

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук

На правах рукописи

Каширина Елена Игоревна

**Разработка системы гипоаллергенной упаковки белков в полимерный
матрикс**

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Свирщевская Елена Викторовна

Москва 2017

Оглавление

Введение.....	4
1. Литературный обзор	9
1.1 Аллергия	11
1.2 Методы лечения аллергии.....	12
1.3 Механизмы АСИТ.....	13
1.4 Разновидности методов АСИТ	16
1.5 Основные виды аллергенов.....	18
1.6 Аллергены, используемые для АСИТ, и способы их модификации.....	24
1.7 Зависимость эффективности АСИТ от вводимой дозы	26
1.8 Системы адресной доставки лекарственных агентов на основе полимеров	28
1.9 Альгинат натрия (альгиновая кислота).....	30
1.9.1 Биосовместимость.....	31
1.9.2 Инкапсуляция белков в альгинат	32
1.9.3 Высвобождение активных агентов.....	32
1.10 Хитин, хитозан и его производные	33
1.10.1 Свойства и области применения хитозана	34
1.10.2 Биосовместимость и биоразлагаемость хитозана.....	36
1.10.3 Методы получения хитозана.....	37
1.10.4 Модификация хитозана	40
1.10.5 Методы иммобилизации биоактивных лигандов на хитозан.....	42
1.11 Наночастицы на основе хитозана.....	44
1.11.1 Методы получения наночастиц на основе хитозана	46
1.11.2 Наночастицы ядро-оболочка на основе хитозана-альгината	56
1.12 Применение наночастиц хитозана	59
1.12.1 Пероральная, назальная и ингаляционная доставка лекарственных веществ.....	59
1.12.2 Доставка с помощью вакцин.....	60
2 Экспериментальная часть.....	62
2.1 Реагенты и растворители.....	62

2.2	Лабораторное оборудование.....	63
2.3	Методы.....	64
2.3.1	Методы работы с полимерами.....	64
2.3.2	Методы работы с белками.....	65
2.3.3	Методы работы с полимерными наночастицами: получение и определение параметров	68
2.3.4	Методы работы с животными.....	73
2.3.5	Статистическая обработка данных.....	78
3	Результаты собственных исследований.....	79
3.1	Получение частиц на основе рекомбинантных белков с оболочкой из хитозана и альгината.....	79
3.1.1	Получение и первичная характеристика рекомбинантных белков Derf 1, Derf 2, Asp f 2 и Asp f 3.....	79
3.1.2	Получение и физико-химические свойства наночастиц на основе хитозана и его производных	80
3.1.3	Характеристика производных хитозана с различными гидрофобными заместителями	82
3.1.4	Формирование наночастиц на основе гидрофобизованных производных хитозана методом самосборки.....	83
3.1.5	Характеристика хитозанов с разной степенью замещения карбоксильными группами	84
3.1.6	Выбор молекулярной массы хитозана, размера частиц и исходной концентрации полимера	87
3.1.7	Получение частиц из лаурилсукциноилхитозана методом самосборки	89
3.1.8	Включение рекомбинантных белков в состав наночастиц.....	92
3.1.9	Характеристика частиц, содержащих аллергены.	96
3.1.10	Получение двухслойных частиц белок-хитозан-альгинат	97
3.1.11	Получение частиц методом электроспрея.....	100
3.2	Иммунологическая характеристика капсулированных аллергенов ...	105
3.2.1	Распознавание белков-аллергенов IgE антителами из сывороток больных	105

3.2.2	Разработка ИФА для анализа распознавания сывороточными IgE капсулированные антигены	107
3.2.3	Анализ связывания капсулированных аллергенов с IgE	108
3.2.4	Анализ иммунного ответа на капсулированные белки.....	110
3.3	АСИТ капсулированными аллергенами	119
3.3.1	Индукция аллергии на белки Asp f 2иAsp f 3 у мышей	119
3.3.2	Эффект иммунизации капсулированными аллергенами на продукцию IgG и IgE антител	121
3.3.3	Эффект иммунизации капсулированными аллергенами на системную реакцию	123
4	Заключение	125
5	Выводы.....	128
6	Список сокращений	129
7	Список литературы	131

Введение

Аллергическими заболеваниями разной тяжести страдает 25-30% населения развитых стран. Основной формой аллергии является реакция I типа, опосредованная образованием иммуноглобулинов E класса (IgE). Механизмы формирования IgE остаются плохо понятными. В связи с этим нет эффективной терапии аллергии. Единственным патогенетическим методом лечения является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), предложенная более 100 лет назад. Эффективность АСИТ остается низкой, что может быть связано с необходимостью осторожного использования экстрактов для АСИТ. Из-за риска обострения аллергических реакций и индукции опасного для жизни анафилактического шока АСИТ проводится длительно и может достигать 3-5 лет. Длительность терапии, риск осложнений, использование нестандартизованных экстрактов аллергии, высокая кросс-реактивность, низкая эффективность АСИТ приводят к низкому интересу больных к подобному лечению. В отсутствие терапии аллергия постепенно прогрессирует до астмы, хронических синуситов, атопического дерматита. Поиск методов, позволяющих повысить эффективность и безопасность терапии, а также снизить ее длительность, являются актуальной биомедицинской задачей.

Целью работы является получение капсулированной формы аллергенов для АСИТ.

Задачами работы являются

1. Получение и характеристика наночастиц на основе производных хитозана методами самосборки и электроспрея;
2. Включение рекомбинантных аллергенов в наночастицы хитозана-альгината и их характеристика *in vitro*;
3. Анализ распознавания аллергенов в составе наночастиц IgE антителами из сывороток больных;
4. Оценка иммуногенности аллергенов в составе наночастиц на основе хитозана-альгината;

5. Протективный эффект капсулированных аллергенов в оболочку хитозана-альгината *in vivo* в модели аллергии на мышах.

Научная новизна

Разработана структура оболочки для капсулирования белков, которая предотвращает контакт IgE с белком, но сохраняет его иммуногенность, что может быть использовано как для АСИТ, так и для создания вакцин с любыми белками и пептидами. Впервые получены капсулированные вакцины на основе рекомбинантных аллергенов из клещей домашней пыли *D. farinae* и грибов *Aspergillus fumigatus*, впервые показана способность однослойной упаковки аллергенов значительно снижать распознавание IgE, а двухслойной упаковки – полностью блокировать распознавание. Впервые определена в экспериментах *in vivo* иммуногенность капсулированных белков. Также впервые в мышинной модели аллергии показано, что иммунизация капсулированными аллергенами безопасна и вызывает формирование IgG антител после 3-х иммунизаций, что значительно быстрее, чем при проведении традиционной АСИТ. Впервые показано в мышинной модели, что индукция IgG к аллергенам приводит к медленному снижению IgE, как это наблюдается при проведении АСИТ в клинике.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в разработке структуры, методов получения капсулированных белков, а также в изучении механизмов действия АСИТ. Практическая значимость работы состоит в демонстрации отсутствия связывания IgE с капсулированными в двойную оболочку аллергенами, что позволяет провести АСИТ в течение 1-3 месяцев в отличие от 3-5 лет, требуемых для традиционной АСИТ. Отсутствие контакта IgE и аллергена при проведении АСИТ также обеспечивает безопасность терапии. Таким образом, решено две проблемы традиционной АСИТ: значительно снижена длительность терапии и повышена ее безопасность. Последней проблемой является эффективность АСИТ. Нами показано, что формирование

IgG к аллергенам не полностью блокирует продукцию IgE, уровень которой снижается медленно, аналогично наблюдаемому в клинике при проведении АСИТ. Для решения проблемы эффективности требуется понимание механизмов формирования IgE-продуцирующих клеток.

Методология и методы исследования

В работе использованы производные хитозана с разной молекулярной массой (40 и 300 кДа), полученные кислотным гидролизом; получены гидрофобные производные (лаурилсукциноилхитозан, ЛСХ) методом обработки ангидридами карбоновых кислот; разработан метод самосборки наночастиц на основе ЛСХ с ММ 40 и 300 кДа в процессе диализа с высоким выходом (80%); разработан метод масштабированного получения наночастиц с помощью электроспрея (выход 30%); степени замещения определены методом ЯМР; заряд и размер наночастиц определен на приборе динамического светорассеяния с ячейкой для определения дзета-потенциала; анализ токсичности наночастиц определен на клеточных линиях методом МТТ; анализ связывания с IgE и IgG антителами проведен методом ИФА; для получения IgG к аллергенам использовали иммунизацию мышей аллергеном; сыворотки больных с аллергией на клещей домашней пыли получены из Института вакцин и сывороток (Москва); захват наночастиц макрофагами оценивали методом конфокальной микроскопии, для чего были получены флуоресцентно-меченные белки-аллергены; анализ иммуногенности белков в составе наночастиц оценивали с помощью иммунизации мышей наночастицами; кровь мышей забирала в динамике формирования иммунного ответа; анализ IgG и IgE в сыворотке мышей анализировали методом ИФА; для анализа безопасности и эффективности АСИТ с помощью капсулированных антигенов использовали модель низкодозовой аллергии на мышах; у мышей вызывали формирование IgE без формирования IgG, после чего проводили терапию капсулированными аллергенами; аллергическую реакцию оценивали по состоянию мышей, а также с помощью гистологии легких; снижение IgE и появление IgG1 и IgG2a в сыворотках мышей оценивали методом ИФА.

Положения, выносимые на защиту

1. Гидрофобизированные производные хитозана можно использовать для получения наночастиц методом самосборки.
2. Капсулированные в двойную полимерную оболочку из хитозана-альгината белки не имеют контакта с сывороточными IgE, но процессируются макрофагами и вызывают формирование IgG *in vivo*.
3. Капсулированные аллергены не вызывают острую реакцию у мышей с аллергией в отличие от свободных белков, что показывает их безопасность при АСИТ.
4. Формирование высоких титров IgG при иммунизации капсулированными белками достигается за 1 месяц, что показывает значительно меньший срок, необходимый для проведения АСИТ.
5. Проведение АСИТ с экстрактами аллергенов по традиционной схеме и капсулированными аллергенами в быстром протоколе приводят к появлению IgG антител, но не отменяют продукцию IgE.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные результаты опубликованы в 3 зарубежных и 4 отечественных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, и доложены на конференциях: международный конгресс по иммунологии (Милан, 2013), Каргинские мемориальные чтения (Москва, 2014), ЕААСІ Зимняя школа иммунологии «Фундаментальные исследования в иммунологии аллергии и клинической иммунологии» (Румыния 2014, Франция 2015), международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии (Москва, 2014), международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014), ЕААСІ школа аллергии и специфической иммунотерапии (Дания, 2016), международная конференция по биологическим

полимерам и композитам на их основе (BiPoCo) (Венгрия 2016), (XXIV-XXVIII) зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2013, 2014, 2015 и 2016).

1. Литературный обзор

Аллергическими заболеваниями разной тяжести страдает 25-30% населения развитых стран. Основной формой аллергии является реакция I типа, опосредованная образованием иммуноглобулинов E класса (IgE). Механизмы формирования IgE остаются плохо понятными. В связи с этим нет эффективной терапии аллергии. Единственным патогенетическим методом лечения аллергии является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), предложенная более 100 лет назад. Эффективность АСИТ остается низкой, что может быть связано с необходимостью использования экстрактов для АСИТ в низких дозах. Из-за риска обострения аллергических реакций и индукции опасного для жизни анафилактического шока АСИТ проводится длительно и может достигать 3-5 лет. Длительность терапии, риск осложнений, использование нестандартизованных экстрактов аллергии, высокая кросс-реактивность, низкая эффективность АСИТ приводят к низкому интересу больных к АСИТ. В отсутствие терапии аллергия постепенно прогрессирует до астмы, хронических синуситов, атопического дерматита. Поиск методов, позволяющих повысить эффективность и безопасность терапии, а также снизить ее длительность, является актуальной биомедицинской задачей.

С развитием фундаментальных наук в течение последних десятилетий биополимеры нашли широкое применение в медицине [1, 2, 3], в частности в области разработки систем доставки (СД) лекарств. Наноразмерные СД могут иметь различный заряд, размер, электропроводность, температуру плавления, гидрофобность, что объясняет их широкое применение в медицине и биотехнологии.

Большинство применяемых в настоящее время методов введения в организм лекарственных средств обладают рядом существенных недостатков: необходимостью введения высоких доз вещества, на 1-2 порядка превышающих дозы, необходимые для достижения терапевтической концентрации; высокая общая токсичность ряда препаратов; необходимость частого приема препарата из-за его быстрого вывода из организма; нецелевая

доставка лекарственного средства, приводящая к нежелательным побочным эффектам за счет неспецифического действия.

Нанотехнология позволила разработать принципиально новые методы адресной доставки лекарств к больным органам, значительно увеличивая степень их лечебного воздействия [4]. Развитие аналитических методик, используемых в работе с наноразмерными объектами, значительно повысило эффективность исследований механических и химических свойств клеток, а также позволило анализировать характеристики отдельных молекул. Регулируемое создание нанообъектов приводит к разработке новых биосовместимых материалов с улучшенными характеристиками. Молекулярные компоненты биологических систем (белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и химические аналоги) являются примерами материалов, чья структура и свойства определяются наноразмерным масштабом. Множество природных наноструктур образуется при помощи методов биологической самосборки. Искусственные органические и неорганические объекты могут вводиться в клетки, применяться в качестве активных компонентов, использоваться для диагностики.

Включение биоактивных молекул разного рода в биосовместимые полимерные нано- и микрочастицы/капсулы в настоящее время является одним из перспективных направлений биомедицины и биотехнологии. Сфера применения таких объектов постоянно расширяется и включает в себя разработку систем целевой доставки веществ с их контролируемым высвобождением.

Хитозан является производным хитина, природного поликатиона. Хитозан имеет большое количество реакционных групп, что выгодно отличает его от других биополимеров медицинского назначения. Наличие реакционных групп позволяет получить производные с разным зарядом и гидрофобностью, конъюгировать полимер с белками и пептидами, использовать такие группы для формирования наночастиц.

Альгиновая кислота - еще один водорастворимый природный линейный полисахарид, извлекаемый из бурых водорослей, представляет собой цепи из

остатков 1,4-D-маннуриновой кислоты и L-гиалуроновой кислоты. Свою популярность данный полимер приобрел благодаря способности рН-зависимо сжиматься в кислотных условиях, что позволяет удерживать инкапсулированный лекарственный препарат в желудке, защищая его от ферментативной дезактивации. Биоразлагаемость, биосовместимость, низкая токсичность, низкая иммуногенность и хорошая мукоадгезия расширяют его применение в доставке лекарств. Микро- или наночастицы из альгиината для пролонгированного высвобождения лекарственного средства можно получить физическими или химическими методами сшивания в мягких условиях без использования агрессивных реагентов.

1.1 Аллергия

Аллергия является одним из самых распространенных заболеваний в современном мире. Более 25% населения в промышленно развитых странах страдает от аллергии, причем в отдельных районах эта цифра может достигать 85-90%.

Согласно наиболее распространенной классификации Ф. Гелла и Р. Кумбса выделяют I, II, III и IV типы гиперчувствительности организма. Среди них наиболее распространенной является реакция, опосредованная специфическими иммуноглобулинами E класса (IgE), которая относится к I типу гиперчувствительности. Аллергия данного типа возникает из-за аномальной реакции организма на безвредные соединения (аллергены) окружающей среды и представляет собой синтез экзогенных и генетически детерминированных факторов [1, 2].

Разным людям свойственны различные симптомы заболевания, которые могут быть как мягкими (насморк), так и тяжелыми (вплоть до анафилаксии). Симптомы также могут зависеть от части тела, с которой контактирует аллерген, например, пыльца из воздуха проникает в дыхательные пути через нос и вызывает респираторные симптомы, такие как кашель, зуд и насморк, заложенность носа, чихание и хрипы. Симптомы, связанные с пищевой аллергией, включают рвоту, тошноту, боли в животе и понос. Кожная аллергия

проявляется возникновением сыпи, волдырей, покраснений и зуда. Иммунная система защищает организм человека от патогенных микроорганизмов и других посторонних веществ, производя особый вид гликопротеинов, известный как иммуноглобулин (Ig) или антитела, секретируемые В-клетками (тип лимфоцитов). Антитела классифицируются на пять подгрупп, каждая из которых имеет свои функции, при этом основным участником аллергических реакций I типа является IgE.

1.2 Методы лечения аллергии

Поскольку аллергия носит хронический характер, не связанный с инфицированием, методы её терапии должны быть эффективными в течение длительного периода. Изменение окружающей среды, образа жизни, привычек человека считаются приемлемыми способами борьбы с аллергией.

Большинство противоаллергических лекарственных препаратов обладают свойством подавлять действие медиаторов аллергии, при этом предотвращая активацию тучных клеток с последующим процессом дегрануляции. К ним относятся такие антигистаминные препараты, как эпинефрин (адреналин), кортизон, теофиллин и др. Препараты данной группы снижают проявление симптомов заболевания, но не используются при её продолжительном лечении, т.к. не устраняют первопричину заболевания.

Единственным методом патогенетического лечения аллергии уже более ста лет остаётся аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), включающая в себя длительное (до 3-х лет) курсовое введение малых, но постепенно увеличивающихся, доз экстрактов аллергенов [3]. После завершения курса АСИТ наблюдается положительный долгосрочный эффект, обусловленный формированием антител IgG4, который предотвращает прогрессирование гиперчувствительности при повторных провокациях аллергенами и замедляет развитие аллергии в тяжёлые формы - бронхиальную астму и атопический дерматит.

АСИТ в настоящее время представляет собой подкожное введение различных аллергенов. После инъекции чаще всего возникает аллергическая

реакция, поэтому такие вакцины не вводят в большой дозе из-за опасности анафилактического шока, что в свою очередь затрудняет эффективный переход иммунного ответа с синтеза IgE на синтез IgG и приводит к необходимости медленно наращивать дозу до достижения терапевтического эффекта. Курс терапии может длиться несколько лет (от 3 до 5).

При проведении АСИТ используются экстракты природных возбудителей - аллергенов, содержащие большое количество балластных примесей, что создает дополнительную нагрузку на организм и снижает эффективность терапии. При этом у каждой фирмы экстракты, даже полученные по одной и той же методике, различаются, что не позволяет стандартизовать препараты.

Для устранения перечисленных проблем разрабатываются новые методы и препараты для проведения АСИТ. Одним из направлений является химическая модификация экстрактов аллергенов, с целью снизить аллергенность нативных белков. [4]. Например, для получения так называемых аллергоидов, в качестве модифицирующих агентов чаще всего применяются формальдегид и глутаровый альдегид, вызывающие полимеризацию белков [5]. Данный подход снижает аллергенность белков, но не решает проблему наличия балластных веществ в аллергенных экстрактах.

Наибольший интерес в среде разработок вызывает использование для лечения аллергии рекомбинантных аллергенов [6]. На данный момент рекомбинантные аллергены можно получить в одном из трех видов: в виде молекул, точно имитирующих свойства природных аллергенов (т.е. рекомбинантные аллергены дикого типа), в виде модифицированных белков с улучшенными свойствами (снижение аллергенной активности, повышение иммуногенности), и в виде гибридных молекул, содержащих эпитопы нескольких различных аллергенов [7].

1.3 Механизмы АСИТ

В настоящее время существует две независимые концепции механизма формирования аллергии. Первая постулирует, что аллергия является

результатом активации аллергеном Т-хелперов 2 типа (Тх2), продуцирующих специфичные интерлейкины (ИЛ) 4, 5 и 13 [8]. Роль ИЛ-4 и ИЛ-13 как факторов, необходимых для переключения В-клеток на синтез IgE, показана в экспериментах *in vitro* [9-12]. Вторая концепция предполагает роль тканевых лимфоидных клеток, которые относятся к древним формам иммунных клеток, названных “innate lymphoid cells type 2” (ВЛ2). В 2013г Licona-Limon P *et al.* показали, что при паразитарной инвазии у Rag-/- мышей, не имеющих Т и В клеток, формируется IgE и наблюдается продукция ИЛ-4, 5 и 13, за что ответственны ВЛ2 [13]. Существование ВЛ2 и подобных им клеток врожденного иммунитета показаны также и другими авторами [14-17]. Роль ВЛ2 в аллергии широко обсуждается [18, 19]. На настоящий момент известны тканевые лимфоидные клетки только с характеристиками Тх.

Вопрос, где В-клетки проходят переключение изотипа (class switch recombination, CSR) антител с IgM на IgE, является ключевым. CSR в В-клетках осуществляется путем вырезания участка ДНК между двумя регионами переключения. В условиях *in vitro* В-клетки человека проходят CSR под действием ИЛ-4 как прямым (с IgM на IgE), так и последовательным (с IgM на IgG, затем на IgE) путем. Xiong *et al.* показали, что при паразитарной инфекции *N. brasiliensis* у мышей наблюдается формирование двух субпопуляций В-клеток, возникших прямым и последовательным CSR [20]. Противоположные результаты были получены Talay *et al.*, которые показали переключение только прямым путем [21]. Аналогичные противоречивые данные получены и другими авторами. Последовательное переключение соответствует попаданию аллергена в дренирующие лимфатические узлы (ЛЮ), где могут формироваться Тх2. Прямое переключение скорее соответствует другому типу иммунного ответа, формирующегося локально в месте попадания аллергена.

Вопрос локального переключения В-клеток был поставлен несколькими группами. Так, Takhar *et al.* [22] и Cameron *et al.* [23] показали переключение В-клеток в слизистой носа больных аллергическим ринитом. Прямое переключение В-клеток на синтез IgE означает, что аллерген-специфические антитела других классов должны отсутствовать. Так, Niederberger *et al.*

показали, что прямое переключение найдено у 90% детей 1-7 лет, гиперчувствительных к пыльце березы и трав [24]. И, наоборот, Resch Y *et al.* показали IgE и IgG4 продукцию у детей, чувствительных к аллергенам домашней пыли [25]. Независимое формирование IgE и IgG показано в большом европейском исследовании, включившем 2780 больных с аллергией на кошку и домашнюю пыль [26]. Вопросу наличия IgE и IgG антител к аллергенам посвящено достаточно большое число работ, в которых делаются противоположные выводы [27].

Популярными направлениями исследований в мире является изучение деталей уже сформировавшейся аллергии у взрослых [28, 29]; роли различных субпопуляций Т-клеток (Т-хелперов разного профиля продукции цитокинов; Т-регуляторных клеток [30-32]; роли TLR рецепторов [33]. Различные виды аллергических реакций имеют свои специфические особенности.

При проведении АСИТ наблюдается повышение содержания клеток, продуцирующих ИЛ-12, появление рецепторов для ИЛ-2, усиление экспрессии HLA-DR (антиген-представляющие клетки), появление Тх1 клеток, переключение Тх2-ответа на Тх1-ответ [34, 35], что приводит к запуску и поддержанию продукции блокирующих IgG-антител или формированию Т-лимфоцитарной толерантности [36].

Уровень соответствия АСИТ классическим моделям толерантности до сих пор остается предметом изучения и дискуссий. АСИТ воздействует практически на все значимые звенья патогенеза аллергического процесса, оказывает супрессорное действие на гуморальный и клеточный компоненты аллергической реакции, останавливает раннюю и позднюю фазу IgE-опосредованной аллергии. Терапия оказывает воздействие на вызванную антигеном продукцию цитокинов воспаления, таких, как ИЛ-4 и интерферон гамма. При АСИТ угнетаются эффекторные составляющие аллергического процесса: сокращается содержание тучных клеток, уменьшается накопление клеток воспаления (нейтрофилов и эозинофилов), в свою очередь это приводит к уменьшению накопления в тканях организма больного аллергией воспалительных медиаторов, высвобождаемых этими клетками, к угнетению

секреции хемотаксических посредников, запускающих позднюю фазу воспаления и неспецифическую реактивность тканей [37, 38]. Возникающие при АСИТ изменения, опосредованные представительством цитокиновых маркеров, понижение неспецифической тканевой гиперреактивности, угнетение тканевой чувствительности к экспозиции аллергена, угнетение признаков аллергического воспаления сохраняются на протяжении длительного времени.

Преимущества АСИТ обусловлены терапевтическим действием, которое распространяется на все этапы аллергического ответа; данный спектр преимуществ отсутствует у известных фармакологических препаратов.

