорные различия в аминокислотном составе могут приводить к значительным изменениям в антигенной структуре белков ВГС [11]. Во-вторых, МКА по-разному взаимодействовали с денатурированным антигеном рNS3 и не реагировали с короткими пептидами из области NS3. Активность взаимодействия МКА 5b2, 5g2, 4g7, 6e9 и 4h8 с белком рNS3 снижалась в 2—10 раз при обработке антигенов (АГ) даже очень низкими концентрациями (0,025%) денатурирующего агента ДСН-МЭ. Эти данные позволяют высказать предположение о конформационной зависимости антигенных детерминант, к которым направлены данные МКА. Сделанное предположение согласуется с имеющимися сведениями о преимущественном формировании АТ к конформационно-зависимым участкам NS3 у ВГС-инфицированных лиц [3, 6, 8]. Другая ситуация наблюдалась с МКА 2h4 и 2g12: денатурация АГ слабо влияла на активность этих МКА. Отсутствие строгой зависимости МКА 2h4 и 2g12 от конформационной полноценности рNS3, с одной стороны, и отрицательные результаты анализа взаимодействия с пептидами, имитирующими линейные эпитопы — с другой, позволяют предположить, что данные МКА направлены к прерывистым антигенным детерминантам. Подобные эпитопы были описаны ранее для белка core ВГС [8].

Сравнительный анализ полученных данных позволяет сделать заключение о том, что изученные МКА направлены к 5 различным эпитопам белка NS3: к 1-му - МКА 2g12 и 2h4; ко 2-му - МКА 5b2 и 5g2; к 3-му - МКА 6e9; к 4-му - МКА 4h8; к 5-му — МКА 4g7. Эпитопы, с которыми взаимодействовали МКА 1-й и 2-й групп, вероятно, частично перекрываются. В то же время эпитопы, распознаваемые МКА 1-й группы (2g12-2h4) и МКА 6e9, 4h8, представляются наиболее пространственно удаленными друг от друга на молекуле NS3. В конкурентном варианте тИФА МКА 6e9 и 4h8 обладали сходными свойствами, но значительно различались по взаимодействию с рекомбинантным белком из тест-системы "Рекомби-Бест" и с протяженным пептидом; по этому признаку большее сходство обнаружено между МКА 6e9 и 4g7. Способность МКА 4g7 конкурировать с МКА 4h8 и 6e9 свидетельствует о перекрывании антигенных детерминант, к которым они направлены. Известно, что иммуноглобулины классов G и M могут иметь общие В-клеточные эпитопы. О сложной организации конформационно-зависимых антигенных детерминант на белке NS3 свидетельствует и тот факт, что мы обнаружили как реципрокное, так и одностороннее повышение активности связывания одного МКА после взаимодействия рNS3 с другим МКА. Можно предположить, что связывание одного из этих МКА с рNS3 изменяет конформацию белка таким образом, что антигенная детерминанта для другого МКА оказывается экспонированной. Подобными стерическими изменениями можно объяснить несимметричное увеличение связывания МКА 2g12 и 5b2 с рNS3 в присутствии МКА 4g7.

Все МКА конкурировали с АТ, обнаруженными в сыворотках больных ХГС. Это позволяет предположить, что полученные МКА и АТ к натуральному белку NS3 реагируют с одними и теми же

эпитопами. Более того, данные антигенные детерминанты, по-видимому, широко представлены в зараженных клетках больных гепатитом С и обладают выраженной иммуногенностью. Следует отметить, что хотя все сыворотки имели высокую суммарную активность в отношении NS3, с помощью МКА было установлено, что набор эпитопов, с которыми взаимодействовали эти АТ, значительно различался у разных пациентов.

Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что исследованный участок геликазного домена белка NS3 ВГС, представленный приблизительно 1/4 его частью (около 100 а.о.), включает, по крайней мере, 5 иммуногенных эпитопов. Эти эпитопы имеют конформационно-зависимую, или дискретную (прерывистую) природу. Данные о конкуренции МКА с АТ из сывороток анти-ВГС-позитивных лиц позволяли предположить, что МКА будут способны взаимодействовать с натуральным белком NS3 в организме больных гепатитом С. Предварительные опыты, проведенные с материалами игловых биопсий печени больных ХГС, подтверждают это предположение. Изучение замороженных срезов печени показало, что МКА, использованные для иммуногистохимического окрашивания, способны выявлять белок NS3 в цитоплазме гепатоцитов больных ХГС. Это открывает перспективу использования полученных МКА как для дальнейшего изучения белка NS3 ВГС, так и для разработки диагностических препаратов на их основе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Масалова О. В., Атанадзе С. Н., Калинина Т. И. и др. Иммунохимические свойства и специфичность моноклональных антител в отношении N- и С-концевых участков рекомбинантного белка нуклеокапсида вируса гепатита С // *Вопр. вирусол.* — 1996. — № 4. - С. 150—156.
2. Beld M., Penning M., Van Pitten M. et al. Quantitative antibody responses to structural (core) and nonstructural (NS3, NS4 and NS5) hepatitis C virus proteins among seroconverting injecting drug user impact of epitope variation and relationship to detection of HCV RNA in blood // *Hepatology.* - 1999. - Vol. 29.- P. 1288-1298.
3. Chen M., Sallberg M., Sonnerborg A. et al. Human and marine antibody recognition is focused on the ATPase/Helicase, but not the protease domain of the HCV NS3 // *Ibid.* — 1998. — Vol. 28. - P. 219-224.
4. Choo Q., Kuo G., Weiner A. et al. Isolation of cDNA clone derived from a blood-born non-A, non-B hepatitis genome // *Science.* — 1989. - Vol. 244. - P. 359—362.
5. Hijikata M., Mizushima H., Tanji Y. et al. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of HCV // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1993. - Vol. 90. -P. 10773-10777.
6. Khudyakov Yu. E., Khudyakova N. S., Jue D. L. et al. Linear B-cell epitope of the NS3-NS4-NS5 proteins of the HCV as modeled with synthetic peptides // *Virology.* — 1995. — Vol. 206.- P. 666-672.
7. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature.* — 1975. — Vol. 256. - P. 495-497.
8. Mondelli M., Cerino A., Beiotii V. et al. Immunobiology and pathogenesis of HCV infection // *Res. Virol.* — 1993. — Vol. 144. - P. 269-274.
9. Mondelli M., Cerino A., Boender P. et al. Significance of the immune response to a major, conformational B-cell epitope on the hepatitis C virus NS3 region defined by human monoclonal antibody // *J. Virol.* — 1994. — Vol. 68 — P. 4829—4836.
10. Neddermann P., Tomei L., Steinkuhler C. et al. The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions // *J. Biol. Chem.* - 1997. - Vol. 378. - P. 469-476.
11. Nolandt O., Kern V., Muller H. et al. Analysis of HCV core protein interaction domains // *J. Gen. Virol.* — 1997. — Vol. 78.- P. 1331-1340.
12. Shimotochno K., Tanji Y., Hirowatari Y. et al. Processing of the HCV precursor protein // *J. Hepatol.* — 1995. — Vol. 22. — P. 87-92.
13. Smith D., Johnson K. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathion s-transferase // *Gene.* - 1988. - Vol. 67. - P. 31-40.
14. Wilson M., Nakane P. Immunofluorescence and related staining techniques. — Amsterdam, 1978. — P. 215—224.

Опубликовано: *Ж. «Вопросы вирусологии», 2002.- №1-С.21-25*