Наиболее часто регистрируемый результат АСИТ – это индукция аллерген-специфических блокирующих антител, в основном субкласса G4 [39], и постепенное снижение титров аллерген-специфического иммуноглобулина E [40]. Хотя уровень IgE снижается незначительно, после лечения с помощью АСИТ предотвращается его резкое сезонное увеличение [39].

В рамках гипотезы об основной роли врожденного иммунитета при аллергическом ответе, формирование IgE и IgG антител к аллергену является независимым.

Клинические исследования показали, что наиболее значимым эффектом является формирование В-клеток, синтезирующих IgG4 [39, 40]. При этом циркуляция IgE продолжается длительно, что, предположительно, связано с временем жизни В-клеток памяти. В экспериментальных моделях показано, что увеличение аффинности IgG, индуцированных активной иммунизацией, ведёт к лучшей протекции [41].

1.4 Разновидности методов АСИТ

Существует несколько методов проведения АСИТ, отличающиеся способом введения аллергена: пероральный (сублингвальный), подкожный, интраназальный, эндобронхиальный и др. Наиболее распространен подкожный способ. В настоящее время для достижения эффекта АСИТ этим путем требуется около 100 инъекций, проводимых в течение 3 – 5 лет, поэтому данный вид не распространен на должном уровне [42].

В течение последних десятилетий активно разрабатываются новые методы АСИТ, которые могут повысить эффективность терапии при меньшем количестве инъекций, позволяющие сократить её время, что может сделать АСИТ более привлекательной, а именно:

- использование аллергенных пептидов или очищенных аллергенов для снижения аллергенности;
- использование адъювантов для повышения иммуногенности;

Целью современных разработок препаратов для АСИТ является уменьшение побочных эффектов при увеличении эффективности терапии.

Пероральная АСИТ. В настоящее время применяется ряд неинъекционных методов АСИТ. Из них наиболее распространен пероральный вариант, активно применяемый в педиатрической практике. Он отличается хорошей переносимостью большими терапевтическими дозами препаратов, возможностью введения высоких курсовых доз аллергена, понижен риск анафилактических реакций по сравнению с подкожным введением, отсутствует риск переноса инфекций, возникающий во время инъекций препаратов. Эффективность этого метода в ряде исследований считается высоким.

Частным случаем перорального считается сублингвальный метод (СлАСИТ). Препаратами для этого метода являются специальные капельные растворы аллергенов и таблетированные подъязычные формы. Доказана относительная эффективность и безопасность этого метода при лечении аллергии с сенсibilизацией к пыльцевым аллергенам, аллергенам домашней пыли и клещей. Достоинствами метода является хорошая переносимость большими лечебными дозами препарата [43].

Одна из современных альтернативных стратегий перорального аллергенспецифического лечения – использование микрогранул с капсулированными аллергенами. Покрытие гранул предохраняет аллерген от преждевременной деградации в кислой среде, при этом диаметр гранул, не превышает 1 мм. Попадая в проксимальный отдел тонкой кишки с повышенным уровнем pH, покрытие растворяется и аллерген высвобождается [44, 45].

АСИТ с использованием адъювантов. Используемые в терапии аллергены обладают заранее определенной активностью. Их применение с адъювантами, которые активируют иммунную систему и повышают иммуногенность, в большинстве случаев повышает эффективность терапии. Адъюванты представляют собой ряд цитокинов (ИЛ-18, ИЛ-12,), CpG ДНК (цитозин и гуанозин содержащие динуклеотидные последовательности ДНК), инактивированные термически бактерии *Listeria monocytogenes*, синтетические иммуномодуляторы и.т.д. Такие адъюванты стимулируют иммунную систему (ИС), антигенпредставляющие клетки (АПК), вызывают индукцию защитного типа иммунитета, блокирующего развитие Th2-типа ответа и эффекты эозинофилов.

АСИТ аллерготропинами. В последние десятилетия появилось новое направление по разработке и внедрению в клиническую практику препаратов и вакцин, модулирующих иммунный статус, на основе полиэлектролитов с определенной структурой. Один из хорошо изученных представителей этой группы - полиоксидоний - полимерное физиологически активное соединение. При конъюгации с полиоксидонием белков-аллергенов получают такое соединение как аллерготропин. Аллерготропины на основе пыльцы березы (Берпол), тимофеевки (Тимпол), и полыни (Полпол) исследовались как препараты для АСИТ больных с соответствующей сенсibilизацией. Основная часть пациентов, получивших лечение подобными препаратами, показала снижение тканевой и кожной чувствительности к специфическим аллергенам.

Терапия моноклональными антителами. Существует несколько других перспективных направлений сделать АСИТ эффективнее и привлекательнее для использования. В их рамках предполагается использование таких моноклональных антител, как анти-IgE (например, Омализумаб), чья способность блокировать аллергический ответ немедленной фазы на высоком уровне была доказана в США [46], так и анти ИЛ-4 антител.

1.5 Основные виды аллергенов

В настоящее время существует классификация аллергенов в соответствии с происхождением и путем поступления в организм [35].

- Ингаляционные – растительного (компоненты пыльцы и спор) и животного (перхоть животных, фрагменты клещей) происхождения.
- Пищевые: компоненты яиц, молока, рыбы, мяса, ягод, а так же пищевые добавки.
- Лекарственные: антибиотики, пенициллин, сульфаниламиды, салицилаты.
- Инфекционные: микробные, паразитарные, грибковые.
- Промышленные: полимеры, пестициды, металлы.

В составе аллергена возможно наличие множества видов белков, но только несколько из них обладают выраженной аллергической активностью. Подобные белки называют главными (основными) аллергенами. В свою очередь малыми аллергенами называются белки, имеющие небольшую сенсibilизирующую активность [47].

Далее представлено описание различных типов аллергенов.

Пищевые аллергены. Прогрессирование пищевой аллергии происходит из-за взаимодействия пищевых аллергенов с желудочно-кишечным трактом (ЖКТ) и ИС организма. Аллергенами являются белки пищевых продуктов. Также аллергенной активностью могут обладать пептиды, образовавшиеся в результате пищеварительного гидролиза. Сенсibilизация к пищевым аллергенам играет значительную роль в развитии болезней кожи (крапивница, атопический дерматит) и ЖКТ у детей раннего возраста, так же она оказывает влияние на формирование аллергической патологии дыхательных путей и редко других органов [48, 49].

Аллергены домашней пыли. Индукция специфического ответа на аллергены домашней пыли, обладающие высокой аллергенной активностью, является причиной развития болезней органов дыхания, значительно реже — поражений кожи, ЖКТ, глаз.

Среди клещей домашней пыли в развитии сенсibilизации основную роль играют *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), *Dermatophagoides farina* (Der f), и *Euroglyphus maynei* (Eur m) [50], составляющие в жилых помещениях

до 90% акарофауны. Антигены этих видов клещей сходны по строению, что становится причиной развития перекрестной аллергии.

Клещей чаще всего можно обнаружить в постели, особенно в матрацах, постельном белье, коврах, подушках, мягкой мебели. В спальнях наиболее благоприятен микроклимат для развития клещей. Источником питания для клещей служит омертвевший эпителий человека, питомцев, плесневые и дрожжевые грибы, остатки пищи. Большее количество клещей находится в городских домах, по сравнению с сельскими.

Выделяют две группы клещевых аллергенов рода *Dermatophagoides*. Первая группа представляет собой гликопротеиды и выделяется в основном из экстрактов клещевых фекалий, вторая группа содержится в теле клещей и имеет белковую природу, например в их хитиновом панцире. Риск развития чувствительности к аллергенам *Dermatophagoides* коррелирует с их концентрацией в помещениях. При анализе квартир Москвы, с проживающими в них детьми больными бронхиальной астмой и с аллергией на КДП, в 73,3% случаев обнаружены *D. farinae* и *D. pteronyssinus* (40% и 66,6% соответственно). Во всех обследованных квартирах аллергены клещей выявлены в существенных концентрациях в пыли.

Амбарные клещи также обладают аллергенными свойствами (*Glycyphagus*, *Tyrophagus*, *Acarus*, *Lepidoglyphus*) и играют некоторую роль в при аллергических болезнях органов дыхания. [50]. Местом их обитания также часто выступают жилища. Аллергия редко вызвана только одним видом клещей, чаще выявляется поливалентная клещевая сенсibilизация [51, 52].

Плесневые грибы часто входят в состав домашней пыли. По концентрации спор, обнаруживаемых в воздухе, лидером являются грибы рода *Aspergillus*, далее следуют *Candida*, *Penicillium*, *Alternaria*. Аллергическая активность зависит от концентрации их спор в помещении и биологических характеристик. Сенсibilизирующая активность грибов *Aspergillus* проявляется, например, при наличии в 1 м³ воздуха 100 спор, в то время как грибов рода *Cladosporium* необходимо на порядок больше — 3000 [53].

Некоторые виды споровых грибов (*Aspergillus*, *Alternaria*) разрастаются в жилых помещениях. Наибольшее их количество можно обнаружить в сырых, плохо вентилируемых помещениях, а так же помещениях с кондиционерами.

Основную сенсibilизацию вызывают именно споры грибов. Особую антигенную активность имеют соединения в составе протоплазмы и оболочки плесневых грибов, которые представляют собой белки и белково-полисахаридные комплексы. Идентичность для грибов всех видов полисахаридных комплексов говорит о том, что прогрессирование перекрестной аллергии к плесени связана, скорее всего, с наличием общих антигенных детерминант [54].

В настоящее время известны три категории заболеваний, вызываемых грибами рода *Aspergillus*:

1. Заболевания, связанные с гиперчувствительностью пациента: бронхиальная астма; экзогенный аллергический альвеолит;
2. Неинвазивный аспергиллез: аспергиллема хроническая и острая; гнойный бронхит.
3. Инвазивный легочный аспергиллез [55].

Образование спор усиливается в условиях высокой влажности и при высоких температурах, что объясняет сезонные вспышки заболевания [56, 57].

Аллергены домашних животных. Наиболее распространена аллергия на эпидермис кошек, собак, шерсть грызунов, на фрагменты тараканов, перо птиц, корм для рыбок. Эти аллергены в большом количестве скапливаются в домашней пыли, мягкой мебели [58, 59]. Чувствительность к аллергенам домашних животных обычно проявляется респираторной и кожной симптоматикой. Аллергены обитающих в домах насекомых, также могут сенсibilизовать организм до респираторной аллергии. Высокой аллергенной активностью обладают экскременты тараканов и их хитиновый покров, особенно вида *Blattella germanica*. В регионах с влажным и жарким климатом (страны Юго-Восточной Азии, некоторые районы США) сенсibilизация тараканами встречается чаще, чем пылью амброзии полыннолистной или

КДП [60, 61]. Нередко у больных бронхиальной астмой обнаруживаются специфические IgE-антитела к аллергенам таракана [62].

Пыльцевые аллергены. Из более 100 видов пыльцевых растений, половина может вызвать поллиноз. Аллергическими свойствами обладает пыльца опыляемых ветром растений, продуцирующих пыльцу большими количествами. Активность таких аллергенов определяется полипептидами, содержащимися в экстрактах пыльцы, причем у различных злаковых трав пыльца обладает антигенным родством, о чем свидетельствует сходство в аминокислотном составе, корреляции специфических IgE-антительных уровней к аллергенам тимофеевки и ржи в радиоаллергосорбентном тесте (РАСТ). При этом в 90% случаев наблюдается подавление этого теста аллергенами пыльцы овсяницы луговой и лисохвоста лугового. В поллиноз вносят лепту и пыльца деревьев — тополя, ясеня, березы, вяза, дуба, орешника, ольхи. Основной аллерген березовой пыльцы - гликопротеид с ММ около 10 000. Схожие аллергены выделены из пыльцевых зерен тополя пыльцы вяза [62].

Пыльца некоторых сорных трав обладает выраженной аллергенной активностью, в частности, амброзии, т.к. в сезон цветения обнаруживается её высокая экспозиция, что способствует возникновению амброзийного поллиноза. В экстракте пыльцы амброзии около 90% активности соответствует антигену Е, представляющему собой двухцепочечный высокомолекулярный (ММ 37800) фибриллярный белок. Значительно ниже концентрация антигена Е в стеблях и листьях амброзии [62].

Пыльца полыни так же является серьезным провокатором. В экстракте этого растения установлены 10 аллергенов. Различные виды полыни содержат различное количество аллергенов в их экстрактах, например, полынь горькая содержит 4 антигена. Установлено присутствие общих аллергенов в экстрактах полыни различных видов.

Аллергены ядов и тел насекомых. Насекомыми могут быть индуцированы аллергические реакции как у детей, так и у взрослых. Волоски, чешуйки крыльев, части тела насекомых, яд, секреты их защитных желез слюна, экскременты, содержат антигены и биоактивные соединения, способные

проникать в организм при контакте, укусе, или ингаляционным путем. Высокой аллергенной активностью обладает пчелиный яд. Основными аллергенами в яде являются мелиттин, гиалуронидаза, фосфолипаза, аллерген С и высокомолекулярная фракция с активностью кислой фосфатазы.

Химические вещества могут вызвать аллергические реакции. Участие химсоединений в патогенезе аллергических приобретает значение в связи с экологическими проблемами в некоторых регионах России и повсеместным использованием веществ в быту, производстве сельскохозяйственных продуктов, строительных материалов. Сенсибилизирующими свойствами обладают соли хрома, никеля, побочные продукты производства синтетических волокон, резины, ядохимикатов, фотореактивов, красителей, моющих средств. Химические соединения могут выступать полноценные антигены или гаптены, приобретающие антигенные свойства при взаимодействии с белками организма.

Ниже приводятся данные статистического обследования населения 10 Европейских стран (в том числе Швеция, Германия, Польша и др.) группой исследователей The European Community Respiratory Health Survey на предмет наличия сенсибилизации к наиболее распространенным аллергенам с использованием стандартного протокола. Группа добровольцев набиралась по методу случайной выборки [63].

Таблица 1 - Уровень атопии (%) у субъектов моложе и старше 45 лет на наиболее распространенные аллергены [50]

Возраст/аллерген	<45 лет	>45 лет
Пыльцевая аллергия		
Тимофеевка луговая	29	16
Береза	22	14
Полынь	13	7
Олива	6	4
Бытовая аллергия		
Собака	21	15
Кошка	19	12
Клещи домашней пыли	18	11

Таракан	5	5
Грибная аллергия		
Гриб <i>Alternaria</i>	6	2

Представленные данные показывают, что более 50% опрошенных имели приверженность к аллергии хотя бы одного из перечисленных типов, причем часто встречались добровольцы с перекрестно сенсibilизацией на несколько аллергенов из списка. Наиболее распространена аллергия на пыльцу, за ней следует аллергия на домашних животных и на клещей домашней пыли. Исследования такого рода позволяют задуматься о перспективах АСИТ и о целесообразности выбора того или иного аллергена в качестве биологически активного агента в разрабатываемом препарате [63].

1.6 Аллергены, используемые для АСИТ, и способы их модификации

При АСИТ применяются экстракты аллергенов, при их введении возникают серьезные побочные реакции, в особо тяжелых случаях возможен анафилактический шок и гибель больного [64]. Исходя из того, что такие вакцины являются комплексными смесями белков и небелковых соединений, для них является обязательной процедура стандартизации, направленная на определение меняющихся от партии к партии компонентов вакцин. Поскольку корреляция аллергенности экстрактов и содержания в них основных белков недостаточна, экстракты стандартизуют по их способности связываться с IgE антителами *in vitro*. Основная цель при разработке новых вакцин для АСИТ - поиск возможности блокировки перекрёстного связывания препарата с IgE во избежание риска побочных реакций.

Повышение эффективности и снижение угрозы АСИТ возможно при изменении поверхностной структуры антигенов, что можно достигнуть различными способами. Препараты, неспособные взаимодействовать с IgE, существенно более безопасны и могут быть использованы в дозах, превышающих многократно дозы для стандартных протоколов [65-67]. В настоящем времени основное внимание направлено на разработку гипоаллергенных конструкций.

Некоторые примеры аллергенов, модифицированных с целью понижения афинности к IgE, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Примеры некоторых модифицированных аллергенов, разработанных с помощью биотехнологических подходов

Источник аллергена	Аллерген	Подход	Свойства модифицированного аллергена	Литературный источник
Пыльца Береза	Bet v 1	Разделение на 2 фрагмента	Понижение связывание с IgE, сохранение уровня Т-клеточной реактивности	Vrtala et al. [68]
	Bet v 1	Замена аминокислот	Понижение связывание с IgE, сохранение уровня Т-клеточной реактивности	Vrtala et al. [68]
	Bet v 1	Формирование тримера	Понижение связывание с IgE, сохранение уровня Т-клеточной реактивности	Vrtala et al. [68, 69]
	Bet v 1	Образование изоформы	Понижение связывание с IgE, сохранение уровня Т-клеточной реактивности	Wagner et al.[70]
Постеница	Par j 1	Создание дисульфидных мостиков	Понижение связывание с IgE, кожный тест не дает реакции	Bonura [71]
	Par j 1	Замена аминокислот	Понижение связывание с IgE, кожный тест не дает реакции	Orlandi et al [72]
Тимофеевка луговая	Phl p 5	Внутренняя делеция	Понижение связывание с IgE, сохранение уровня Т-клеточной реактивности	Schramm et al.[73]
	Phl p 6	Внутренняя делеция	Понижение связывание с IgE и реактивности на кожный тест	Vrtala et al [74]
	Phl p 7	Вставка синтетического фрагмента	Отмена связывания с IgE	Westritschnig et al. [75]
Клещи домашней пыли	Der f 2	Замена аминокислот	Понижение связывание с IgE, нулевая реактивности на кожный тест	Takai et al.[76]
	Der f 2	Перетасовка ДНК с Gly 2	Понижение связывание с IgE, сохранение уровня Т-клеточной реактивности	Gafvelin et al. [77]
Животные Кошка	Fel d 1	Разрыв дисульфидных связей	В 500 раз более низкий уровень связывания с IgE	Saarne et al. [78]

Активация тучных клеток и инициация немедленного ответа может быть подавлена и другим способом – с помощью фрагментирования аллергена на пептиды, не связывающиеся с IgE.

При иммунотерапии и диагностике аллергии также возможно использование рекомбинантных аналогов экстрактов природных аллергенов, что упростит процедуру стандартизации препаратов для АСИТ. Иммунизация рекомбинантными белками в ряде опытов приводила к выраженному IgG1 и IgG4 ответу и индукции ИЛ-10-продуцирующих Т-клеток, как показали клинические испытания [36]. Применение рекомбинантных белков-аллергенов при АСИТ помогает избежать формирования специфической чувствительности к другим компонентам, входящим в состав экстрактов аллергенов. Основным недостатком рекомбинантных аллергенов, тем не менее, является экспрессия полноразмерными белками всех эпитопов IgE, характерных для природных аналогов.

1.7 Зависимость эффективности АСИТ от вводимой дозы

Снижение аллергенспецифического иммунного ответа достигается путем введения больному достаточной дозы аллергенной вакцины (аллергенов). При этом зависимость эффективности вакцинации от дозы вводимого препарата при иммунотерапии представляет собой область, интересующую современное ученое сообщество.

Подобное исследование недавно было проведено группой ученых организации ЕААСI [79]. В нем был проанализирован перечень работ, отвечавших критерию включения, и нацеленных на исследование влияния доз на клиническую эффективность препаратов. Показана невозможность сравнительного анализа дозовой зависимости из-за несопоставимости параметров (различия в референс-материалах, дизайнах исследования, методологии определения аллергенов, и др.).

Тем не менее, в кругах специалистов превалирует мнение о положительном высокодозовом лечебном эффекте АСИТ в сравнении с низкодозовым режимом [80].

На данную теорию опирается использование метода ускоренной (от англ. «rush») терапии. Rush-схема представляет собой введение терапевтически необходимой дозы аллергена в течение 3 дней в равных

объемах, причем интервал между введениями составляет 3 часа. Введение аллергена дополняется одновременными инъекциями адреналина.

Работы, выполненные на основе математического моделирования, показали, что режим инъекций высокими дозами с короткими интервалами способен усиливать эффекты иммунотерапии, а именно пролиферацию регуляторных Т-клеток и супрессию Th2 [81].

Несколько работ, осуществленных на мышинных моделях, также выявили очевидную корреляцию между вводимой дозой и образованием у мышей протективного IgG-ответа на аллерген. Помимо этого было показано, что доза антигена может влиять на развитие определенного ответа антител, т.е. низкая доза антигена индуцирует оптимальный отклик IgE, в то время как высокая доза индуцирует реакцию IgG2a *in vivo* [82].

На рисунках 3 и 4 представлены 2 независимых эксперимента, в рамках которых мыши иммунизировались гемоцианином лимфы улитки (KHL) или овальбумином (OVA) в низких и высоких дозах [83, 84].

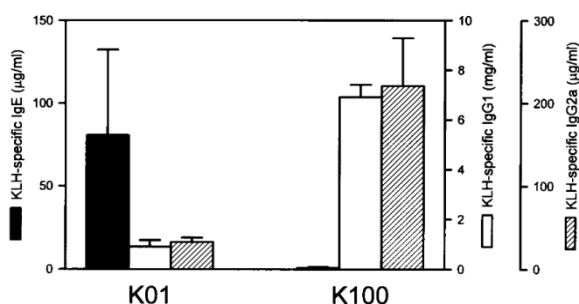


Рисунок 1. Концентрация KLH-специфических антител в иммунных сыворотках мышей линии СВА/J, неоднократно иммунизированных низкими дозами (K01) или высокими дозами (K100)

Сыворотки брали через 80 дней после начала иммунизации. Титры IgE (закрытые бары), IgG1 (открытые бары) и IgG2a (заштрихованные столбцы) были определены методом KLH-специфического ИФА. Были проанализированы группы из четырех животных [83].

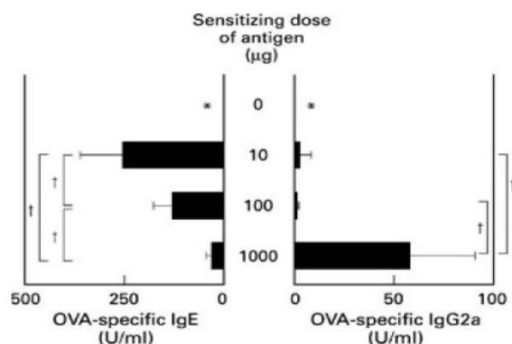


Рисунок 2. Титры специфичных к овальбумину (OVA сыворотки IgE (слева) и IgG2a (справа). Значения представляют собой среднее по группам, содержащим по шесть мышей в каждой

В группах мышей, иммунизированных дозами по 10 мкг и 100 мкг OVA выявлен высокий титр IgE, при низком титре IgG2a. В противоположность этому, группы 1000 мкг показали наивысший уровень IgG2a и самый низкий титр IgE [84].

Таким образом, увеличение дозы вводимого аллергена влияет на повышение продукции IgG с одновременным угнетением IgE ответа, что является желательным эффектом при АСИТ. К сожалению, существующие методы иммунотерапии не могут позволить повысить вводимые дозы в протоколе вакцинации, т.к. это может повлечь за собой ряд нежелательных реакций, в том числе анафилактический шок. Поэтому актуальным вопросом в настоящее время является поиск методов снижения перекрестного связывания вводимых аллергенов с иммуноглобулинами Е, активирующими воспалительные реакции.

1.8 Системы адресной доставки лекарственных агентов на основе полимеров

Разработка новых эффективных систем доставки лекарственных средств является актуальной задачей современной биотехнологии. В настоящее время разработан и введен в клинику ряд систем для доставки лекарственных средств, которые позволяют значительно улучшить адресность и уменьшить возможные побочные эффекты. Актуальными являются разработки, в которых используются синтетические и природные полимеры (полимерные мицеллы,

дендримеры, наногели, нанокапсулы, нано- и микрочастицы) и липосомные системы.

Таблица 3 - Природные и синтетические полимеры, а также их комбинации, используемые для средств доставки лекарственных средств

Природные полимеры	Синтетические полимеры [85]	Комбинации природных и синтетических полимеров [86]
Анионные полимеры: Гиалуроновая кислота Альгиновая кислота Катионные полимеры: Хитозан, Полилизин Амфифильные полимеры: Коллаген и желатин Фибрин Нейтральные полимеры: Декстран, Пуллулан	Полиэтиленгликоль, Полипропиленгликоль, Полимолочная кислота, Сополимеры молочной и гликолевой кислот, Поликапролактон, Полигидроксибутират, Поливинилацетат, Полифосфазены, Полифосфоэферы,	ПЭГилированные пептиды и полисахариды, Коллаген-акрилат, Альгинат-акрилат, Сополимеры поли(N-изопропилакриламида) с полисахаридами (гиалуроновой кислотой, декстранами).

В настоящем обзоре более подробно рассматриваются альгинат и хитозан, входящие в группу природных биополимеров и находящие широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности. Альгинат в пищевой промышленности используется в качестве загустителя, эмульгатора и стабилизатора. Хитозан является потенциально полезным фармацевтическим материалом, благодаря его хорошей биосовместимости и низкой токсичности. Далее описаны источники, физические и химические свойства этих полимеров, а так же механизмы формирования гидрогелей и модификаций, которые увеличивают эффективность инкапсулирования терапевтических агентов.

1.9 Альгинат натрия (альгиновая кислота)

Альгиновая кислота и её соли — полисахарид, вязкое резиноподобное вещество, извлекаемое из бурых водорослей *Phaeophyceae* (ламинария японская). Содержание альгиновой кислоты в ламинарии колеблется от 15 до 30%. Альгиновая кислота является высокомолекулярным полисахаридом, который представляет собой блок-сополимер D-маннуроновой и L-гиалуруновой кислот. Их соотношение и определяет физико-химические свойства полисахарида.

Альгиновая кислота нерастворима в воде и в большинстве органических растворителей. Одна часть альгиновой кислоты адсорбирует 300 массовых частей воды, что обуславливает её применение в качестве загустителя.

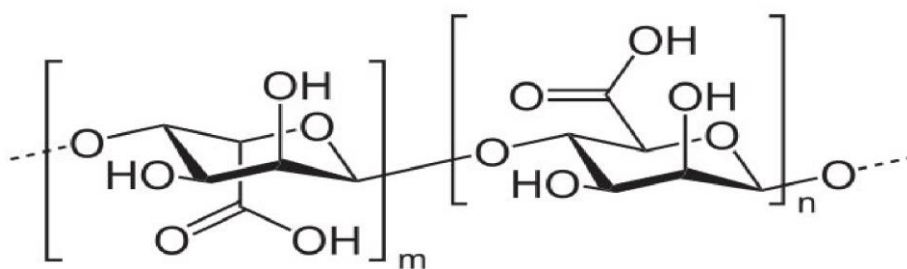


Рисунок 3. Структура альгиновой кислоты

Соли альгиновой кислоты — альгинаты, в частности альгинат натрия и калия в воде образуют коллоидные растворы, в отличие от нерастворимой альгиновой кислоты. В бурых водорослях альгиновые кислоты содержатся в форме растворимых и нерастворимых солей - альгинатов калия, натрия, магния, кальция.

Альгинат взаимодействует с хитозаном, выступая в качестве противоиона, образуя полиэлектролитные комплексы (ПЭК). ПЭК образуются самопроизвольно и не требуют агрессивных сред и сшивающих агентов. Недостаток метода образования ПЭК заключается в его рН зависимости. Хитозан представляет собой слабую кислоту, альгинат - слабое основание, поэтому при изменении значения рН комплексы могут распадаться. Если

предполагается использование конъюгатов в широком диапазоне рН, необходимо разработать метод более прочного связывания комплексов. В настоящей работе была рассмотрена эта проблема и были найдены пути её решения.

1.9.1 Биосовместимость

Альгинат широко используется в пищевой промышленности в качестве загустителя, эмульгатора и стабилизатора. Широкое использование альгинатов обусловлено их хорошей переносимостью и безвредностью, они включены в группу соединений, признанных безопасными (GRAS). Применение их в медицине в настоящее время значительно возросло.

Альгинаты не изменяют водно-солевой баланс, не поглощают в кишечнике сероводород, необходимый для перистальтики, не претерпевают метаболических превращений в организме, не токсичны и выводятся из организма в течение 24-48 ч.

При пероральном введении альгината не наблюдалось возникновение специфических иммунных реакций, таким образом, альгинат является нетоксичным и биологически разлагаемым носителем при пероральном применении [87]. Несмотря на большое количество исследований в области биосовместимости альгината, существуют некоторые разногласия на этот счет. В случае внутривенного введения, для большинства коммерческих альгинатов была зарегистрирована индукция внешней иммунной реакции и фиброз [88], в то время как другие отчеты показывают отсутствие иммунной реакции на введенные имплантаты из альгината [89]. Коммерчески доступные альгинаты, очищенные методом электрофореза в свободном потоке, не провоцировали специфические реакции, по крайней мере, в течение 3-х недель после имплантации в брюшную полость грызунов [90]. Таким образом можно предположить, что иммунный ответ на внутривенные инъекции был опосредован токсичными примесями в коммерческих препаратах.

1.9.2 Инкапсуляция белков в альгинат

Частицы, на основе альгината натрия можно получить при добавлении раствора его солей в дивалентный сшивающий раствор, содержащий ионы Ca^{2+} , Sr^{2+} или Ba^{2+} . В процессе капсулирования препаратов сохраняется их биологическая активность, т.к. микросреда в альгинатных частиц в большинстве случаев относительно инертна по отношению к белковым препаратам и клеткам, тем не менее, положительно заряженный белок может конкурировать с ионами кальция за функциональные группы карбоновых кислот на альгинате. В таких случаях может возникнуть необходимость в добавках, защищающих активное вещество от действия альгината. Например, добавление анионного полимера (полиакриловой кислоты) экранирует TGF-1 от взаимодействия с альгинатом и позволяет сохранить его активность [87]. Альгинат в виде частиц, частиц с оболочкой и микрокапсул применялся для инкапсуляции таких белков, как мелатонин [91], гепарин [92], гемоглобин [93], и др. вакцины [94] и т.д.

1.9.3 Высвобождение активных агентов

Белки, инкапсулированные в альгинатные матрицы, высвобождаются по одному из двух механизмов: (1) диффузией белка через поры полимерной сетки и (2) деструкцией полимерной сети. Для контролируемой доставки белковых препаратов, деградация сети геля не является подходящей, так как это может привести к неконтролируемому высвобождению белка, поэтому в данном случае подходящим будет использование частиц, высвобождающие препарат через поры. Как было показано, размер частиц, при котором происходит данная диффузия, составляет от 5 до 200 нм, причем, поры на поверхности частиц меньше, чем в ядре геля.

В отличие от препаратов с низкой ММ, диффузия крупных белков из гелей зависит от их молекулярной массы. Помимо этого, важным параметром, определяющим эффективность контролируемого высвобождения лекарственного средства из альгинатной матрицы, также является заряд частиц. В случае использования препарата с суммарным положительным зарядом,

возможно его взаимодействие с отрицательно заряженными группами альгината, что может значительно замедлить диффузию [95], по сравнению с препаратом, обладающим суммарным отрицательным зарядом. Пористость, которая является важным фактором в определении высвобождения лекарства из альгината, может быть значительно снижена путем частичной сушки гранул. Полное обезвоживание, тем не менее, может приводить к растрескиванию поверхности, что облегчает эрозию поверхности гранул при повторной гидратации, поэтому оптимизация способа сушки и её степени, являются важными факторами, влияющими на скорость высвобождения лекарственного средства. Размеры пор альгинатных частиц также можно контролировать: при понижении рН происходит уменьшение размера пор альгината [96]. Кроме того, на скорость высвобождения белков влияет процентное содержание альфа- α -L-гиалуроновой кислоты. Наиболее быстрый темп высвобождения был показан при низкой концентрации α -L-гиалуроновой кислоты и альгинате с малой ММ [97].

1.10 Хитин, хитозан и его производные

Хитин является распространенным в природе биополимером, молекулярная масса которого составляет примерно 3 тыс. кДа (Рисунок 4). По стереохимическим свойствам он сходен с целлюлозой, однако наличие в молекуле ацетамидных групп придает ему особые свойства, такие как механическая прочность и нерастворимость, благодаря чему он является основой экзоскелета насекомых и ракообразных. По распространенности в живой природе хитин занимает второе место после целлюлозы. Основным сырьем для получения хитина являются лангусты, омары, панцири крабов и креветок.

Хитин представляет интерес как источник глюкозамина, который широко используется в организме человека для синтеза важных в функциональном отношении биополимеров, таких как гликотепины и полисахариды.

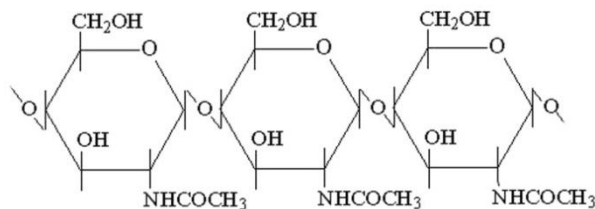


Рисунок 4. Химическая структура хитина

Благодаря высокой механической прочности, хитин используется для получения волокон и пленок, вместе с тем этот полимер характеризуется радиационной устойчивостью. Однако для практического применения более ценным в практическом отношении является его дезацетилированное производное - хитозан [98].

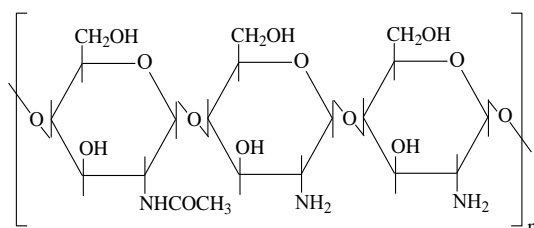


Рисунок 5. Химическая структура хитозана

Хитозан — гидрофильный катионный биополимер, получаемый дезацетилированием хитина в достаточно жестких условиях (Рисунок 5). Фрагмент хитозана, представляет собой блок из остатков двух моносахаридов, а именно 3-(1-4)-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил- D-глюкозамина.

1.10.1 Свойства и области применения хитозана

Как упоминалось выше, хитин и хитозан по строению близки к целлюлозе - широкораспространенному волокнообразующему природному полимеру. Широта спектра практического применения хитозана и огромное количество перспективных разработок в этой области определяются уникальным сочетанием ряда полезных свойств этого вещества, а именно [99, 100]:

- Биосовместимость (нет отторжения в живых тканях организма)[101-103];

- Биodeградируемость (разлагается природными ферментами) [104];
- Бактериостатичность, (замедляет размножение и рост бактерий), противовоспалительная активность [105];
- Высокая реакционноспособность, обладает двумя типами реакционноспособных групп (за счет чего изготавливается ряд хитозановых производных); [106]
- Сорбционная способность (радионуклидов, переходных и тяжелых металлов); является антиоксидантом [107],
- Противоопухолевая [108] и иммуностимулирующая [109] активность;
- Селективность (возможность разделять ряд металлов);
- Способностью поглощать жиры низкой плотности и холестеринный комплекс [110].

Наличие реакционноспособных гидроксо- и амино- групп, возможность введения различных ионогенных группировок основного и кислотного характера делают хитозан и его производные перспективными для использования при очистке и разделении и биологически активных соединений (аминокислот, стероидов, нуклеиновых кислот и продуктов их гидролиза).

Сульфат хитозана имеет антикоагулянтную активностью, возрастающую при увеличении степени сульфатирования. Аналогичными свойствами обладают N- и O-сульфатированные производные частично дезацетилированного карбоксиметилхитина, которые не только препятствуют свертыванию крови благодаря селективной адсорбции антитромбина, но и резко уменьшают интенсивность деления раковых клеток. Эти свойства полимеров хитозана позволяют использовать их для достижения синергического эффекта (усиления активности гепарина), и делает эти соединения перспективными для создания лекарственных препаратов антикоагулянтного и антисклеротического действия, что часто используется для лечения тромбозов.

Еще одна возможность использования хитозана и производных хитина и хитозана (карбоксиметилхитина, карбоксиметилхитозана, сукциноилхитозана) - создание биodeградируемых носителей фармацевтических препаратов

(антибиотиков, противовирусных, противоопухолевых и антиаллергенных препаратов) в виде наночастиц. Применение таких наночастиц создает условия для высвобождения биоактивных агентов, обеспечивая эффект пролонгирования их действия и адресности доставки [111, 112].

При разработке вакцин хитозан и его производные нашли широкое применение в качестве адъюванта, усиливающего выработку антител в ответ на вводимый вместе с хитозаном антиген [113, 114]. Так же хитозан может использоваться непосредственно как носитель и структурный компонент, стимулирующий активацию и позволяющий управлять типом иммунного ответа [115-117]. Было показано, что молекулярная масса не оказывала существенного влияния на адъювантные свойства хитозана [118], однако, с увеличением степени дезацетилирования увеличивался IgG-ответ на введение модельных антигенов Asp f 2 и овальбумина. Модификация цепи хитозана остатками сахаров (галактозы, глюкозы, маннозы, глюкозамина, лактобионовой кислоты) и высших карбоновых кислот (пальмитиновой, олеиновой) не влияет на адъювантные свойства хитозана. В другой работе в исследованиях на модели вируса гриппа была показана обратная зависимость адъювантной активности от молекулярной массы хитозана [119].

Предположительно, данные различия в результатах исследований адъювантной активности хитозана, полученных различными группами, зависят от физико-химических свойств хитозана, а так же от природы антигена и обусловлены различиями во взаимодействии антигена с хитозаном и системы антиген-адъювант с клетками организма.

1.10.2 Биосовместимость и биоразлагаемость хитозана

Хитозан продается по всему миру в качестве компонента для изделий немедицинского профиля, широко используется в пищевой промышленности и является одобренной пищевой добавкой в Японии. Он также выступает в роли адсорбента, снижающего уровень холестерина [120] благодаря способности улавливать липиды в кишечнике, что обусловлено его катионной природой [121]. При попадании в организм человека хитозан метаболизируется

лизоцимом [122]. В 2002 году в четвертое издание Европейской Фармакопеи была включена монография, посвященная гидрохлориду хитозана.

Отдельные исследования проводились для определения иммунного ответа на хитозан. В одной из работ с использованием белкового адъюванта было показано наличие в сыворотке крови антител против хитозана, причем уровень их связывания возрастал в зависимости от СД с 30 до 75%, что может быть объяснено влиянием заряда полимера на связывание с антигеном [123], в то же время молекулярная масса не оказывала влияния на образование антител. В другой работе, наоборот, не было выявлено заметного уровня образования антител против хитозана при исследовании иммунного ответа на хитозановые скаффолды, введенные в брюшную полость [124]. Принимая во внимание малое количество опубликованных экспериментальных данных, на сегодняшний день нельзя с уверенностью говорить о способности хитозана вызывать значимый синтез антител.

1.10.3 Методы получения хитозана

В основе получения хитозана лежит реакция отщепления от структурной единицы хитина – N-ацетил-D-глюкозамина ацетильной группировки. Реакция деацетилирования наряду с отщеплением ацетильных групп сопровождается одновременным разрывом гликозидных связей полимера, т.е. уменьшением молекулярной массы, изменением надмолекулярной структуры, степени кристалличности и т.д. В связи с расширением сферы применения хитозана, в том числе в медицине, были разработаны методы получения олигосахаридов хитозана с различной ММ.

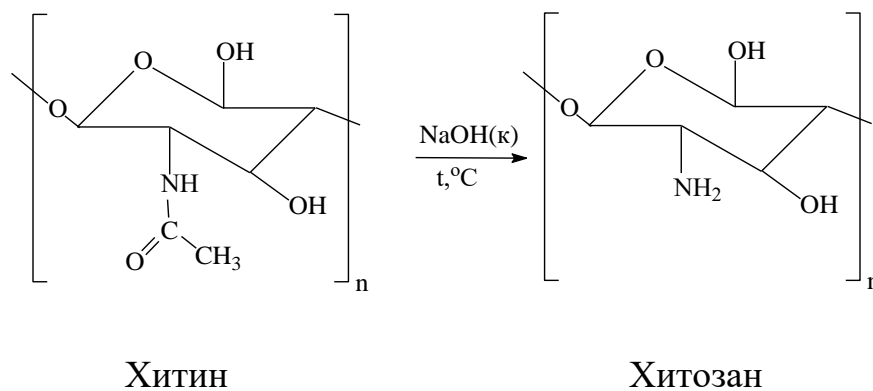


Рисунок 6. Процесс получения хитозана путем щелочного гидролиза хитина

Общепринятой процедурой получения хитозана является длительное кипячение хитина в 40% NaOH (рисунок 6) с последующей обработкой 1% NaBH₄ для восстановления концевых альдегидных групп. В результате, при соответствующей оптимизации условий, получают, например, полимер со следующими параметрами: молекулярная масса 3·тыс. кДа, и степень деацетилирования 75-85%. Этот препарат растворяется в разбавленной кислоте и в некоторых апротонных растворителях, таких как диметилацетамид и N-метил-2-пирролидон [125].

В зависимости от условий реакции получают хитозаны, существенно различающиеся величиной деацетилирования, известны коммерческие препараты со степенью деацетилирования 85 и 94% (фирма Sigma). Деполимеризация хитозана осуществляется как химическим путем, например, кислотным [126] или основным гидролизом, так и с помощью ультразвука [127], или ферментативно [128].

При проведении кислотного гидролиза с использованием соляной кислоты происходит уменьшение средней ММ полимера и его вязкости. Конкретные значения ММ получаемого полимера зависят от степени деацетилирования применяемых образцов, температуры и времени проведения процесса. Однако кислотный гидролиз имеет целый ряд недостатков, а именно: жесткие условия проведения процесса, низкий выход олигосахаридов хитозана, в том числе модификация углеводных остатков и трудность регулирования процесса.

Эти недостатки отсутствуют при проведении ферментного гидролиза. Ферментный гидролиз хитозана осуществляется в мягких условиях, проводится быстрее и легче, чем кислотный гидролиз. Ферментный гидролиз также минимизирует изменения в химической природе хитозана.

В качестве ферментных препаратов для деградации хитина и хитозана применяют комплексы ферментов различного происхождения. Это могут быть ферментные комплексы гепатопанкреаза краба или криля, а также панкреатин из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Наиболее эффективными ферментами для гидролиза являются хитиназа и хитозаназа, которые широко распространены в грибах, бактериях и растениях. Хитиназа гидролизует хитин и его олигомеры, а хитозаназа гидролизует хитозан, но не хитин [129].

Гидролитическая активность ферментного комплекса имеет широкий спектр и зависит от температуры и концентрации раствора хитозана (раствор хитозана в NaOH). При регулировании концентрации раствора хитозана и температуры проведения процесса удается достигнуть максимального выхода хитозана с низким молекулярным весом. Недостатком метода является то, что после трех часов гидролиза биокатализаторы теряют свою активность и их приходится реактивировать. Однако по сравнению с кислотным гидролизом этот метод является наиболее эффективным, так как удается получить олигосахариды хитозана с молекулярным весом 2-9 кДа, растворы которого обладают низкой вязкостью и хорошо растворимы в воде [130].

Применение ферментных веществ для расщепления хитозана помогает получать хитозаны с низкой молекулярной массой и олигомеры, растворяющиеся в воде и при этом обладающие более высокой биологической активностью, если сравнивать с высокомолекулярными хитозанами. Подобные свойства хитозанов с низкой ММ значительно расширяют сферу их применения в медицине. В частности, на основе таких хитозанов разработаны эффективные хиральные селекторы различных субстанций, радиопротекторы, антикоагулянты с гепариновой активностью [131].

Таким образом, решающими параметрами, которые определяют макроструктуру такого линейного и жестко-цепного полимера, как хитозан, и

поведение полимера в водных растворах с различной величиной рН, являются степень деацетилирования и молекулярная масса.

Другим способом изменения поведения хитозана в водных растворах и *in vivo*, является введение соответствующих лигандов, позволяющих регулировать кислотно-основные и гидрофобно-гидрофильные свойства полимера.

1.10.4 Модификация хитозана

Производные хитозана получают путем модификации -ОН и -NH₂ функциональных групп. Далее приводится описание наиболее часто используемых методов ацилирования хитозана по аминогруппе.

Ацилирование двухосновными карбоновыми кислотами (карбоксиилирование) проводят ангидридным методом [132]. В литературе описана серия карбоксилпроизводных хитозана. Как описано ниже, наибольший интерес по ряду причин представляет сукцинилированный продукт (хитозан, карбоксиилированный ангидридом янтарной кислоты). Согласно типовой методике, хитозан растворяют в 0,1 - 5% уксусной кислоте и разбавляют метанолом в отношении 4:1. К исходному раствору добавляют ангидрид янтарной кислоты, и смесь перемешивают в течение 12 ч. Растворитель (метанол) удаляют на роторном испарителе, продукт реакции осаждают 5 объемами ацетона. Степень N-сукциноилирования можно варьировать, изменяя соотношение реагентов. Из литературных данных следует, что для этого соединения была найдена оптимальная степень замещения, при которой продукт растворялся при различных значениях рН (в частности при физиологическом значении рН=7,4). К тому же, янтарная кислота является метаболитом, что также подчеркивает целесообразность использования выбранного лиганда. Наряду с этими преимуществами, благодаря наличию карбоксильных групп, хитозан используется как носитель для иммобилизации пептидов, белков, антибиотиков и других биологически активных агентов, содержащих аминогруппу.

В качестве ацилирующих агентов также используются низшие жирные кислоты, высшие жирные кислоты, непредельные жирные кислоты и аминокислоты. Реакции с указанными типами соединений необходимо проводить в разных условиях в зависимости от реакционной способности соответствующих лигандов. Исторически первым методом частичного или полного ацилирования хитозана является хлорангидридный метод [133]. Ацилирование проводят в присутствии большого избытка пиридина, при этом происходит модификации как амино- так и гидроксильных групп, для получения N-ацил производного, сложные эфиры гидроксигрупп омыляют спиртовым раствором гидроксида натрия. Метод не нашел практического применения ввиду его трудоемкости и невозможности регулирования степени замещения. В течение длительного времени, N-ацилированный хитозан получали ангидридным методом [134].

Типовая методика заключается в следующем: хитозан растворяют в 10% уксусной кислоте, разбавляют 5-кратным объемом метанола и при постоянном перемешивании добавляют ангидрид (2-3 экв. ангидрида карбоновых кислот на 1 аминогруппу матрицы). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Метанол упаривают на роторном испарителе. Продукт осаждают 5-ю объемами ацетона для удаления избытка ангидрида жирной кислоты и фильтруют. Так были получены производные низших жирных кислот с длиной цепи C₂-C₆.

Кроме того, остатки низших жирных кислот можно использовать в форме активированных эфиров. Модификация проводится 2 стадии. На первой стадии получают N-оксисукцинимидный эфир. А на второй - проводят реакцию ацилирования в водно-органической среде по стандартной методике, описанной выше. Аналогичным образом проводят ацилирование непредельными кислотами (олеиновая кислота).

Отдельные трудности встречаются при работе с высшими жирными кислотами (ВЖК) (C>12). Известно, что ангидриды ВЖК малореакционноспособны из-за стерических эффектов, в результате достигают высокой степени ацилирования только при нагревании реакционной смеси на

кипящей водяной бане и в присутствии пиридина. Кроме того, реагенты берутся в большом избытке (15 мкм ангидрида ВЖК на 1 аминогруппу хитозана). Серия продуктов, полученных N-ацилированием хитозана пальмитиновой и стеариновой кислотой, с разной степенью замещения была нерастворима в воде в широком диапазоне pH. Однако при введении пальмитиновой кислоты с соотношением менее 10/100 образующееся производное является растворимым в водных буферных растворах. По аналогичным методикам можно проводить ацилирование хитозана другими типами лигандов, содержащими карбоксильные группы.

1.10.5 Методы иммобилизации биоактивных лигандов на хитозан

Иммобилизацию биоактивных лигандов (белков, пептидов, антибиотиков и др.) на матрице можно осуществлять, активируя карбоксильную группу матрицы или лиганда. Ниже будут рассмотрены методы активации карбоксильной группы матрицы.

Активированные эфиры давно и широко используются в пептидной химии. На сегодняшний день известно огромное количество активированных эфиров, разработано множество методов их использования, наибольшую популярность из которых приобрел метод с использованием N-оксисукцинимидного эфира (Рисунок 7). Две карбонильные группы в гетероциклическом ядре значительно снижают электронную плотность на атоме углерода СО-группы аминокислоты, что значительно облегчает атаку нуклеофилами. Лёгкость получения N-оксисукцинимидных эфиров в кристаллическом виде, отсутствие рацемизации пептидов при их использовании, высокая реакционная способности эфиров и растворимость в воде продукта реакции – N-оксисукцинимиды сделали активированные N-оксисукцинимидные эфиры чрезвычайно популярными реагентами для образования пептидной связи [135].

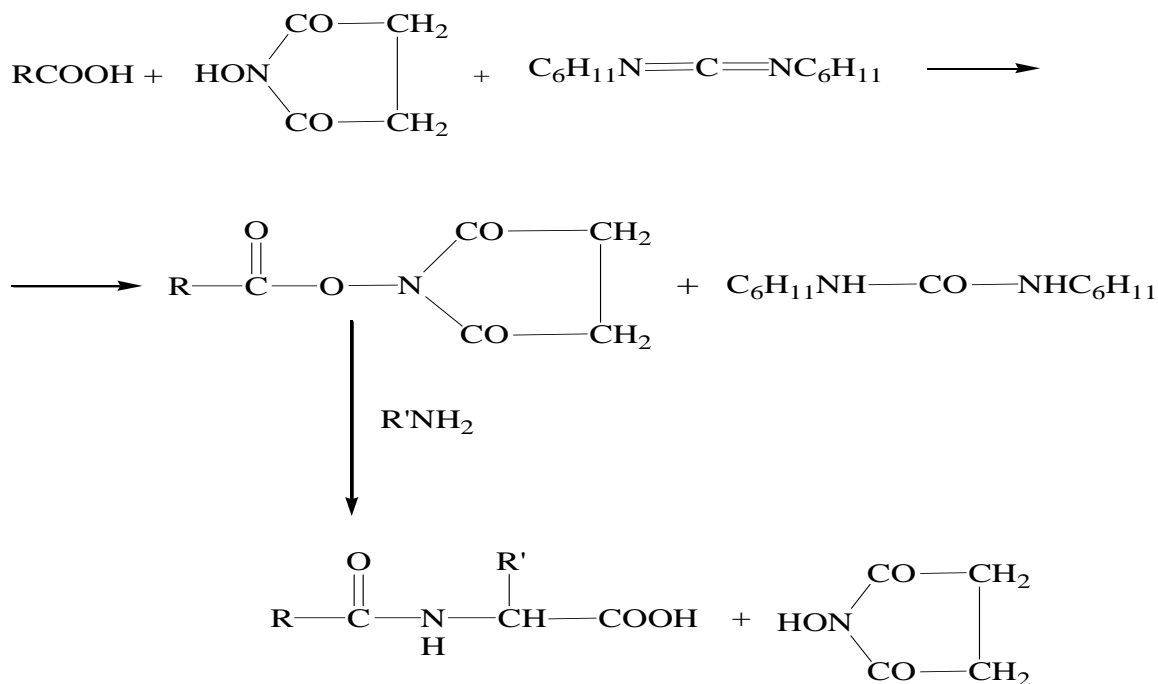


Рисунок 7. Образование пептидной связи через реакцию с N-оксисукцинимидным эфиром

Полученные эфиры жирных кислот используются для ацилирования аминокислот. Эфир добавляют к раствору натриевой соли аминокислоты в водно-органической среде, и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч. После удаления растворителя продукт перекристализовывают из хлороформа.

Карбодиимидный метод был введен в практику после использования дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) в качестве водоотнимающего средства. Простота, высокая скорость реакции и возможность ее проведения в водной среде способствовали быстрому и широкому распространению этого метода [136]. Однако образование трудноотделимой дициклогексилмочевины, а так же высокая реакционная способность побочных продуктов (рисунок 8) не позволяли работать с чувствительными карбоксильными компонентами.

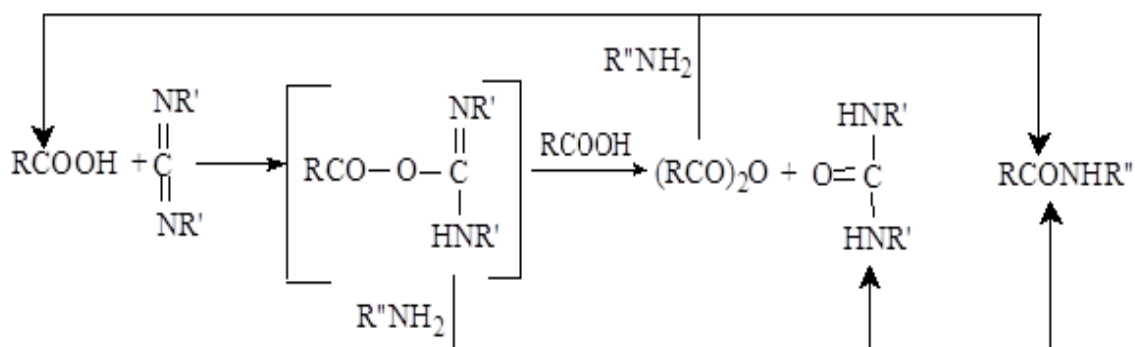


Рисунок 8. Активация карбоксильной группы карбодиимидным методом

Установлено, что протекание побочных реакций можно существенно уменьшить, если проводить конденсацию в присутствии нуклеофила, быстро реагирующего с О-ацилизомочевинной с образованием ацилирующего агента, который достаточно реакционноспособен для аминирования, но более избирателен и не вызывает рацемизации или побочных реакций. Первым реагентом такого вида был N-оксисукцинимид, который эффективно подавляет образование N-ацилмочевины и снижает рацемизацию.

Несмотря на то, что дициклогексилмочевина очень плохо растворима, иногда ее не удается полностью удалить из реакционной смеси, поэтому количественное отделение ее от продукта реакции в ряде случаев бывает затруднительным. Водорастворимый N-этил-N'-диметиламинопропил-карбодиимид позволяет решить не только эту проблему, но и проблему удаления N-ацилмочевины (если она образуется), поскольку в этом случае сопутствующие и побочные продукты можно удалить экстракцией, используя аминную функцию в качестве «якоря» [104].

1.11 Наночастицы на основе хитозана

Наночастицы (НЧ) - объекты округлой или овальной формы, размер которых варьирует в диапазоне от 1 до 1000 нанометров, на данный момент представляют огромный интерес для ученых всего мира благодаря свойствам, позволяющим использовать их в медицине и многих других сферах. НЧ активно применяются в разработке систем контролируемой доставки

препаратов, т.к. могут значительно продлить персистенцию лекарств в организме и позволяют контролировать их высвобождение. Общая доза и кинетика высвобождения лекарств может изменяться за счет варьирования отношения полимеров при сборке частиц, их молекулярной массы, концентрации и др. Государственная программа США «National Nanotechnology Initiative» внесла огромный вклад в изучение НЧ.

Частицы получают из различных синтетических и природных полимеров, из различных производных хитозана. Молекулы хитозана в основном растворимы при кислом рН. При переводе в нейтральную среду хитозан спонтанно собирается в комплексы, которые при соблюдении определенных условий также попадают по размеру в диапазон наночастиц [137]. Таким образом, растворы хитозана при нейтральных рН представляют собой суспензию наночастиц.

Основными параметрами НЧ, получаемых на основе полимеров, считается их поверхностный заряд и размер. Было показано, что НЧ <100 нм проявляют большую токсичность, чем микрочастицы размером >100 нанометров [138-141].

Роль заряда в эффективности доставки препаратов и токсичности изучается многими группами [142]. Хитозан - природный поликатион, но наличие реакционноспособных групп на молекуле позволяет получать ряд производных с отрицательным зарядом [143]. Несколькими группами ученых было показано, что фагоцитоз положительно заряженных НЧ более эффективен, чем отрицательно заряженных, полученных на основе различных производных хитозана [144]. Другие коллективы не находили разницу между частицами с разным зарядом [145, 146], также существуют рекомендации по использованию отрицательно заряженных производных хитозана при разработке систем парентеральной доставки лекарств для терапии опухолей, а положительно заряженных – при разработке вакцин, в качестве иммуностимулятора и детоксиканта [147].

1.11.1 Методы получения наночастиц на основе хитозана

На данный момент в литературе описан и используется в лабораториях широкий спектр методов получения частиц из хитозана и его производных, что обусловлено, в том числе, наличием в составе полимера большого количества реакционноспособных групп, а так же отсутствием необходимости работы в агрессивных условиях. Наиболее часто используемые методы перечислены в обзоре ниже.

1.11.1.1 Получение наночастиц методом гелеобразования

Широко используемый метод получения НЧ с помощью гелеобразования основан на агрегации частиц хитозана и его производных с молекулами, имеющими противоположный заряд, или при добавлении сшивающего агента. В качестве сшивающих агентов применяются растворимые соли кальция, бария и др. источники катионов, с которыми взаимодействуют гидроксильные группы хитозана.

Одним из наиболее активных сшивающих агентов для хитозана является триполифосфат натрия. В процессе его смешивания с раствором хитозана при комнатной температуре наблюдается образование НЧ, что обусловлено взаимодействием противоположно заряженных групп [148]. При образовании НЧ хитозан-желатин [149], несущих инсулин, минимальный размер частиц и максимальная загрузка инсулина в частицы были достигнуты при концентрации хитозана 10 мг/мл, желатина 5 мг/мл, инсулина 5 мг/мл. Другими авторами исследовались НЧ хитозана, полученные методом гелеобразования, нагруженные катионами Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , и Fe^{2+} [150]. Катионы металлов значительно увеличивают заряд частиц, улучшая таким образом их стабильность и антибактериальный потенциал.

Метод ионотропного гелеобразования широко применяется для капсуляции белков и других биологически активных агентов в связи с его простотой и отсутствием необходимости использовать жесткие условия и агрессивные химические реагенты, при этом, полученные частицы обладают небольшим разбросом по размеру.

1.11.1.2 Метод ковалентной поперечной сшивки

Использование метода ковалентно-поперечной сшивки позволяет получить НЧ с включенными биологическими агентами из хитозана и его производных. НЧ образуются за счет возникновения ковалентных связей между звеньями хитозана и функциональным сшивающим агентом [151]. Впервые этот метод был использован для приготовления НЧ с инкапсулированным 5-флуороурацилом при сшивании глутаральдегида с аминогруппами в молекулярном звене хитозана [152]. Группа наиболее часто используемых сшивающих агентов включает в себя полиэтиленгликоль (ПЭГ), глутаральдегид, лимонную кислоту или такие монофункциональные агенты как эпихлоргидрин [153-155]. С помощью глутаральдегида были получены суперпарамагнитные НЧ хитозана на основе Fe_3O_4 , конъюгированного с олеиновой кислотой [156], при этом их средний размер составлял 10,5 нм с небольшой дисперсностью.

1.11.1.3 Метод осаждения

Наиболее распространены два метода осаждения частиц. Одним из них является десольватация, в процессе которой флокулянт (обычно сульфат натрия) добавляют к водному раствору хитозана, при этом происходит уменьшение его растворимости за счет образования водородных связей между молекулами. Этот метод впервые был применен для приготовления микросфер хитозана [157]. Технические усовершенствования данного метода, позволили другой группе ученых приготовить НЧ размером 600-800 нм [158].

Второй метод основан на диффузии в эмульгированном растворителе. Под действием эмульгированного растворителя, водная фаза, содержащая хитозан, диспергируется в органической фазе, содержащей биоактивный агент, возникает турбулентность между границей раздела двух фаз и хитозан осаждается, в результате чего образуются частицы [159]. По причине использования органического растворителя, получающиеся частицы обладают крупным размером, что значительно ограничивает применение этого метода.

1.11.1.4 Полимеризация

Метод радикальной полимеризации изначально был разработан группой Chauvierre [160, 161] и впоследствии использовался для получения НЧ по типу ядро-оболочка на основе хитозана и хитозан-тиолированного-полиизобутил-цианоакрилата. Разбавленный раствор хитозана в азотной кислоте непрерывно перемешивали вместе с раствором нитрата аммония и изобутилового цианоакрилата при температуре 40°C в течение 40 минут в среде аргона. После охлаждения до комнатной температуры раствор титровали до pH 4,5, при этом образовалась суспензия НЧ [162]. Путем комбинирования различных мономеров в данном методе можно регулировать как параметры оболочки НЧ, так и свойства ядер [163].

НЧ на основе метил-хитозана и акриловой кислоты, полученные гелеобразующей полимеризацией за счет ионных взаимодействий между диссоциированной карбоксильной группой метилакриловой кислоты и аминогруппой хитозана, анализировались в просвечивающем электронном микроскопе. Частицы имели аккуратные сферические очертания и отличались незначительным разбросом по размерам.

1.11.1.5 Комплексы хитозана с биоактивным агентом

Благодаря своим катионным свойствам, хитозан может образовывать ионные комплексы с анионными лекарственными веществами при помощи электростатического взаимодействия. Группа исследователей с Cheng [164] приготовили НЧ хитозана, связанные с олигонуклеотидом методом смешивания, и выявили оптимальное мольное соотношение фосфата хитозана к олигонуклеотиду. Размер НЧ составлял 103 нм, заряд ± 12.0 , дзета-потенциал $1,45 \pm 1.75$ и соотношение инкапсулированного олигонуклеотида к полимерной матрице составляло $87,6\% \pm 3.5$.

Коллектив Kim [165] инкапсулировал ретинол в хитозановые наночастиц через электростатическое взаимодействие между аминогруппой

хитозана и гидроксильной группой ретинола. Подобная инкапсуляция приводила к увеличению растворимости ретинола более чем 1600-кратно.

1.11.1.6 Распылительная сушка

Метод распылительной сушки может использоваться в качестве одностадийного способа приготовления порошка НЧ. Данным методом были приготовлены маннитоловые микросферы, содержащие НЧ хитозана, нагруженные белком [166]. Группа Huang [167] методом распылительной сушки приготовили НЧ хитозана, содержащие различное соотношение полимера и оксида. Атомно-абсорбционные спектрометрические исследования показали сильный комплексообразующий эффект между этими веществами, при этом Fe_3O_4 кристаллизовался и распределялся в матрице хитозана. НЧ оксида железа с хитозаном обладали сильным суперпарамагнетизмом и длительное время сохраняли стабильность в водном растворе.

1.11.1.7 Комплексная коацервация

Подобно методу ионотропного гелеобразования, метод комплексной коацервации используется для получения НЧ хитозана по реакции образования полиэлектролитных комплексов между катионами хитозана и полианионами полимеров или биомакромолекул, тогда как в стандартном методе гелеобразования используются анионы. Так получают НЧ хитозана с полиакриловой кислотой, свойства которых варьируют в зависимости от соотношения двух полиэлектролитов. На основе НЧ хитозана/альгината разрабатываются препараты с включенными биологически активными молекулами, такими как белки и нуклеиновые кислоты [168]. Хитозан и молекулы нуклеиновых кислот могут образовывать НЧ с варьируемым соотношением компонентов, используемых в качестве невирусных нанопереносчиков генов [169].

1.11.1.8 Метод самосборки

Полимеры с высокой молекулярной массой и специфической молекулярной архитектурой обладают способностью объединяться и организовываться в специфичные для каждого типа полимеров нанодомены с индивидуальными морфологией и свойствами [170].

Процесс спонтанной макромолекулярной самосборки основан на сцеплении молекул в супрамолекулярные 3D структуры, обладающие различной морфологией, в том числе полимерные мицеллы (ПМ), НЧ, полимеросомы и т.д. [171, 172]. Этот процесс возможен благодаря амфифильной природе этих структур, содержащий как гидрофобные, так и гидрофильные домены. В частности, в системе ядро-оболочка внутреннее ядро состоит из гидрофобной части амфифильного полимера и служит наноконтейнером для слаборастворимых лекарственных веществ, в свою очередь это ядро окружено внешней оболочкой на основе гидрофильных полимеров [173-175]. Характеристики самоорганизующихся систем зависят от нескольких важных факторов:

- молекулярного состава и структуры полимера;
- последовательности расположения мономеров и их распределение вдоль макромолекулярной цепи;
- функциональных групп и их расположения в структуре макромолекулы;
- морфологии нанодоменов;
- макромолекулярной ассоциации природных и синтетических полимеров, а также стабильности в различных физиологических условиях.

Структурные характеристики систем самосборки имеют ряд преимуществ при разработке более эффективных и безопасных препаратов для лечения рака и противовоспалительной терапии [176]. Например, инкапсуляция химиотерапевтических и противовоспалительных препаратов в оболочку улучшает их диффузию и транспорт, а также биологическую доступность,

уменьшая их токсические эффекты [177]. Кроме того, гидрофильные поверхности уменьшают клиренс ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС), предположительно за счет предотвращения опсонизации путем уменьшения белкового взаимодействия. Эта стратегия также защищает препараты от преждевременной деградаци и способствует контролируемому высвобождению их в целевом месте (в т.ч. опухоли) вследствие повышенной проницаемости сосудов [178, 179].

Достижения в области проектирования блок-сополимеров предлагают широкий спектр возможностей для получения частиц с желаемыми характеристиками, такими как размер, стабильность или коэффициент вместимости лекарственных средств, путем модификации оболочки макромолекулярных структур специфическими лигандами можно также управлять их целевой доставкой до необходимого органа [173, 180].

Синтетические или природные производные амфифильных полимеров могут само-ассоциировать в водных средах, в связи с наличием внутри- и/или межмолекулярных гидрофобных взаимодействий [181], образуя разнообразные наноразмерные структуры, классификация которых зависит от их различной надмолекулярной самоорганизации в мицеллы и различные типы НЧ.

Полимерные мицеллы (ПМ) являются одними из первых самообразующихся агрегатов, описанных в литературе в качестве наноразмерных систем доставки лекарственных средств. Принято считать, что мицеллы построены из отдельных полимерных молекул [182], которые термодинамически склонны к самосборке в связи с их амфифильным характером. ПМ могут быть получены из блочных или статистических сополимеров, либо из гидрофобно-модифицированных гидрофильных полимеров, где гидрофобные остатки могут быть как присоединены к одному концу полимера, так и случайным образом распределены в пределах полимерной структуры. Внутренний объем мицелл может выступать в качестве резервуара для различного рода агентов, преимущественно гидрофобных, тогда подобные гидрофильные оболочки облегчают их растворимость в водных средах. Небольшой размер ПМ, обычно от 10 и до 100 нм, имеет ряд

преимуществ, таких как возможность экстравазации наноносителей наряду с минимизацией рисков эмболии в капиллярах [183]. Кроме того, их уникальный маленький размер облегчает их циркуляцию в крови, что улучшает их адресную доставку [173].

НЧ могут быть получены путем спонтанной самосборки по тем же термодинамическим принципам, описанным ранее для мицелл, а именно благодаря амфифильной природе полимеров, или ассоциации противоположно заряженных полиионов. В зависимости от способа приготовления могут быть получены два различных типа НЧ: наносферы или нанокапсулы (НК). Наносферы состоят из упакованных полимерных матриц, в то время как НК представляют собой везикулярные системы с внутренней полостью, окруженной полимерной мембраной [184]. При введении терапевтических агентов в наносферу они распределяются равномерно по всей частице, в то время как при загрузке их в НК они располагаются исключительно внутри, как в контейнере. Наносферы в свою очередь можно разделить на мицеллярные ассоциации, сформированных путем объединения отдельных мицелл в наногели, состоящие из наноразмерных полимерных матриц, которые физически сшиты гидрофобными цепями, остатками амфифильных полимеров, водородными связями или электростатическими взаимодействиями, образуя набухающие в воде НЧ [185]. НК могут быть классифицированы либо в соответствии с характером их полостей, которые могут содержать активные вещества в жидкой или твердой форме, либо как молекулярные дисперсии, содержащие липофильные или гидрофобные агенты [186]. В частности, НК являются полимеросомы, которые подобны липосомам, но состоят из амфифильных полимеров вместо амфифильных липидов [171].

Дендримеры обычно не обладают способностью к самосборке. Тем не менее, амфифильные дендримеры способны образовывать как мицеллы, так и наночастицы путем экспонирования гидрофильных групп на своей поверхности [186, 187]. Кроме того, наноконпозиты на основе дендримеров, сочетающие в себе характеристики самоорганизующихся наноструктур и дендримеров, были получены путем ковалентного связывания гидрофобных дендримеров с

гидрофильными полимерными матрицами, при этом образуются амфифильные конъюгаты, способные к самоорганизации в конструкции ядро-оболочка [188]. В качестве альтернативы, мономеры, уже несущие дендримеры, могут быть подвергнуты полимеризации, что приводит к получению самособирающихся дендримерных полимеров [189]. Самособирающиеся системы могут быть получены из широкого спектра полимеров.

Синтетические полимеры применяются для разработки наноносителей в области биомедицины, в частности, для лечения рака и воспалительных заболеваний, благодаря их высокой гибкости и оптимальному балансу физико-химических и биологических свойств. Наиболее распространены такие синтетические полимеры как полиэтиленгликоль (ПЭГ), плуроники (англ. Pluronic, ряд блок-сополимеров полиоксиэтилена и полиоксипропилена), поли((N-(2-гидроксипропил) метакриламид)), полиглутаминовая кислота и различные полиаминокислоты и сложные эфиры. Кроме того, в литературе встречаются данные об использовании амфифильных пептидов и поли(2-оксазолинов) для создания самоорганизующихся систем. Синтетические амфифильные полимеры можно получить с помощью ряда методов, включающих полимеризацию с раскрытием кольца (используется для крупномасштабного производства полиэфиров и полипептидов с высокой ММ), свободной радикальной сополимеризацией, контролируемой радикальной полимеризацией, или «клик» химией [190].

В последние годы в области химио- и противовоспалительной терапии набирают популярность амфифильные производные белков и полисахаридов [191]. Среди последних наиболее широко изучены гиалуроновая кислота (ГК) и хитозан, а также гепарин, хондроитин сульфат, декстран, крахмал и его производные, пуллуланы и альгинаты. Некоторые белки амфифильны по своей природе, другие могут быть легко модифицированы в амфифильные, при этом они образуют мицеллы при различных условиях, и могут быть применены в качестве наноносителей.

Для достижения высоких выходов в реакциях соединения очень важно подобрать такой органический растворитель, в котором будут растворимы как

природный полимер, так и вводимый гидрофобный фрагмент. Некоторые полисахариды, такие как пуллуланы [192-194] или гепарины [195], легко растворяются в воде при небольшом нагревании. Для солубилизации других полисахаридов часто используются органические растворители и разрабатываются методики их гомогенизации. Например, ГК растворяли в безводном ДМСО, конъюгируя с диметоксиполиэтиленгликолем, при этом получали биоконъюгат ГК-паклитаксел с высоким выходом без использования каких-либо солей и блокирующих агентов [196].

В результате реакции между частично протонированной натриевой солью альгиновой кислоты и алифатическими спиртами (октанол, додеканол или гексадеканол) был синтезирован ряд амфифильных эфиров с различной степенью замещения и длинными цепями гидрофобных остатков [197].

Наночастицы из альгиновой кислоты и поли (2-диэтиламино) этил-метакрилата получали в водной среде с использованием реакционной системы, состоящей из анионного альгината и катионного мономера диэтиламина в присутствии пероксидсульфата калия ($K_2S_2O_8$) в качестве инициатора радикальной полимеризации. При добавлении Ca^{2+} в реакционную смесь образовывались частицы с гидрофильными группами альгината на оболочке и инкапсулированным гидроксикамптотецином в ядре частиц [198].

1.11.1.9 Самоорганизующиеся системы с включенными лекарственными агентами на основе хитозана

Хитозан химически модифицируют путем присоединения гидрофобных групп на гидроксильные или аминогруппы полисахарида. В связи с более высокой реакционной способностью аминогрупп, большинство модификаций проходит по ней, преимущественно с помощью метода N-ацилирования [199, 200].

Например, N-октил-N,O-карбоксиметил-низкомолекулярный хитозан был синтезирован двухступенчатой модификацией, при этом образовывались самоорганизующиеся НЧ для таргетной доставки противоопухолевого агента. В данном синтезе алкильные цепи заместителя конъюгировали с предварительно

полученным карбоксиметилхитозаном, используя октанал и боргидрид натрия (NaBH_4) в качестве восстанавливающего агента [201]. В другой работе рассматривалось конъюгирование хитозана с линолевой кислотой карбодиимидным методом для получения мицелл в качестве носителя доксорубина [202]. С помощью того же метода были получены конъюгаты хитозана с разной степенью замещения стеариновой кислотой. После включения модельного лекарственного агента (Паклитаксел), поверхность данных частиц сшивали с помощью глутаральдегида, при этом образовывались НЧ с включенным препаратом в ядре и поперечно сшитой оболочкой, обладающие улучшенной стабильностью в естественных условиях [203]. Подобные частицы, загруженные доксорубином [204] или паклитакселом, показывали высокий уровень интернализации в раковых клетках и накопление в цитоплазме [205].

Чжан и др. [206] разработали мицеллярные системы амфифильных производных хитозана, модифицированного алкильными цепями ($n = 8, 10, 12$) и сульфатированными группами, для инкапсулирования противоопухолевого агента в количестве до 25%. Подобные мицеллы *in vitro* показывали медленное высвобождение агента (до 220 ч), а при внутривенной инъекции не обнаруживалось патогенной стимуляции, анафилаксии, гемолиза и цитотоксичности [207, 208].

В качестве носителя для политрансретиноевой кислоты (АТРА) был предложен амфифильный полимер N-фталоил хитозан-г-ПЭГ [209]. Было установлено, что степень деацетилирования (СД) хитозана, которая коррелировала с количеством N-фталоиловых групп во внутреннем ядре мицеллы является ключевым фактором, отвечающим за эффективность загрузки и стабильности загруженных препаратом частиц, а так же за профиль высвобождения лекарственного средства. С процентным увеличением СД стабильность и эффективность загрузки и АТРА увеличилась. Профили с замедленным высвобождением были также получены при высоком СД (90 и 95%) [210]. Аналогичные результаты были получены при инкапсулировании камптотецина в подобном носителе [211].

1.11.2 Наночастицы ядро-оболочка на основе хитозана-альгината

Хотя наночастицы на основе хитозана имеют многочисленные преимущества в качестве носителей для вакцинации, их ограниченная способность контролировать высвобождение инкапсулированных антигенов и легкая растворимость в кислой среде в значительной степени препятствуют расширению их применения [212]. Эти недостатки могут быть преодолены путем покрытия этих частиц устойчивым к кислотным условиям полимером, таким как альгинат натрия [213]. Альгинат натрия легко взаимодействует с хитозаном в нейтральных условиях, образуя электролитный комплекс в последствии электростатического взаимодействия [94, 214] между катионными аминными группами хитозана и анионными карбоксильными группами альгината [168]. Процесс происходит при относительно мягких условиях, без использования каких-либо органических растворителей при комнатной температуре, что позволяет сохранить биологическую активность антигенов, включенных в хитозан /альгинатный матрикс [215]. Исследование группы Лиу и др. показали, что подобные наночастицы, содержащие ДНК, эффективно поглощаются и процессируются в брыжечных лимфоузлах [216]. Изучение профилей высвобождения капсулированных веществ показали, что быстрый выпуск загруженного БСА при pH 1,2 (имитированной желудочной жидкости) в значительной степени снижался в покрытых альгинатом хитозановых частицах (АХЧ) по сравнению с частицами без альгината (ХЧ) [217]. Кроме того, на крысиной модели было показано способность АХЧ легко поглощаться Пейеровыми бляшками [218], что является одним из существенных признаков интернализации и целевой доставки частиц к неповрежденным антигеном специфическим иммунным клеткам из кишечной ассоциированной лимфоидной ткани. Исследования *in vivo* показали более высокий титр антител для АХЧ по сравнению с простыми ХЧ [219]. Эта система доставки также выступала в качестве эффективного адьюванта для поверхностного антигена вируса гепатита В при подкожном введении в мышинной модели [220].

Исследования показали, что эффективность трансфекции тесно связана с ММ полимера. Хитозан 10-150 кДа с определенной степенью дезацетилирования позволяет максимально увеличить трансгенную экспрессию *in vitro*, а наночастицы менее 500 нм в диаметре транспортируются с помощью эндоцитоза [221-223]. За счет более высокой растворимости в нейтральных водных растворителях с низкой вязкостью и более быстрого разложения низкомолекулярного хитозана по сравнению с более высокомолекулярным, первый нашел широкое применение для разработки систем доставки через слизистую оболочку [224, 225]. Опубликована работа по наночастицам из столбнячного анатоксина в качестве модельного белка и низкомолекулярного хитозана в качестве матрикса, полученные методом поперечной ковалентной сшивки для применения в интраназальной доставке [226].

Так же, снижение ММ приводит к уменьшению размера наночастиц и повышению эффективности загрузки антигена [227]. Тем не менее, чересчур низкая ММ может привести к неэффективному включению антигена в наночастицы, которые к тому же будут весьма нестабильными [225]. Эффект ММ хитозана на инкапсуляцию в значительной степени является следствием того, как катионная полимерная цепь взаимодействует с белковыми молекулами, которые имеют более сложную и комплексную 3D структуру и в качестве полипептидных цепей содержат как положительные, так и отрицательно заряженные функциональные группы, а также гидрофобные участки, которые стремятся специфически свернуть белок в его индивидуальную 3D конструкцию в водной среде [228]. Частицы хитозана, покрытые альгинатом, демонстрируют схожие закономерности.

Еще одним важным фактором стабильности и мукоадгезивности наночастиц является Дзета-потенциал (ДП). Как правило, чем выше по модулю значение ДП частиц, тем больше их стабильность, в то время как малое значение модуля ДП частиц вызывает их агрегацию [229]. В работах, посвященных получению наночастиц из альгината и хитозана методом «слой за слоем» (*layer by layer*) было установлено, что значение ДП чередуется в соответствии с последним адсорбируемым наружным слоем, от отрицательного

в случае альгината ($-38,47 \pm 8,08$ мВ) до положительного значения (до 67,6 мВ) в случае абсорбции хитозана. Если же к положительным частицам добавляли анионный полиэлектролит, значение ДП становилось отрицательным снова. В течение всего процесса формирования частиц из альгината-хитозана, содержащих до 10 слоев, значения ДП колебались между +60 и +70 мВ после адсорбции поликатиона, и от -40 до -50 мВ после адсорбции полианиона. Таким образом, заряд является важным параметром, указывающим на успешность абсорбции очередного слоя, и показывающим, происходит ли агрегирование и осаждение частиц в течение процесса перехода от слоя к слою, т.к. если подвижность коллоидной частицы уменьшилась, то происходит снижение значения ДП [229].

Детальная оценка морфологии и распределения наночастиц по размеру с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии показали, что наночастицы из хитозана, полученные с помощью иммобилизации на полистириновых бусах имели сферическую и гладкую форму со средним диаметром 90 нм. После добавления оболочки из альгината, полученные наночастицы поддерживали сферическую форму и имели диаметр приблизительно 100 нм, таким образом, можно предположить, что средняя толщина иммобилизованного слоя альгината составляет около 5 нм [229, 230]. Группа ученых [231] сообщали об аналогичном поведении наночастиц, состоящих из пяти бислоев хитозан/альгинат, толщина которых увеличивалась на 13 нм.

Препаратам на основе хитозановых наночастиц характерны две фазы высвобождения антигена из них, а именно: быстрое высвобождение в течение первых 3 часов и последующее замедленное высвобождение вплоть до 120 часов. Первая фаза может быть обусловлена наличием слабосвязанного ионными взаимодействиями антигена на наночастицах, который легко десорбируется при попадании в водную среду [232]. Вторая фаза может соответствовать высвобождению антигенов, более эффективно и прочно связанных с молекулами хитозана. Тем не менее, покрытие наночастицы

альгинатом повышает их устойчивость в водном растворе PBS, в результате чего высвобождение антигена на первой фазе пролонгируется и сглаживается.

Результаты МТТ-теста [233] (анализ цитотоксичности противоопухолевых соединений на основе 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия бромид) показали, что оба типа НЧ: с альгинатной оболочкой (% жизнеспособности клеток $86,43 \pm 4,60$) и без ($82,58 \pm 2,80$) имели минимальное воздействие на клетки эпителиальной клеточной линии человека HT-29 [234] даже при более высокой концентрации 4 мг/мл. Среди наночастиц, сформированных на основе хитозана с различной ММ значимых различий в цитотоксичности не наблюдалось [233, 235, 236]. Интересно отметить, что альгинатное покрытие повышает жизнеспособность клеток, таким образом можно предположить, что цитотоксичность связана с плотностью заряда частиц: токсичность повышается с увеличением плотности положительного заряда наночастиц [237].

1.12 Применение наночастиц хитозана

Для введения частиц в организм разработано множество путей, применяемых в исследованиях подобного рода – пероральный, внутрилегочный, интраназальный (последние два часто объединяют в ингаляционный), внутрикожный, накожный (пластыри), подкожный; внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный и т.д. Рассмотрим некоторые из них.

1.12.1 Пероральная, назальная и ингаляционная доставка лекарственных веществ

Как было упомянуто выше, пероральная доставка лекарственных средств имеет преимущества в виде удобства применения и биосовместимости. Однако ферментативное расщепление и низкое поглощение веществ слизистой оболочкой являются основными барьерами для некоторых препаратов, чувствительных к подобным условиям. С учетом хорошей биоадгезии и повышенной проницаемости хитозана были получены частицы для доставки

лекарственных препаратов, обладающие наноразмерами, что позволяло им легче поглощаться клетками эпителия слизистой оболочки. НЧ альгината/хитозана вводились перорально крысам, больным диабетом, и оказались эффективными для пероральной доставки инсулина. Также было показано [238], что водорастворимые НЧ хитозана повышают эффективность и пролонгируют абсорбцию бычьего сывороточного альбумина в кишечнике.

Ингаляционные и назальные системы доставки лекарственных препаратов также широко распространены за счет большой площади их абсорбции в легких. Al-Qadi и соавторы [239] описали сухую порошковую систему, состоящую из микрокапсулированных хитозановых частиц, “загруженных” инсулином. Мягкие условия приготовления НЧ хитозана сохраняют биоактивность инсулина, в то же время вдыхание сухой смеси обеспечивает хорошие аэродинамические свойства для осаждения глубоко в легких. Оценка уровня плазматической глюкозы, индуцированного внутритрахеальным введением крысам этого препарата, показала, что нагруженные инсулином НЧ хитозана вызывали более выраженное и пролонгированное гипогликемическое действие по сравнению со свободным инсулином.

Shahnaz и соавторы [240] разработали тиолированные НЧ для повышения биодоступности лейпропида при назальных применениях. Образование дисульфидных связей внутри и между НЧ стабилизирует их и позволяет увеличить время высвобождения лейпропида до более, чем 6 часов. Изучение реснитчатого эпителия установило эффективность тиолированных производных хитозана в качестве систем для назального применения.

1.12.2 Доставка с помощью вакцин

НЧ часто индуцируют значительные адьювантные эффекты при парентеральной вакцинации за счет их поглощения антигенпредставляющими клетками. Размер НЧ способствует их поглощению М-клетками в слизистой оболочке лимфоидной ткани (внутрикишечной, внутриназальной и внутрибронхиальной), инициируя иммунологические реакции. НЧ хитозана

вызывают интерес при разработке систем вакцинации благодаря биоадгезивности, биосовместимости, биодegradируемости и проницаемости. Они могут эффективно поглощаться фагоцитами, вызывая системные и слизистые иммунные ответы против антигенов. В одной из работ [241] исследовали механизм иммунной стимуляции НЧ хитозана, нагруженных овальбумином (часто используемая модель антигена). Авторы сделали вывод, что НЧ хитозана могут усиливать клеточный и гуморальный иммунный ответ и индуцировать сбалансированный Th1/Th2 ответ. Таким образом, препараты на основе НЧ хитозана могут быть безопасными и эффективными средствами, подходящими для широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин.

2 Экспериментальная часть Реагенты и растворители

Хитозан MM=300 кДа, DD 90% (ООО «Биопрогресс», Россия); хитозан 50 кДа и СД 90% (Sigma-Aldrich), молочная кислота, уксусная кислота ледяная, азотная кислота, гидроксид натрия ХЧ, метанол (ЗАО «Метанол», Россия), соляная кислота (ХЧ, «Реахим», Россия), додецилсульфат натрия, янтарный ангидрид (Fluka, Германия); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, 2-меркаптоэтанол (Reanal, Венгрия); овальбумин (Serva, Германия); TEMED (LKB Bromma, Швеция); персульфат аммония (Amersham Biosciences, США), ацетат аммония, гидрокарбонат натрия, ЭДТА, ацетат натрия, фосфат натрия, гидроксид аммония, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, трифторуксусная кислота (Solvay, Бельгия), ТРИС (Panreac, Испания), тиобарбитуровая кислота, хлорид магния, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, 2-(3)-(додец-2'-ен-1'-ил)-янтарный ангидрид, ТВИН 20, декстраны различной молекулярной массы для SEC, лактоферрин, β -лактоглобулин, пропидия йодид, (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (Sigma, США), флуоресцеин изотиоцианат, маркеры молекулярных масс белков (Bio-Rad, США), кумасси G250 (Dudley Chemical, США); бычий сывороточный альбумин (Boehringer Mannheim GmbH, Германия), культуральные среды RPMI 1640, DMEM, 199 без глутамина, L-глутамин, пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный, раствор трипсина-ЭДТА 0,25%, физиологический раствор стерильный (ПанЭко, Россия); полимеризующая среда Mowiol 4.88 (Calbiochem, США), фетальная бычья сыворотка (PAA Laboratories, Австрия); анти - CD4, CD8 ФИТЦ- РЕ- конъюгированные антитела кролика, HRP- и AP- конъюгированные антитела кролика и козы против мышинных IgG, IgG1, IgG2a (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

В работе использовались трекеры митохондрий Nonyl Acridine Orange (NAO) (Sigma), MitoTracker Green (MTG), эндоплазматического ретикулума ERTracker™ Blue-White, лизосом LysoTracker® Green (все Invitrogen),

комплекса Гольджи BODIPY-C7-Cer-BSA (Molecular Probes), эндосом FITC-меченый трансферрин (Molecular Probes), тетраметилпродамин (TMP) (Sigma).

2.2 Лабораторное оборудование

Магнитная мешалка с подогревом Heidolph MR Hei-Тес («Heidolph», Германия); магнитная мешалка («КА», Германия); рН-метр HI 8314 («Hanna Instruments», Португалия); термостат 5320 для пробирок («Eppendorf», Германия); кондуктометр Hanna HI 8733 («Hanna Instruments», Румыния); перистальтический насос 12000 Varioporex («LKB Bromma», Швеция); весы аналитические ER-1821 («AND», Япония); камера для гель-электрофореза Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США); центрифуга для микропробирок CM50 («Elmi Skyline», Латвия); центрифуга Sigma 4-16К с охлаждением («Sigma», США); роторный испаритель Rotavapor LG-108; лиофильная (сублимационная) сушилка MARTIN CHRIST ALPHA 1-4LD plus («Christ», Германия); установка для документирования гелей UVP BioDoc ITTM System; концентратор SpeedVac Savant SVC-100H с ловушкой-холодильником Savant RT49 100A и вакуумным насосом НВР-1,25Д; комплектная установка для сублимационной сушки Heto FD 1.0; система для очистки воды MiliQRt; инкубатор CO2 CHP-80Q (Ulab, Украина); УФ спектрофотометр Shimadzu UV-1601 PC («Shimadzu», Япония); жидкостной хроматограф S 2100 («Sykam», Германия), спектрофотометр Leki ss1207 UV («Mediora OY», Финляндия); спектрофлуориметр GloMax®-Multi Detection System («Promega», США); планшетный спектрофотометр («Titritek», Великобритания); анализатор размеров частиц, молекулярной массы и дзета-потенциала 90 Plus Partical Size Analyzer («Brookhaven instruments corporation», США); ЯМР спектрометр AVANCE III 600 MHz («Bruker», Германия); атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Agilent 720-ES («Agilent Technologies», США); атомно-силовой микроскоп «ИНТЕГРА Прима» («NT-MDT», Россия); проточный цитофлуориметр («Becton Dickinson FACScan», США); конфокальный микроскоп TE 2000 Eclipse («Nikon», Япония);

2.3 Методы

2.3.1 Методы работы с полимерами

Переосаждение хитозана. Готовили 1% раствор хитозана в 1% уксусной кислоте. Раствор фильтровали через мелкопористый фильтр для удаления нерастворенного материала и примесей, после чего добавляли 12% NH_4OH до pH 8. Центрифугировали (Центрифуга Sigma 4-16K с охлаждением) при 6000 об./мин течение 15 мин, или декантировали. Осадок диализовали против дистиллированной воды, затем лиофильно высушивали (лиофильная (сублимационная) сушилка MARTIN CHRIST ALPHA 1-4LD plus).

Определение степени деацетилирования хитозана и степени замещения его производных методом протонного ядерного магнитного резонанса ($^1\text{H-NMR}$). Протонные спектры хитозана и его производных регистрировали на спектрометре Avance III с рабочей частотой по протону 600 МГц, при температуре 30 °С. Образцы были приготовлены в $\text{H}_2\text{O}+10\%\text{D}_2\text{O}$, с добавлением соляной кислоты до полного растворения хитозанов. Сигнал растворителя подавляли селективными импульсами с использованием градиентов.

Получение N-гидроксисукцинимидного эфира лауриновой кислоты. К раствору N-гидроксисукцинимиды (115 мг, 1 ммоль) в 5 мл сухого этилацетата добавляли при перемешивании лауриновую кислоту (192 мг, 1 ммоль) и раствор N,N'-дициклогексилкарбодиимида (193 мг, 1 ммоль) в 3 мл сухого этилацетата, и реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при КТ. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины отделяли фильтрованием и фильтрат упаривали досуха. Остаток перекристаллизовали из этанола и высушивали на воздухе, при этом получали N-гидроксисукцинимидный эфир лауриновой кислоты в виде кристаллов белого цвета (выход 50 мг; 80 %).

Получение N-лаурилхитозана (ЛХ) различных степеней замещения. К раствору хитозана (100 мг, 2.5 мкмоль) в 10 мл 2 % уксусной кислоты и 30 мл метанола добавляли раствор N-гидроксисукцинимидного эфира лауриновой

кислоты с различными мольными соотношениями (0,1 - 1 мкмоль) в 10 мл метанола, и реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при КТ. Метанол упаривали, водный раствор диализовали против 0.1 % уксусной кислоты и высушивали лиофильно, при этом получали ЛХ в виде легкого порошка белого цвета (85 %).

Получение N-лаурил-N'-сукциноилхитозана (ЛСХ) различных степеней замещения. К раствору ЛХ (80 мг, 2 мкмоль) в 8 мл 2 % уксусной кислоты и 32 мл метанола добавляли янтарный ангидрид (50-500 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре (КТ). Метанол упаривали, водный раствор диализовали против 0.1 % уксусной кислоты и высушивали лиофильно, при этом получали ЛСХ в виде порошка белого цвета (выход 65 мг; 81 %). ¹H-ЯМР-спектры исходных хитозанов и их производных получали на спектрометре Bruker DRX 500 (500 MHz) (США) в 0.01 M DCl/D₂O при 30°C. Химические сдвиги протонов приведены относительно тетраметилсилана: 2.04 ppm N-ацетил; 2.54 ppm (CH₂)₂ (сукциноил); 1.21 ppm (CH₂) (лаурил). Степень замещения (сукциноил/лаурил) вычисляли по отношению интегральной интенсивности сигналов протонов N-сукциноил- и N-лаурил-радикалов к сигналу протонов при 2C (4.56 ppm).

2.3.2 Методы работы с белками

Наработка рекомбинантных белков в клетках *E. coli* и их модификация. В ходе работы в качестве антигенов в мышинной аллергической модели, а также при исследовании сывороток больных – аллергиков, использовались рекомбинантные белки, получаемые наработкой в бактериальных клетках.

Приготовленные заранее трансформированные вектором типа pQE30, содержащим ген, ответственный за устойчивость к ампициллину, со вставкой нужного гена, кодирующего один из используемых белков (Der f 1, Der f 2L, Asp f 2, Asp f 3, Alt a1, EBV) клетки *E. coli* штамма M15 до момента использования хранили при -195°C в аликвотах примерно по 1 мл. При использовании из данного объема отбирали примерно 20 мкл суспензии клеток

и переносили в 4 мл среды LB. К этому объёму добавляли антибиотик ампициллин из сток-раствора до конечной концентрации 100 мкг/мл. Суспензию клеток оставляли на ночь при температуре +37°C на шейкере.

На другой день переносили наращенную суспензию в 400 мл среды LB, в которую добавляли 50 мкг/мл канамицина и 100 мкг/мл ампициллина для наращивания Der f 1, Der f 2, Alt a 1 и pEBV 2L или только 100 мкг/мл ампициллина для наращивания Asp f 2, Asp f 3. Среду с клетками помещали на шейкер и инкубировали при +37°C, периодически измеряя оптическую плотность (ОП) при 600 нм. Инкубацию продолжали до момента достижения ОП=0,5-0,7, примерно 4-5 часов.

После этого добавляли 1 мМ ИПТГ для индукции экспрессии целевого гена. Инкубировали при +37°C и перемешивании 4 часа.

Затем клетки выделяли из суспензии центрифугированием при 6000 об./мин, растворяли в 2 мл фосфатного буфера и лизировали 10-20 мл лизис-буфера (8М мочевины, 10 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaH₂PO₄, pH=8,0). Смесь озвучивали на соникаторе до образования относительно прозрачной суспензии, 10-12 озвучиваний по 30 с с перерывами по 15 с, после чего суспензию центрифугировали при 1000 об./мин для удаления мембран клеток. Супернатант хранили при -20°C.

Очистка рекомбинантных белков. В своей последовательности на С-конце полученные с помощью коммерческого вектора pQE30 (Quagen) рекомбинантные белки имеют 6 идущих подряд остатков гистидина («His-tag»). Благодаря этому они обладают повышенным сродством к ионам Ni²⁺, сорбированным на колонке NTA-агарозы. Колонки Ni-NTA агарозы (объём рабочей части около 5 мл) до момента использования хранили в 30% спирте при +4°C. Перед использованием колонки промывали 5 объёмами дистиллированной воды, а затем таким же количеством лизис-буфера. Сорбция белков из полученной в суспензии «осветлённого лизата» осуществляли способом рециклинга в течении примерно 1-1,5 часов из объёма 150-200 мл. После чего колонку промывали 1-2 объёмами лизис-буфера, затем 5 объёмами лизис-буфера с pH=6,3 и 5 объёмами лизис-буфера с pH=5,9 для удаления

неспецифично связанных белков. Целевой белок элюировали лизис-буфером с $\text{pH}=4,0$, собирая во фракции по 1,5-2 мл.

Спектрофотометрическое определение концентрации белка в препарате.

Полученный препарат (фракции) белка заливали в кварцевую кювету на 0,5 мл и измеряли в сравнении с элюирующим буфером на спектрофотометре BeckmanCounter, фиксируя оптическую плотность при 280 нм. Значение ОП делили на переводной коэффициент (оптическая плотность раствора белка концентрации 1 мг/мл), приводимый для каждого белка в базе данных Uniprot, получая концентрацию белка в мг/мл. Данный коэффициент был определён в базе данных для белка Der f 1 1,887; для Der f 2 -0,616; для Asp f 2 -1,723; для Asp f 3 -1,776; для Alt a 1 -1,518. Фракции с концентрацией $>0,2$ мг/мл объединяют и анализируют методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли.

Электрофорез фракций белка. Электрофорез проводили по стандартной методике Леммли. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис-НСl, pH 6.8; разделяющий гель – 8-10% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис-НСl, pH 8.9. Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации $5 \cdot 10^{-5}\%$, а затем персульфат аммония до $1.5 \cdot 10^{-4}\%$. Для проведения нативного ПААГ-электрофореза использовали буферные растворы без ДСН.

Двукратный буфер нанесения образцов: 4% ДСН, 0.25 М Трис-НСl, pH 6.8; 4 мМ ЭДТА-Na, pH 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего; (для проведения электрофореза в восстанавливающих условиях добавляли 5% меркаптоэтанола; для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН).

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-НСl 6.5 г/л, pH 8.3 (для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН pH 7.4).

Для постановки электрофореза и получения геля использовали камеру и заливочный столик системы BioRad. Для получения пластинки геля в пространство между двумя стёклами заливали вначале разделяющий полиакриламидный гель (15%) с добавлением SDS, после полимеризации разделяющего геля, добавляли концентрирующий гель, в который вставляли гребёнку для формирования лунок.

Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95С, наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 80-110 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 25 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля.

По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250.

Разделяющий гель 5 минут инкубировали в растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0.3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0.45 г/л пятиводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, до полного исчезновения фонового окрашивания.

Определение белка по методу Бредфорд. К 750 мкл раствора, содержащего белок, добавляли 750 мкл красителя Кумасси G-250 в 3% HClO_4 . Смесь выдерживали 15-20 мин до прекращения развития фиолетовой окраски. Для приготовления контрольного раствора, вместо раствора белка использовали 50мМ фосфатный буфер. Измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм (Спектрофотометр Leik SS1207UV). Значение не должно превышать 0,3. По градуировочному графику определяли содержание белка в мкг/мл.

2.3.3 Методы работы с полимерными наночастицами: получение и определение параметров

Получение наночастиц из ЛСХ с включенными аллергенами. К 30% спиртовому раствору ЛСХ (1 мг, 0.17 мкмоль) в 1 мл ФБ, рН 7.2 добавляли

активирующий агент карбодиимид (30.3 мкмоль), перемешивали на ледяной бане в течение 10 мин, после чего вносили по каплям растворы рекомбинантных белков Der f 1, Der f 2, Asp f2 или Asp f3 (100 мкг каждого белка в 100 мкл ФБ), поддерживая рН реакционной смеси 7.4 с помощью 5 М раствора бикарбоната натрия. Реакционную смесь перемешивали в течение не менее 4 ч при комнатной температуре. Затем раствор диализовали против ФБ в течение 4 ч, при этом наблюдалось формирование наночастиц. По результатам электрофореза в 10 % ПААГ в полученной суспензии наночастиц отсутствовали свободные белки, что свидетельствует о 100 % выходе на стадии конденсации. Для определения выхода конъюгата аликвоту суспензии (1/3) упаривали досуха и взвешивали (выход 9.0 мг; 90 % для ЛСХ40 и ЛСХ300). Диаметр частиц определяли методом динамического светорассеяния (ДС).

Получение наночастиц ЛСХ/(белок)–альгиновая кислота методом самосборки. Один мл суспензии частиц ЛСХ/(Der f 1, Der f 2, Asp f2 или Asp f3) добавляли медленно по каплям при интенсивном перемешивании к 2 мл раствора альгината натрия в ФБ (2 мг, 0.04 моль) и перемешивали еще в течение 30 мин, при этом наблюдалось образование опалесцирующей суспензии наночастиц. Диаметр и форму наночастиц определяли методами ДС и модуляционно-интерференционной микроскопии (МИМ).

Производство ядра наночастиц из ЛСХ методом электромагнитного спрея. Хитозан в растворе 3% уксусной кислоты активировали карбодиимидом и добавляли Der F 2-FITC, как указано ниже. Полученный конъюгат подвергали диализу, сушили лиофильно и растворяли в водно-этанольной среде с получением 3% раствора. Раствор загружали в распылительную электрогидравлического кювету (0,1 мм), разбрызгивали через капилляр на алюминиевый лоток, заполненный 96% этанолом. Полученные НЧ переносили в воду с помощью диализа. Электро-спрей проводили на электромагнитном устройстве ESF-1 (Россия).

Получение белков, меченых родамином В. Флюоресцентно меченные белки были приготовлены для оценки количества и визуализации белков,

включенных в основные частицы. Для получения этих белков карбодиимид-активированный раствор родамина В (0,4 мкг, 1 мкмоль) в 0,4 мл воды добавляли к 0,6 мл раствора белков Asp f или Der f (500 мкг) в PBS и перемешивали в течение 12 час. Избыток красителя удаляли путем диализа в течение ночи против ФБ. Количество белков, связанных с частицами, определяли, используя спектрофлуориметр GlomaxMulti (Promega, США) с фильтром 525 нм. Концентрацию белка определяли, используя свободную родамин-меченую кривую титрования белка. Отношение ЛСХ к белку составляло 10-15 к 1.

Получение производных хитозана и белков, а также частиц меченых флуоресцеином изотиоцианатом. Для визуализации частиц с помощью конфокальной микроскопии, а так же анализа внутриклеточного трафика и поглощения образцы производных хитозана и рекомбинантных белков метили ФИТЦ. Для этого смешивали 1 мл раствора полимера (10 мг/мл) с водным раствором ФИТЦ (конечная концентрация составила 100-200 мкг/мл). Инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 6 часов, после чего диализовали против дистиллированной воды. Для получения флуоресцентно меченых частиц, в формовочный раствор вносили ФИТЦ-меченый белок.

Модуляционно-интерференционная микроскопия. Визуализацию полученных наночастиц осуществляли с помощью лазерного интерференционного микроскопа МИМ-321 (AMPHORA Laboratories LLC, Россия) при вертикальном (Z) пространственном разрешении до 0.1 нм и боковом (XY) – 10 нм с использованием Olympus MPLFLN 100 × 0.9 объектива. С этой целью 10 мкл суспензии наночастиц наносили на зеркальное стекло и высушивали. Применяли фильтрующий градиент для визуализации формы и внутренней структуры наночастиц.

Определение содержания белка в частицах методом флуоресцентной спектрофотометрии. Измерения проводились на спектрофлуориметре для 96-луночных планшетов (Promega, Германия). Для этого для формирования частиц

использовался ФИТЦ-меченый белок. Количество ЛФ вычисляли по калибровочной кривой.

Метод динамического светорассеяния (ДСР). Измерения размера частиц методом ДСР осуществляли на приборе 90 Plus Partical Size Analyzer Brookhaven Instruments corporation (США) при температуре 25°C, фиксированном угле 90° и длине волны лазера 661 нм. Размерный анализ данных для всех полученных частиц проводили по числу частиц. Дзета-потенциал хитозанов определяли на этом же приборе, используя анализатор «ZetaPALS» («Brookhaven Instrument Co.», США). Средние значения эффективного диаметра и зета - потенциала рассчитывали как минимум по 5 независимым измерениям.

Высвобождение белка из частиц. Высвобождение белка из частиц изучали путем инкубации частиц в фосфатном буфере (50мМ, рН 7.4) при температуре 37°C. Исследовали содержание белка в пробах методом спектрофотометрического анализа по поглощению раствора белка при 280 нм в различных временных точках до 72 часов. Процент высвобождения рассчитывался как доля от первоначально загруженного количества белка.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Неочищенный экстракт КДП, рекомбинантные белки или суспензию частиц в ФБ в концентрации, соответствующей 5 мкг/мл белка, наносили по 100 мкл/лунку на 96-луночные планшеты (Nunc, Дания) и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Затем планшеты отмывали 3 раза ФБ, содержащим 0.05 % Tween-20, блокировали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (Serva, Германия) в ФБ (далее ФБА) и вносили разведенные сыворотки больных с аллергией на КДП. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при КТ, отмывали, как описано выше, вносили в ФБА антитела к IgE человека (100 мкл, 2 мкг/мл, SantaCruz, США), конъюгированных с пероксидазой хрена, и инкубировали 1 ч при КТ. После четырех отмывок добавляли раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15–20 мин реакцию останавливали, добавляя 10 % серную кислоту, и образцы

анализировали на планшетном спектрофотометре Titertek (UK) при длине волны 450 нм.

Для оценки адгезии НЧ к пластику свободные рекомбинантные белки Der f 2, Asp f 3, ядра или ядра-оболочки НЧ были нанесены в концентрации 5 мкг / мл белка в 100 мкл / лунку на 96-луночные планшеты (Nunc, Дания) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Высокие титры антител в сыворотке крови кролика против Der f 2 или Asp f 3 использовали для сравнения распознавания антигена в свободной или инкапсулированной форме, как описано выше.

Исследование цитотоксичности частиц и производных хитозана.

Цитотоксический эффект образцов оценивался с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ-тест). На 96-луночный планшет наносили по 100 мкл питательной среды (в первую лунку – 180-190 мкл), в нее вносили 10-20 мкл суспензии наночастиц. Титровали препарат методом серийных разведений. Затем вносили суспензию клеток, чтобы в лунке содержалось 20-30 тыс. клеток. Инкубировали клетки в течение 3х суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл МТТ и инкубировали 2,5-4 часа. Затем удаляли среду с планшета и остатки влаги, после чего кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО (Реахим, Москва) в течение 20 мин. Затем измеряли оптическую плотность при 540 нм на планшетном спектрофотометре (Titritek, UK). Живые клетки восстанавливают МТТ-желтый тетразолий до фиолетового формазана. Результаты обрабатывали с помощью пакета программ Exel (Microsoft). Данные представляли в виде индекса ингибирования (ИИ), подсчитанного по Формуле 11: $ИИ = 1 - \frac{ОПопыта}{ОПконтроля}$, (11) где ОПопыта и ОПконтроля означает оптическую плотность в опытном и контрольном образцах соответственно.

Исследование захвата производных хитозана и частиц клетками методом

проточной цитометрии. Анализ проводился на клетках линии RAW 264.7. Флуоресцентно-меченые образцы наносились на 24 луночный планшет, содержащий клетки макрофагов в адгезированном состоянии. Клетки

инкубировали с препаратами требуемое время. Для гашения внеклеточной флуоресценции клетки обрабатывали раствором трипанового синего с концентрацией 0,1%. После этого, клетки обрабатывали раствором трипсина для получения суспензии клеток, промывали фосфатным буфером (pH 7.2-7.4 0,1M). Анализ осуществляли на приборе FACScan (BD, США) (количество событий = 10000). Результаты анализировали с использованием программ WinMDI 2.8 Flowing Software 2.5.1 (Turku Centre for Biotechnology University of Turku, Финляндия).

Конфокальная микроскопия. Для анализа фагоцитоза наночастиц использовали клетки линии мышинных макрофагов J774. Клетки инкубировали в среде DMEM, дополненной антибиотиками, глутамином и 10 % фетальной сывороткой («ПанЭко», Москва). При пассировании часть клеток наносили на стерильные покровные стекла и оставляли для наращивания до стадии полуконфлюэнтного монослоя. НЧ добавляли к клеткам в объеме 10 мкл в ФБ и инкубировали 1, 3 или 12 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Ядра окрашивали красителем Hoechst 33342 (Sigma); мембраны клеток окрашивали фосфатидилхолином, меченным красителем Bodipy (Sigma). Колокализацию с ранними эндосомами и лизосомами проводили с помощью трекера органелл трансферрина, меченного флуоресцеинизотиоционатом или LyzoTrackerGreen (Invitrogen, США) соответственно. Несвязавшиеся частицы и красители отмывали питательной средой; далее клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида, отмывали 3 раза в ФБ и заключали в среду Mowiol 4.88 (Calbiochem). Образцы анализировали с помощью конфокального микроскопа Nikon TE 2000 Eclipse (Япония).

2.3.4 Методы работы с животными

Работа с животными. В работе использовали лабораторных мышей различных линий – гетерозиготные CD1 и гомозиготные линии BALB/c, CBA/J, C57BL/6 в возрасте 8-10 недель (на момент начала эксперимента). Кроме того использовали мышей с генотипом Nu⁻/Nu⁻ на основе BALB/c. Эксперименты

проводились в соответствии с утвержденным протоколом Институтской комиссии по работе с животными.

Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г. Пущино.

В работе осуществлялась иммунизация следующими способами: внутривентриально (в/в), подкожно (п/к) в область холки, интраназально или п/к в область подушечки задней лапы.

Во всех случаях перед осуществлением иммунизации белки разводились из исходных препаратов фосфатным буфером (ФБ) pH=7,2-7,4 до достижения нужной концентрации. Из растворов заранее готовились аликвоты на весь период иммунизации, которые хранились при -20°C и не замораживались повторно.

При внутривентриальной иммунизации животное фиксировали, придерживая его левой рукой за область холки и хвост, переворачивая при этом брюшной стороной вверх. Правой рукой брали шприц с заранее отмеренным (100 мкл) объемом раствора антигенов и вводили в брюшную область.

При подкожной иммунизации в область холки животное располагали на горизонтальной решетке клетки, придерживали за холку, несколько оттягивая кожу вместе с подкожной фасцией в этом месте, и вводили правой рукой с помощью шприца в данную область заранее отмеренный (100 мкл) объем раствора антигенов.

При подкожной иммунизации в область подушечки лапы один человек фиксировал мышшь, а второй, придерживая одну из задних лап, вводил шприцем с небольшой иглой в подушечку данной лапы 50 мкл раствора антигенов.

При интраназальном введении животное фиксировали, придерживая его левой рукой за область холки и хвост, переворачивая при этом брюшной стороной вверх, заранее набранный в пипетку объем раствора белка (20-50 мкл) капали на нос мышши, дожидаясь полного втягивания жидкости внутрь носа.

Забор крови проводили под изофлурановым наркозом. Кровь забирали либо из орбитального синуса глаза с помощью стеклянной пастеровской пипетки, либо с помощью прокола иглой лицевого синуса.

После взятия образцы крови отстаивали для свёртывания в термостате на +37°C в течении 15-30 минут, центрифугировали при 1000 об./мин 5 мин, получая сыворотку без тромба.

Забор внутренних органов и сбор лаважей. Забой животного осуществлялся при помощи цервикальной дислокации. При взятии селезёнки брюшная полость вскрывалась с помощью хирургических ножниц и скальпеля. При взятии ткани лёгких вскрывалась грудная клетка с помощью хирургических ножниц. Полученные органы гомогенизировали в ФБ на стальных ситечках. Гомогенаты центрифугировали в эппендорфах при 13500 об/мин 10 минут, супернатанты с гомогенатов собрали и замораживали. Осадок ресуспендировали в буфере: 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,5% Тритон-Х100. Буфер лизировал клетки, что приводило к высвобождению внутриклеточных цитокинов. Гомогенаты центрифугировали 10 минут при 13500 об/мин, супернатанты до момента анализа хранили при -20°C.

При взятии образцов трахеи последнюю очищали от прилежащих тканей, связок гортани. Лаважи брали путём введения в трахею канюли, через которую вводили в начале 1 мл раствора ФБ, забирая 0,4 мл, а затем ещё 0,4 мл, забирая затем остаток. После взятия лаважей их центрифугировали при 1000 об/мин, 5 мин для выделения клеток и надосадка, в котором определяли цитокины.

Образцы ткани кожи брали из предварительно депилированных областей с использованием хирургических ножниц.

Иммунизация мышей смесью белков и частицами белок-ЛСХ-альгинат. Иммунный ответ исследовался при подкожной (внутрибрюшинной) иммунизации мышей линии С57BL/6, с предварительно привитой аллергией на Asp f2/3. Мышей поделили на 3 группы, по 4 особи в каждой, и вводили по 100 мкл смеси рекомбинантных белков (Asp f 2 и Asp f 3) с адьювантом Alum, НЧ на основе ЛСХ-альгинат типа «Ядро-оболочка» с включенным Asp f 2 или НЧ с включенным Asp f 3, в дозе 100 мкг/мышь. Иммунизация проводилась трехкратно с интервалом в 4-5 дней. Сыворотки крови забирали через 2 и 3, 5

недели после окончания вакцинации. Через 5 недель недели после последней иммунизации проводилась повторная сенсбилизация мышей и сыворотки также собирались на 6, 7, 15, 20 неделях после начала опыта. Далее проводилась оценка гуморального иммунного ответа методом иммуноферментного анализа. Формирование клеточного ответа оценивали по пролиферации лимфоцитов *ex vivo*, для чего мышей забивали, собирали лимфатические узлы, дренирующие место иммунизации, а также селезенки, из которых выделяли лимфоциты.

Определение количества антител в биологических образцах.

Количественное определение антител различных классов в биологических образцах (сыворотки крови, лаважи, гомогенаты тканей) осуществляли с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве меры продукции специфических антител использовали титр антител в данной сыворотке, рассчитываемый как разведение сыворотки, при котором оптическая плотность становилась равной верхней границе области фона, то есть среднему значению оптической плотности фоновых образцов планшета плюс три стандартных отклонения этих значений.

Концентрацию тотального IgE и цитокинов определяли с использованием стандарта путём построения калибровочной кривой в программе MS Excel по стандартной методике.

Определение количества белок - специфических IgG. Для определения количества белок – специфических IgG, использовали метод прямого ИФА, а для определения белок – специфических IgG₁, IgG_{2a} -непрямого ИФА. Антигены на подложку наносили на ночь в 96-луночном планшете в 50 мкл ФБ рН=7,2 в концентрации 5 мкг/мл.

На другой день блокировали неспецифическое связывание 100 мкл ФБ с добавлением 1% БСА (ФББ) в течение часа при комнатной температуре. Между всеми инкубациями планшеты 3 раза промывали ФБ с добавлением 0,05% Твин-20 (ФБТ). После отмывки вносили сыворотки в ФББ в разных разведениях и инкубировали 1 час. На следующей стадии вносили в зависимости от цели опыта прямые конъюгаты – анти-мышинные IgG, меченые

пероксидазой хрена (ПХ) в титре 1/2000; анти-мышинные IgG_{2b}, меченые пероксидазой хрена (Serotec) в титре 1/1000; анти-человеческие IgG-ПХ (SantaCruz) 1/2000;; либо первичные биотинилированные анти-мышинные IgG₁ (BioLegend) (1/1000); анти-мышинные IgG_{2a} (BioLegend) (1/1000) с последующим нанесением вторичного конъюгата стрептавидин-ПХ (Biolegend) 1/1000.

Проявление реакции осуществлялось с использованием субстрата, получаемого смешиванием 1 части ТМБ – содержащего буфера и пероксид – содержащего буфера. Субстрат добавляли по 50 мкл в лунки и инкубировали до полноценного развития окраски (синего цвета). Остановку реакции осуществляли добавлением 10% H₂SO₄. После чего с помощью ридера считывали оптическую плотность при 450 нм за вычетом (как фона) оптической плотности при 620 нм. Рассчитывали титр каждой из сывороток.

Определение количества специфического IgE. Выявление продукции специфического IgE производилось как в сыворотках лабораторных животных, так и в сыворотках больных – аллергиков методом непрямого ИФА.

Методика схожа с предыдущим пунктом, за исключением следующего: подложку получали с использованием концентрации антигена 20 мкг/мл. Отмывка между стадиями осуществлялась 5 раз. Неспецифическое связывание блокировали ФБ с добавлением 5% БСА. В нём же осуществляли нанесение сывороток на ночь. Первичные конъюгаты – биотинилированные анти-мышинные IgE_a (BioLegend); биотинилированные анти-мышинные IgE_b (BioLegend); биотинилированные анти-человеческие IgE (SantaCruz) наносили в титре 1/1000 в ФБ с добавлением 5% БСА и 2% нормальной кроличьей сыворотки (НКС) на 3 часа. В том же буфере наносили вторичный конъюгат – стрептавидин-ПХ (BioLegend) в титре 1/1000.

Определение концентрации тотального IgE. Подложку формировали путём нанесения на ночь немеченых анти-мышинных IgE (BioLegend) или немеченых анти-человеческих IgE (Сорбент) в концентрации 2 мкг/мл, в случае цитокинов – анти-мышинных ИЛ-33 и ТСЛП (BioLegend) в концентрации 1 мкг/мл. Между

стадиями планшет промывали 5 раз. Неспецифическое связывание блокировали с помощью ФББ, в нём же осуществляли титровку сывороток и стандарта – мышинового IgE гаплотипа a или b (BioLegend), а также всех конъюгатов. Инкубацию проводили в течение ночи. Конъюгаты – биотинилированные анти-мышинные IgE_a (1/500); анти-мышинные IgE_b (1,500); анти-человеческие IgE (1/500); анти-мышинные ТСЛП (1/1000); анти-мышинные ИЛ-33 (1/2000) а также вторичный – стрептавидин-ПХ (1/1000), использовали, инкубируя соответственно 3 и 1 час. Проявление реакции осуществлялось аналогично, а подсчёт концентрации – с помощью калибровочной кривой на основе стандарта в приложении MS Excel.

2.3.5 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных осуществлялась обычно в программе MS Excel, с помощью которой определялись стандартные отклонения и достоверность разницы. Отклонения, представленные в работе на диаграммах, представляют собой средние стандартные, посчитанные по формуле

$$\text{StDev} = \frac{Sdev}{\sqrt{n}}$$

где n – число образцов выборки, Sdev – среднее квадратичное отклонение, StDev – стандартное отклонение.

Достоверность разницы считалась программой в соответствии с методикой t-теста Стьюдента. Корреляции между величинами определялись также в программе MS Excel.

3 Результаты собственных исследований

3.1 Получение частиц на основе рекомбинантных белков с оболочкой из хитозана и альгината

Общим решением безопасности АСИТ является предупреждение контакта аллергенов с IgE антителами, депонированными на тучных клетках, находящихся под сосудистым руслом. Подкожное введение терапевтических препаратов неизбежно приводит к контакту аллергенов с IgE, с чем связана низкодозовая АСИТ. Задачей данной части работы было капсулирование аллергенов с целью предупредить такой контакт, что позволит увеличить терапевтическую дозу и ускорить лечение.

3.1.1 Получение и первичная характеристика рекомбинантных белков Derf 1, Derf 2, Asp f 2 и Asp f 3

В исследовании использовали рекомбинантные белки из условно патогенного гриба *Aspergillus fumigatus* - Asp f 2 и Asp f 3 (предоставлены V.P. Kurup, USA) и клещей домашней пыли – Derf 1 и Derf 2 (предоставлены Д.Ю. Рязанцевым, ИБХ РАН, Москва). Белок Asp f 2 имеет молекулярную массу 37 кДа, гомологичный цитозольному белку из *A. nidulans*, а также фибриноген-связывающим и рН регулирующим белкам *Candida albicans*. Содержание белка Asp f 2 в экстракте мицелия исследуемого штамма Af составляет примерно 5%. Белок Asp f 3 гомологичен белкам пероксисомальной мембраны *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Candida boidinii*. Молекулярная масса Asp f 3 - 18 кДа. Его содержание в экстракте мицелия Af около 1%. Антитела, специфичные к Asp f 2 и Asp f 3, определяются у 60-80% больных АБЛА, что позволяет называть их основными белками-аллергенами.

Аллергия на КДП широко распространена и не может контролироваться элиминационными мероприятиями. При тестировании сывороток больных аллергией, 70% сывороток распознавали Der f 1, 79% - Der f 2. Комбинация из 2 основных аллергенов позволяет охватить 84,5% пациентов

аллергией на КДП. Таким образом, данные белки можно считать мажорными. MM Der f 1 составляет 25 кДа, Der f 2 – 15 кДа.

На настоящий момент не существует стандартизованных экстрактов для СИТ, что связано с вариабельностью исходных материалов. Экстракты, полученные в различных лабораториях, значительно различаются по составу антигенов. Поэтому получение рекомбинантных белков и выявление мажорных аллергенов является необходимым этапом исследований по разработке препаратов для СИТ.

Наработка перечисленных белков–аллергенов, использованных в работе, осуществлялась в клетках *E. coli*. В соответствующие участки генов белка были вставлены фрагменты, кодирующие «His-tag» - 6 повторяющихся остатков гистидина, благодаря чему белки имели сродство к Ni-Агарозе. Белки Derf 1, Derf 2 в бактериальных клетках находятся в телах включения, Aspf 2 и Aspf 3 можно выделять в нативных условиях, но при выделении из тел включения выход целевого продукта был выше. Соответственно, для выделения белков использовали протокол в денатурирующих условиях в присутствии 8М мочевины. Фракцию, в которой предполагали наличие необходимого белка, после снятия с колонки, анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Результаты электрофореза используемых в работе белков приведены на рисунке 9. Хранение белков осуществляли в 8М мочеvine при -20°C.

3.1.2 Получение и физико-химические свойства наночастиц на основе хитозана и его производных

Одним из возможных способов создания безопасных и эффективных вакцин для АСИТ является формирование барьера между аллергеном и IgE, что предотвратит связывание с IgE, иммобилизованными на мембранах тучных клеток, выброс провоспалительных факторов и позволит безопасно увеличить терапевтическую дозу для АСИТ. В данной работе предлагается создание барьера за счет капсулирования белковых аллергенов для АСИТ в полимерный матрикс (Рисунок 10).

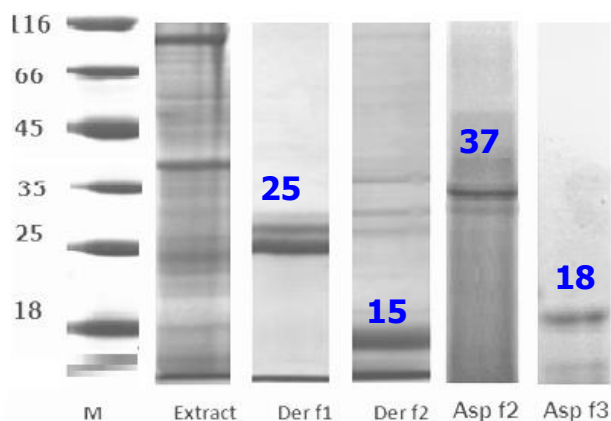
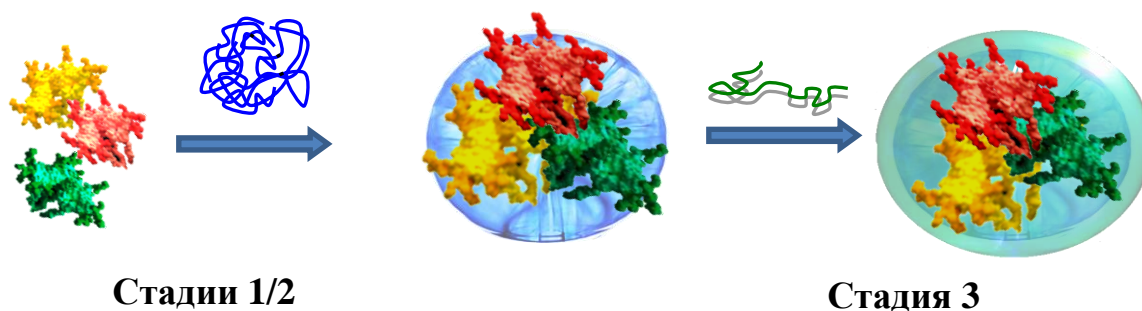


Рисунок 9. Электрофорез в ПААГ-ДСН белков Der f 1, Der f 2, Asp f 2, Asp f 3 и тотального экстракта клещей домашней пыли. М- стандарты молекулярной массы



Стадии 1/2
Конъюгация аллергенов с хитозаном и формирование частиц

Стадия 3
Покрывание частиц дополнительной полимерной оболочкой из альгината

Рисунок 10. Принципиальная схема формирования барьера между аллергенами и IgE за счет капсулирования аллергенов в полимерный матрикс

На стадии 1 формируются частицы на основе производных хитозана. На этой же стадии в дальнейшем включаются рекомбинантные аллергены (стадии 1/2). На стадии 3 частицы дополнительно покрываются альгинатом для снижения доступа IgE к аллергену.

Модификацию хитозана проводили для следующих целей:

- для оптимизации гидрофильно-липофильных свойств вводили остатки жирной кислоты.
- для оптимизации кислотно-основных свойств вводили гидрофильные группировки, содержащие COOH-группу (остатки янтарной кислоты).

Присутствие остатка дикарбоновой кислоты придает полимерной матрице растворимость в водном растворе в широком диапазоне рН, и, кроме того, выполняет функции спейсера при конъюгации с белком. Остатки жирных кислот повышают сродство матрицы к липидной мембране клетки, повышают стабильность частиц и способствуют формированию частиц методом самосборки за счет гидрофобных взаимодействий.

3.1.3 Характеристика производных хитозана с различными гидрофобными заместителями

Модификацию проводили в 2 стадии. На первой стадии получали N-оксисукцинимидный эфир (NOS) жирной кислоты (метод активированных эфиров). А на второй - проводили реакцию ацилирования в водно-органической среде по стандартной методике. Аналогичным образом проводили ацилирование непредельными кислотами (олеиновой кислотой).

При работе с высшими жирными кислотами (ВЖК) ($C > 12$) встречаются отдельные трудности. Известно, что ангидриды ВЖК малореакционноспособны из-за стерических эффектов, в результате достигают высокой степени ацилирования только при нагревании реакционной смеси на кипящей водяной бане и в присутствии пиридина. Кроме того, реагенты берутся в большом избытке (15 мкм ангидрида ВЖК на 1 аминокгруппу хитозана). Серия продуктов, полученных N-ацилированием хитозана пальмитиновой и стеариновой кислотой, с разной степенью замещения была нерастворима в воде в широком диапазоне рН. Однако при введении пальмитиновой кислоты с соотношением менее 10/100 продукт является растворимым в водных буферных растворах. Путем взаимодействия хитозана с ангидридами карбоновых кислот в данной работе был получен ряд производных: гексаноил-,

деcanoил- и лаурил–хитозан (Таблица 4). Степень замещения полученных производных определяли методом протонного ЯМР. Полученные данные относили на 100 моносахаридных звеньев (умножали на 100) .

3.1.4 Формирование наночастиц на основе гидрофобизованных производных хитозана методом самосборки

Из полученных производных хитозана при переводе их диализом из спиртового раствора в водный формировались частицы методом самосборки, физико - химические параметры которых приведены в таблице 4. Размер частиц определяли с помощью динамического светорассеяния.

Таблица 4 – Физико-химические параметры наночастиц, полученных из производных хитозана с помощью введения остатков жирных кислот

Номер образца	Производное хитозана	Расчетная СЗ, %	Полученная СЗ, %	Размер (ДСР) основной фракции
1	Исходный	0	0	-
2	Гексаноил	15	12	850±200
3	Деканоил	15	9	500±200
4	Лаурил	15	8	250±100

При анализе диаметра полученных частиц на основе гексаноил-, деканоил- и лаурилхитозана методом ДСР в мультимодальном режиме часто происходит разделение частиц на фракции, причем первая фракция соответствовала индивидуальным частицам, вторая – их агрегатам. Для гексаноилхитозана основную фракцию составляли крупные частицы и их агрегаты размером около 850 нм (Рисунок 11). Для деканоил- и лаурилхитозана был получен пул индивидуальных частиц размером 500 и 250 нм соответственно. Частицы, полученные на основе гексаноил- и деканоил-хитозана, имели более крупный размер, а также образовывали больший процент агрегатов, что может быть связано с недостаточной длиной

углеводородной цепи, и, соответственно, недостаточной гидрофобностью, для сворачивания цепи хитозана в стабильную частицу.

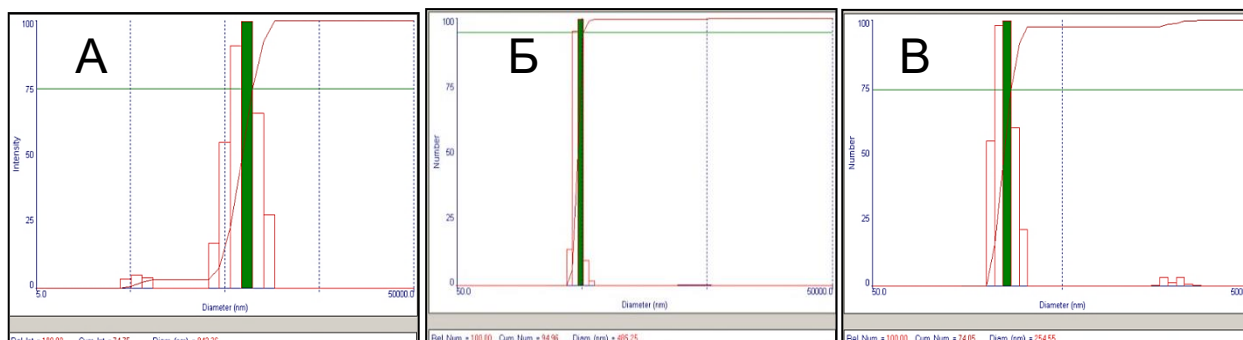


Рисунок 11. Распределение частиц на основе гексаноил-хитозана (А) деканоил-хитозана (Б) и лаурил-хитозана (В) по размеру, определенное методом динамического светорассеяния

Отсюда можно предположить, что длина цепи жирной кислоты обратно пропорционально количеству молекул хитозана, требуемых для образования частиц методом самосборки. Таким образом, стабильные положительно заряженные наночастицы были получены из лаурилхитозана (ЛХ).

3.1.5 Характеристика хитозанов с разной степенью замещения карбоксильными группами

Отдельным этапом модификации хитозана являлась введение карбоксильных групп при реакции с ангидридом янтарной кислоты. Добавление таких групп влияет на растворимость полимера в различных диапазонах рН, но при этом существенно меняет заряд (дзета-потенциал), который, в свою очередь является важным свойством поверхности наночастиц. Дзета-потенциал - это разность потенциалов, возникающая между диспергированной частицей и дисперсионной средой в силу их взаимного перемещения. На значение потенциала оказывает существенное влияние природа материала дисперсной фазы и дисперсионной среды. Наночастицы с дзета-потенциалом около 30 мВ не агрегируют, т.е. стабильны в суспензии.

Ранее было показано, что положительно заряженные хитозаны спонтанно собираются в ассоциаты и имеют вид продолговатых частиц-палочек.

Образование ассоциатов между молекулами хитозана связано с наличием в структуре полимера двух типов противоположно заряженных групп: amino- и ацетильных групп, с преобладающим количеством первых. При этом чем выше степень дезацетилирования, тем выше заряд хитозана и меньше процент и размер ассоциатов. В процессе дезацетилирования уменьшается жесткость полимерной цепи и улучшается подвижность звеньев хитозана относительно друг друга, что полезно при формировании частиц методом самосборки, при котором одна или несколько молекул хитозана сворачиваются в частицу, желательную сферическую, за счет сил гидрофобного взаимодействия. Таким образом, в качестве исходного производного был выбран хитозан с СД 80-90%.

Проведенные нами исследования показали, что понижение заряда при помощи добавления карбоксильных групп усиливает процесс агрегации. Это может быть связано с тем, что при понижении заряда уменьшаются силы электростатического отталкивания частиц друг от друга, а также с тем, что увеличивается количество групп, способных реагировать с изначально присутствующими в составе полимера аминогруппами, создавая при этом полиэлектролитные комплексы. Поэтому перед нами стояла задача подобрать оптимальную степень замещения, при котором производные легко растворяются при физиологическом значении рН, что позволяло бы работать с хитозаном в мягких условиях без использования концентрированных кислот при иммобилизации лигандов, но при этом общий заряд полимера должен был измениться минимально. Для этого получали ряд производных с различной степенью замещения карбоксильными группами.

Реакцию проводили стандартным методом. Ангидрид янтарной кислоты вводили в реакционную смесь в расчете на степень замещения 20, 40, 60, 80 на 100 групп хитозана с учетом, что выход реакции не может составлять 100%. Образцы характеризовали с помощью ЯМР (Рисунок 12).

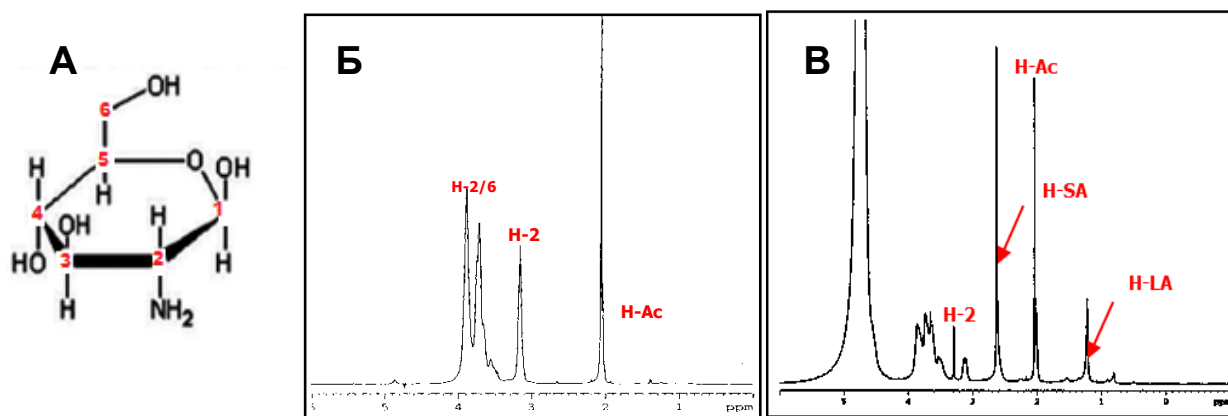


Рисунок 12. Схема ^1H -ЯМР хитозана. А- порядок расположения углеродов и прилежащих к ним протонов в звене хитозана. Б – исходный немодифицированный хитозан 40 кДа, В–лаурилсукциноилхитозан.

Характеристики производных представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Параметры сукциноилхитозанов с различной степенью замещения

Номер образца	СЗ хитозана, %		Выход реакции	Растворимость при рН = 7
	Расчетная	Практическая		
1	20	16	85	нет
2	40	34	85	нет
3	60	52	82	да
4	80	64	78	да

При проведении реакции наблюдалась обратная зависимость между расчетной степенью замещения и выходом, что можно объяснить стерическими затруднениями. Расчетные СЗ подбирались с достаточно большим интервалом, т.к. чтобы оценить промежуток, при которых полимер становится растворимым при нейтральном рН с не требовалась большая точность, поскольку в дальнейшем предполагалось проводить двойную реакцию по модификации хитозана жирными кислотами и карбоксильными группами, и при таких условиях практический выход и СЗ могли отличаться.

3.1.6 Выбор молекулярной массы хитозана, размера частиц и исходной концентрации полимера

Дальнейшие исследования были связаны с выбором ММ образцов хитозана для получения стабильных частиц с оптимальным размером. Размер частиц является одной из главных характеристик наносистем, которая влияет на сорбционную емкость и стабильность наночастиц. Кроме того, этот параметр оказывает существенное влияние на эффективность высвобождения веществ, включенных в такие наночастицы. В ряде работ было показано, что наночастицы субмикронного размера являются более эффективными носителями лекарственных средств, чем микрочастицы, т.к. обладают более высокой способностью проникать в клетки и могут быстрее достигать мишени. Например, наночастицы, размером около 100 нм проникают в клетки в 2,5 раза более эффективно, чем микрочастицы размером 1 мкм, и в 6 раз более эффективно, чем микрочастицы размером 10 мкм. В экспериментах *in vivo* было показано, что наночастицы способны проникать через слизистый слой кишечной стенки, в то время как микрочастицы преимущественно задерживаются на ее поверхности [104].

Частицы меньше 100 нм в большинстве случаев не стабильны и склонны к агрегации, поэтому главной задачей при формировании наночастиц является подбор условий для получения стабильных частиц оптимального размера [242].

ММ также влияет на свойства получаемых на полимерной основе наночастиц, например, для наночастиц, полученных методом ионотропного гелеобразования, было установлено, что их размер увеличивается с ростом ММ полимера [243].

Для проверки, работает ли данная гипотеза при получении частиц методом самосборки, использовали лауриновые производные, полученные из хитозана ММ=40кДа, СД= 85 % и 300 кДа, СД=80 %. СЗ для образцов составляла 10-12%. Было установлено, что ММ исходного хитозана влияет на размер получаемых частиц. Из хитозана с ММ 40 кДа были сформированы наночастицы меньшего размера (170 ± 100 нм), в то время как из образцов с ММ

300 кДа формировались частицы 350 ± 100 нм, к тому же возрастал процент агрегатов (Рисунок 13).

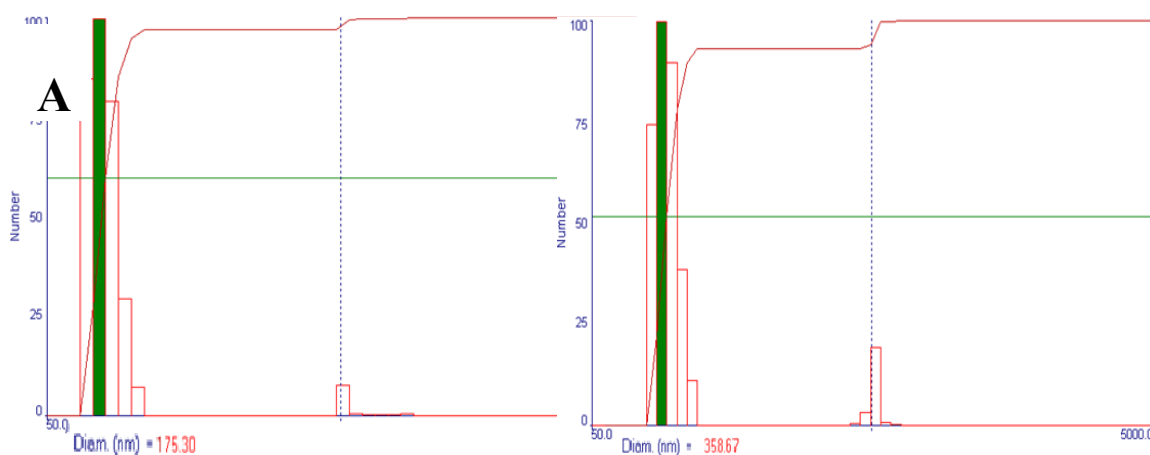


Рисунок 13. Распределение частиц лаурил-хитозана с ММ 40 кДа (А) и 300 кДа (Б) по размеру

Из полученных результатов можно сделать вывод, что оптимальной ММ для получения наночастиц методом самосборки можно считать 40 кДа.

Из литературных данных известно, что наночастицы хитозана формируются в диапазоне концентраций хитозана от 1 до 5 мг/мл [244]. Исходная концентрация полимера, из которого конструируют частицы, как правило, влияет на их физико-химические характеристики. Мы исследовали влияние исходной концентрации предварительно полученных ЛСХ (СЗ 15% ВЖК и 60% карбоксильных групп (расчетное) от 1 до 5 мг/мл. Концентрацию более 5 мг/мл не использовали ввиду ухудшения его растворимости в условиях опыта. Было показано, что размер частиц в диапазоне этих концентраций находился в пределах от 200 до 500 нм. При концентрации ЛСХ от 1 до 5 мг/мл наблюдали постепенное увеличение дзета-потенциала и размера частиц. Дзета-потенциал является критическим параметром стабильности системы. Благодаря одноименному заряду на поверхности, наночастицы отталкиваются друг от друга, препятствуя агрегации. При концентрации выше 5 мг/мл дзета-потенциал снижался, о чем свидетельствовало увеличение размера частиц до 1,5 мкм. Кроме того, при уменьшении концентрации хитозана до 1 мг /мл снижался выход частиц. При конечной концентрации СХ 3 мг/мл формировались наночастицы с размером 200-250 нм. Заряд частиц составил -

20-25 мВ. Следовательно, оптимальной считали исходную концентрацию лаурилсукциноил– хитозана 3 мг/мл.

3.1.7 Получение частиц из лаурилсукциноилхитозана методом самосборки

Для получения частиц были подобраны условия модификации, определены концентрация и ММ хитозана, позволяющие получить частицы желаемого размера. Но так как до этого осуществлялась модификация отдельно остатками жирной кислоты, отдельно сукциноильными остатками, необходимо было более точно подобрать условия одновременной модификации обеими перечисленными группами. Для этого подбирали различные СЗ хитозана: остатками жирной кислоты – 10, 15 или 20% , сукциноильными – 60, 80 или 100%. Далее частицы формировали методом самосборки во время диализа из водно-спиртового раствора, в котором получали ЛСХ, в водный раствор (Рисунок 14).

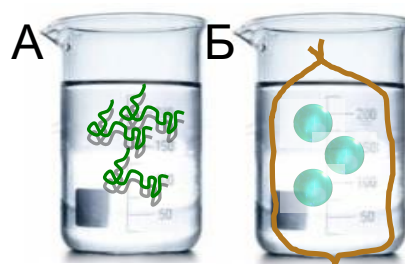


Рисунок 14. Схема получения частиц методом самосборки при диализе из водно-спиртовой (А) в водную фазу (Б)

При переводе ЛСХ из водно-спиртовой среды в водную методом диализа наблюдалось образование суспензии частиц, т.к. в водной среде цепи жирных кислот, иммобилизованные на полимере, теряли свою растворимость и сворачивали молекулу или несколько молекул хитозана в частицы.

Размер и дзета-потенциал полученных частиц определяли методом ДСР (Таблица 6).

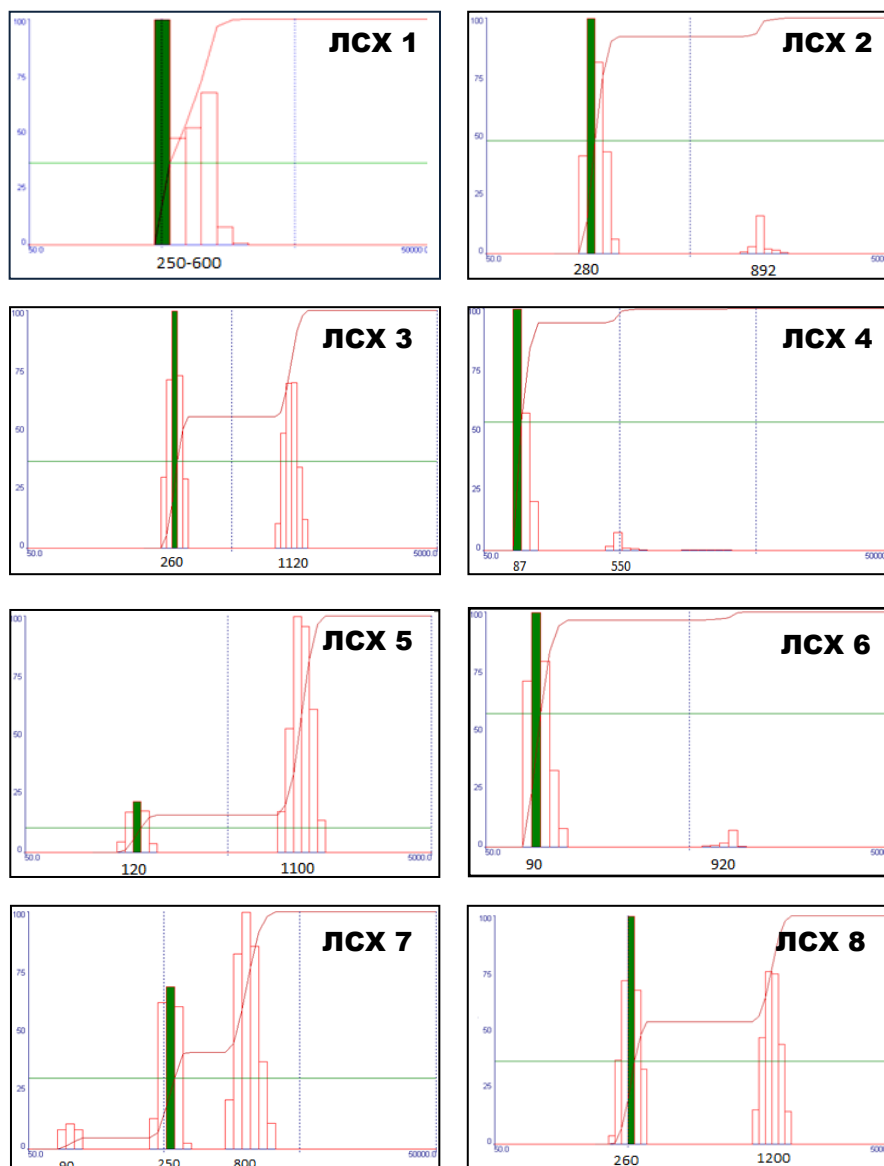


Рисунок 15. Распределение частиц различных по СЗ образцов лаурилсукциноилхитозана (ЛСХ) по размеру, измеренное методом динамического светорассеяния

Для визуализации полученных частиц использовали флуоресцентно меченные производные хитозана, из которых описанным способом получали частицы (Таблица 6). Показали, что не все производные формировали стабильные частицы (Рисунок 16).

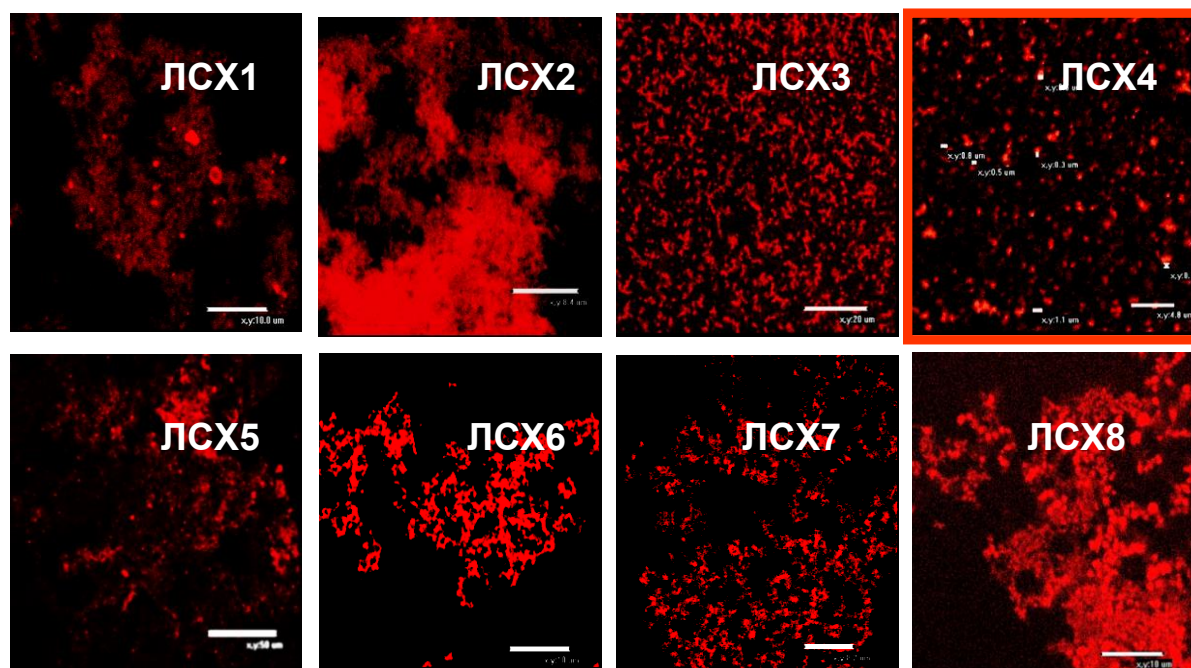


Рисунок 16. Конфокальная микроскопия родамин В - меченных наночастиц ЛСХ (Таблица 6). Увеличение $\times 60000$. Линейными отрезками приведены размеры объектов, оцениваемые с помощью встроенной линейки на конфокальном микроскопе. Наиболее стабильные частицы формировались из ЛСХ4 (красная рамка)

Таким образом, для дальнейших испытаний оптимальным по размеру (90-400 нм) и морфологии, с наименьшим количеством агрегатов был выбран образец ЛСХ 4 со степенью замещения 12 % остатков лауриновой кислоты и 48 % карбоксильных групп (Таблица 6).

Таблица 6 - Оптимизация степени замещения аминогрупп хитозана жирнокислотными и сукцинильными остатками

	ЛК/ЯА на 100 звеньев хитозана		Средний диаметр частиц, нм	Морфология частиц
	расчетное	опытное		
ЛСХ 1	10/60	6/50	250-600	Крупные частицы
ЛСХ 2	10/80	7/69	50-1280	Сферические частицы и агрегаты
ЛСХ 3	10/100	6/82	200-260	Крупные агрегаты
ЛСХ 4	15/60	12/48	90-400	Сферические
ЛСХ 5	15/100	11/65	60-120	Крупные агрегаты
ЛСХ 6	20/60	19/54	90-250	Сферические и палочкообразные
ЛСХ 7	20/80	18/59	90-250	Частицы и агрегаты
ЛСХ 8	20/100	11/83	260-450	Частицы и агрегаты

3.1.8 Включение рекомбинантных белков в состав наночастиц

Включение аллергенов осуществляли на стадии формирования частиц за счет сшивки белков с ЛСХ с помощью активации карбоксильных групп ЛСХ. Данная реакция проводится в водных растворах, проста в применении и имеет высокую скорость. Однако образование трудноотделимой дициклогексил мочевины, а так же высокая реакционная способность побочных продуктов не позволяют работать с чувствительными карбоксильными компонентами. Протекание побочных реакций можно существенно уменьшить, если проводить конденсацию в присутствии нуклеофила, быстро реагирующего с О-ацилизомочевинной образованием ацилирующего агента, который достаточно реакционноспособен для аминолиза, но более избирателен и не вызывает рацемизации или побочных реакций. Таким реагентом является N-оксисукцинимид, который эффективно подавляет образование N-ацилмочевины и снижает рацемизацию.

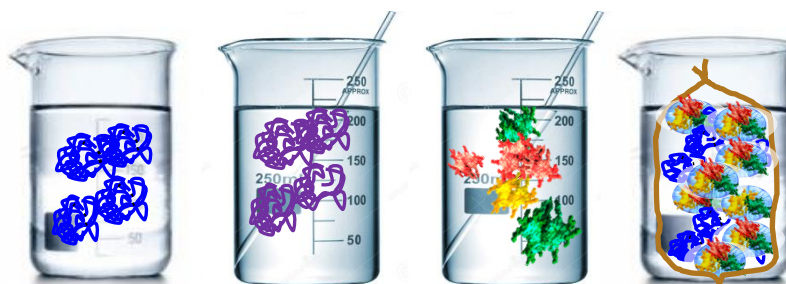
Несмотря на то, что дициклогексил мочевины плохо растворима, иногда ее не удается полностью удалить из реакционной смеси, поэтому количественное отделение ее от продукта реакции в ряде случаев бывает затруднительным. Водорастворимый N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимид позволяет решить не только эту проблему, но и проблему удаления остаточной N-ацилмочевины, поскольку в этом случае сопутствующие и побочные продукты можно удалить экстракцией, используя аминную функцию в качестве «якоря» [136]. В данной работе в качестве активатора был выбран N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимид. В качестве карбоксильного компонента использовали модифицированный остатками янтарной кислоты хитозан, при этом в полимере на 100 МЗ присутствовали 48 карбоксильных групп и 12 групп жирной кислоты и соответственно 40 свободных аминогрупп, не несущих защитную группировку, а в качестве лигандов, несущих аминогруппу использовали рекомбинантные белки.

Перед нами стояла задача по возможности иммобилизовать белок на развернутую цепь хитозана, после чего её «свернуть», что с большей вероятностью помогло бы поместить белок, как гидрофобный элемент, наряду с остатками лауриновой кислоты, внутрь частиц. Хитозан, даже модифицированный, лучше всего растворяется в присутствии уксусной кислоты, но в данном случае, поскольку иммобилизацию белка проводили карбодиимидным методом, карбоксильная группа на уксусной кислоте так же может активироваться карбодиимидом и пришиваться на полимер. Поэтому в качестве водной составляющей был взят фосфатно-солевой буфер (PBS), т.к. во-первых, он изотоничен и нетоксичен для клеток, а во-вторых, в отличие от уксусной кислоты, не имеет групп, конкурирующих с лигандом за карбоксильную группу на матрице. В качестве органического растворителя взяли этанол.

Хитозан растворяли в водно-спиртовом растворе с минимальным процентным содержанием спирта, достаточным для того, чтобы ЛСХ4 не образовывал суспензию (вода:спирт 2:3). В этих условиях проверяли, чтобы

рекомбинантные белки (Derf 1, Derf 2, Aspf 1 и Aspf 2), которые так же являются гидрофобными, были растворимы, что необходимо для более полной иммобилизации аминокрупп белка на карбоксильных группах хитозана. Карбодиимид добавлялся в раствор ЛСХ4 (Рисунок 17, стадии 1-2) в расчёте на активацию приблизительно половины карбоксильных групп. При проведении синтеза учитывали возможность конденсации матрицы на стадии активации карбоксильных групп. В предварительных экспериментах установили, что реакцию необходимо проводить в следующих условиях:

- 1) высокая концентрация компонентов;
- 2) интенсивное перемешивание;
- 3) охлаждение на ледяной бане при активации карбоксильных групп;
- 4) рН не более 7,8.



Стадии 1

2

3

4

Рисунок 17. Схема получения частиц ЛСХ с аллергенами. Стадии: 1. Раствор ЛСХ в спиртовой среде спирт/вода 4:1; 2. Активация ЛСХ КДИ, 10 мин, на льду, при перемешивании; 3. Добавление белка, 12 ч, RT, перемешивание; блокирование активированных групп избытком глицина; 4. Диализ против воды, самосборка частиц, 1 ч, центрифугирование 14 т об/мин, 20 мин.

Раствор белка комнатной температуры добавляли в реакционную смесь по каплям при интенсивном перемешивании и оставляли при перемешивании

при комнатной температуре в течение 12 ч (Рисунок 17, стадия 3). По окончании инкубации в реакционную смесь добавляли избыток глицина для дезактивации остаточных активированных карбоксильных групп и смесь перемешивали в течение 12 ч. Для удаления побочных продуктов реакции раствор диализовали против фосфатно-солевого буферного раствора. Затем, полученный конъюгат обрабатывали небольшим количеством сшивающего агента (активированной карбодиимидом лимонной кислотой) для более плотной фиксации лиганда на хитозане. В итоге было получено ядро целевой конструкции в виде частиц, которые образуются за счет гидрофобных взаимодействий и ковалентного связывания матричного носителя.

Концентрацию белков подбирали таким образом, чтобы весь белок иммобилизовался на полимере. Отсутствие в полученном растворе несшитых белков контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (Рисунок 18).

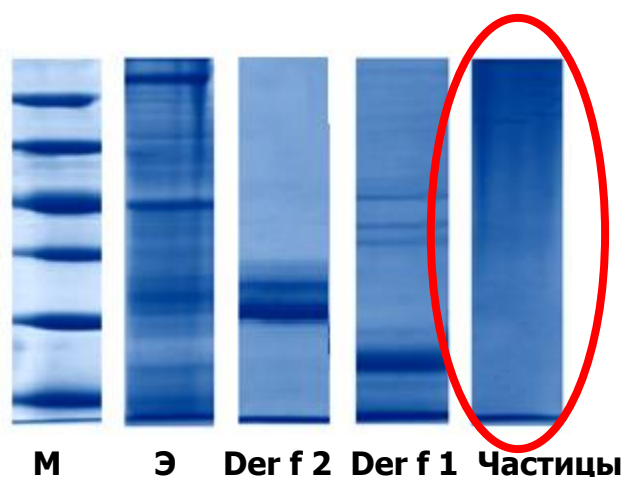


Рисунок 18. Электрофорез в ПААГ белков и частиц. М – маркер, Э – экстракт КДП, белки Derf 1 и 2, частицы, содержащие смесь белков Derf 1 и 2

Выяснилось, что для полной иммобилизации необходимо соотношение хитозан/белок 10:1. Показали, что при таком соотношении результаты электрофореза показывают отсутствие свободных белков, что означает их полное связывание с хитозаном (Рисунок 18). Необходимость избавиться от свободных белков в растворе вызвана условиями их применения - при попадании их вместе с вакциной в кровь возникает контакт между ними и

тучными клетками, что может привести к воспалительной реакции у больного даже при очень низких дозах.

3.1.9 Характеристика частиц, содержащих аллергены.

Для оценки количества включенного в частицы белка, производили его предварительное мечение флюоресцентным красителем родамином В. Титровочную кривую получали с помощью смеси свободных белков Der f 1 и Der f 2, Aspf 1 или Aspf 2 меченных родамином В, с известной концентрацией. Количество связанного белка было близко к количеству введенного в реакцию, что подтверждает полноту прохождения реакции. Для определения выхода наночастиц и анализа соотношения ЛСХ4/белок использовали массу сухой навески наночастиц. Частицы имели слабый положительный заряд и диаметр около 100-120 нм, что определяли методом динамического светорассеяния (Рисунок 19).

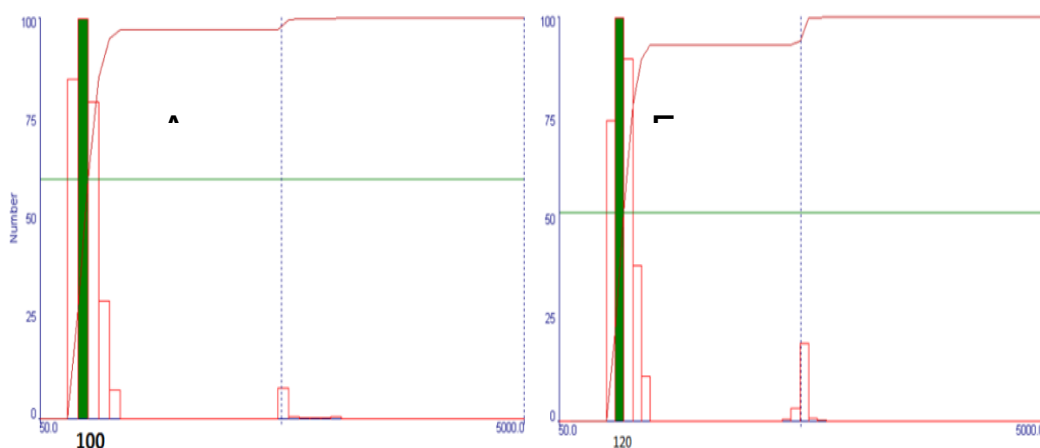


Рисунок 19. Диаграмма динамического светорассеяния частиц, полученных из лауроилсукцинаилхитозана и рекомбинантных белков. А – смесь белков Der f1 и Der f 2, Б – смесь белков Aspf 1 и Aspf 2

3.1.10 Получение двухслойных частиц белок-хитозан-альгинат

Поскольку упаковка белков в гидрофобные частицы не может полностью закрывать весь белок и некоторые его эпитопы могут находиться на поверхности частиц, что достаточно для их распознавания IgE, то следующей стадией получения целевой конструкции являлось формирование оболочки, предназначенной для более плотной упаковки белков-аллергенов. Для этого использовали соль альгиновой кислоты (полианион), способную образовывать полиэлектролитный комплекс с хитозаном за счет электростатических взаимодействий с его положительно заряженными аминогруппами. Комплекс формировался при добавлении и перемешивании к раствору активированного карбодиимидом альгината натрия к суспензии полученных ранее наночастиц (Рисунок 20). Количество альгината натрия подбирали с целью формирования отрицательно заряженных частиц.

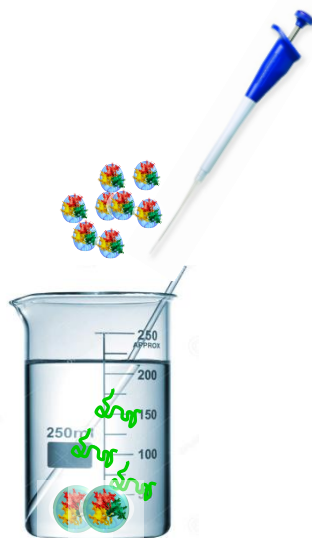


Рисунок 20. Схема формирования двухслойных частиц, содержащих аллерген, лаурилсукциноилхитозан и альгинат

Реакцию проводили следующим образом: альгинат растворяли в разбавленном (1:10) фосфатно-солевом буферном растворе, добавляли карбодиимид из расчета активации 50% карбоксильных групп, перемешивали в течение 20 мин на ледяной бане и затем в реакционную смесь при интенсивном перемешивании добавляли микрокаплями суспензию частиц, содержащих

рекомбинантные белки, после чего полученную смесь инкубировали в течение 30 минут. Реакция проводилась в присутствии активированного альгината в расчете на создание ковалентных связей между полимерами для того, чтобы обеспечить более устойчивое покрытие ядра помимо образования рН-зависимых полиэлектролитных комплексов, таким образом надежно блокируя рекомбинантные белки при любом значении рН.

На этой стадии также требовалось изучение условий проведения реакции, с целью оптимизации размеров и степени агрегации целевых конструкций. В процессе исследований было установлено, что для получения конструкций оптимального размера и для уменьшения степени агрегации частиц реакцию следует проводить при следующих условиях:

- раствор оболочки должен быть разбавленным;
- раствор ядра должен быть концентрированным;
- следует использовать тонкий капилляр для введения хитозанового ядра в раствор альгината;
- обеспечение перемешивания максимальной интенсивности при добавлении ядер к оболочке.

В результате были получены частицы с включенными внутрь ядер рекомбинантными белками Der f 1, Der f 2, Asp f 1 и Asp f 2, дополнительно покрытыми пленкой из альгиновой кислоты. Покрытие альгинатом увеличивало размер частиц (Рисунок 21). Частицы имели заряд примерно -15 мВ. Морфологию и гомогенность полученных частиц анализировали методом конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентно меченых белков, входящих в состав частиц (Рисунок 21). Покрытие частиц ЛСХ альгинатом увеличивало их размер. Для анализа внутренней структуры полученных частиц использовали новый метод модуляционной лазерной микроскопии (МИМ), при котором частицы высушиваются на поверхности зеркала и анализируются с помощью интерференции проходящего и отраженного лучей.

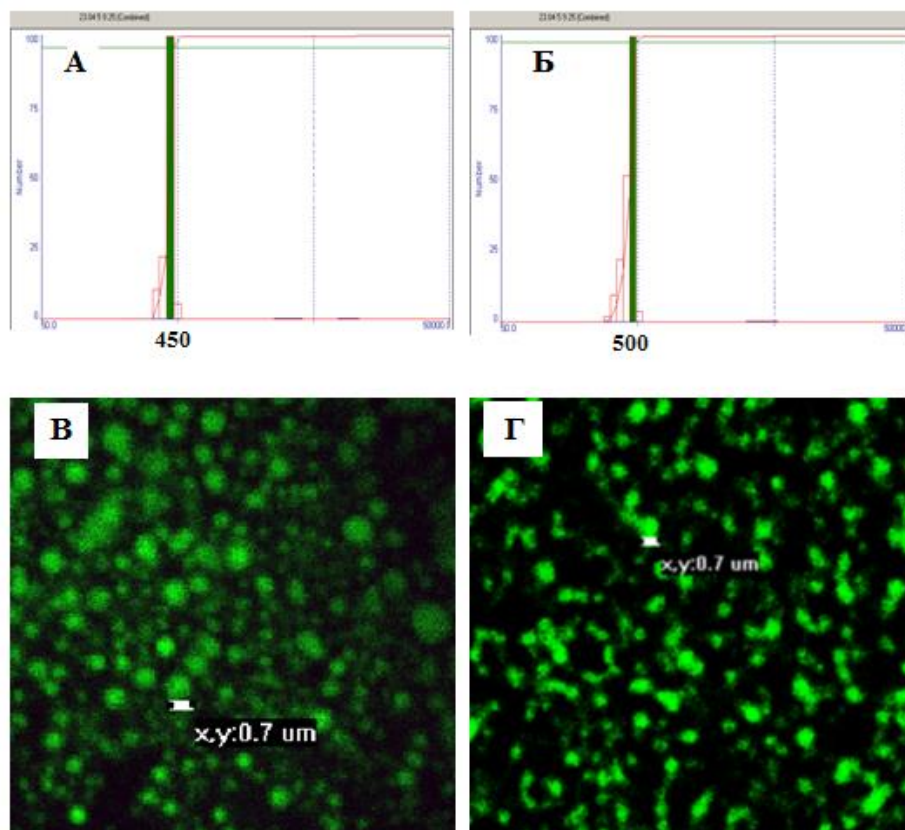


Рисунок 21. Определение размера и морфологии частиц Derf 1/2-ЛСХ-альгинат (А, В) и Aspf 2/3-ЛСХ-альгинат (Б, Г) методами ДСР (А и Б) и конфокальной микроскопии (В и Г).

Полученная суспензия состояла из однородных частиц (Рисунок 22 А и Б), имеющих слегка овальную форму (В и Д) полых внутри с выраженной 2-слойной структурой, внутренний слой которой сформирован гидрофобным ядром и белками (Рисунок 22 Г и Е), а внешний – альгиновой кислотой (ЛСХ-АЛГ) (Рисунок 22 Е). На Рисунок 22 также приведены форма и структура ядра частиц (В и Г), где частицы имеют регулярно упакованную однослойную структуру.

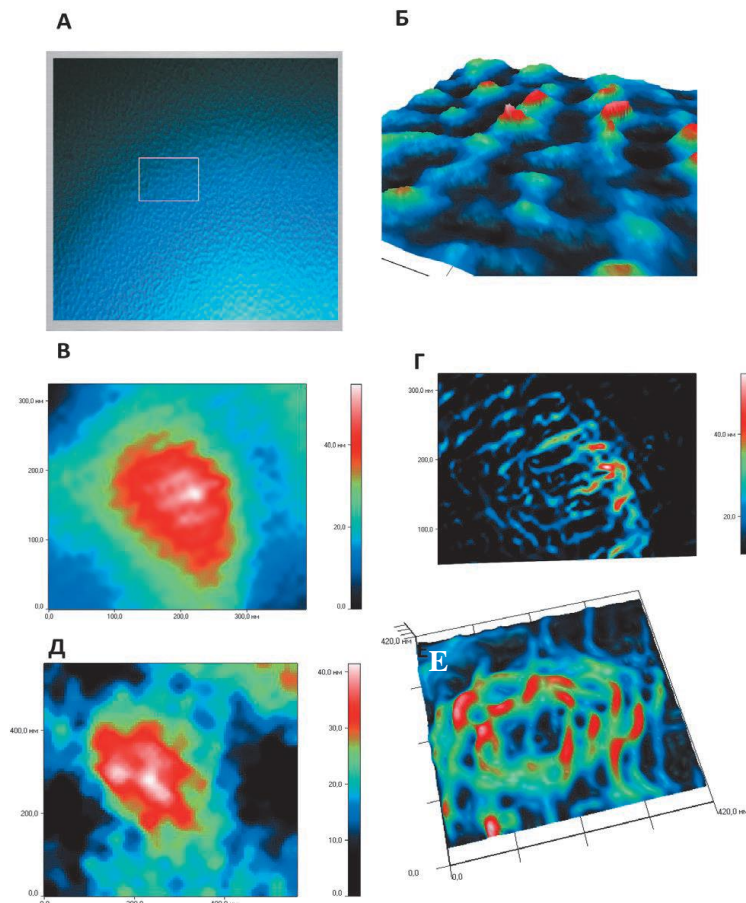


Рисунок 22. Структура частиц, полученная методом модуляционной интерференционной микроскопии (МИМ): А, Б – общий вид наночастиц ЛСХ-АЛГ; В–Е – интерференционные изображения формы и структуры ядра ЛСХ (В, Г) и частицы ЛСХ-АЛГ (Д и Е): вид сверху (В и Д) и в разрезе (Г и Е).

3.1.11 Получение частиц методом электроспрея

Процесс получения частиц методом самосборки многостадийен и является трудновыполнимым в условиях масштабирования. Поэтому перед нами стояла задача разработать альтернативный метод получения частиц с сокращенным количеством стадий и меньшей продолжительностью. Для этих целей был выбран метод получения частиц с помощью электрораспылительной установки.

В этом случае не требуется получения гидрофобизированного производного. Особое внимание при использовании данного метода необходимо было уделить подбору условий. Подбирали оптимальное соотношение концентрации полимера и растворитель таким образом, чтобы

электропроводность раствора была в пределах от 1000 до 2000 mS/sm. Раствор хитозана вне указанных пределов электропроводности не образовывал спрей и установка испускала разряды тока.

Поскольку хитозан при использовании данного метода не модифицировали, его растворение осуществляли в 10% уксусной кислоте с образованием очень концентрированного раствора, который потом разбавляли водой до 3% содержания кислоты. Неорганические кислоты при растворении хитозана не использовали, т.к. их добавление способствует увеличению электропроводности раствора, которая, при растворении хитозана в водно-уксусной фазе и так была выше установленного предела. Увеличение процентного содержания этанола в растворителе способствует повышению вязкости раствора. Поэтому для понижения проводимости, в концентрированный раствор хитозана добавляли этанол и подбирали оптимальное соотношение вода-этанол.

Важно было установить концентрацию раствора хитозана для формирования частиц. Концентрация раствора напрямую влияет на его вязкость (Таблица 7). В случае недостаточной вязкости раствор вместо частиц формировал большие капли, в случае избытка – нити и волокна. Третьим важным параметром являлся размер капилляра, через который происходит распыления раствора. В случае слишком крупного (2 мкм и более) формировались большие капли, в случае слишком мелкого (0,5 мкм) раствор не проходил через капилляр, что может быть связано с тем, что хитозан является жесткоцепным полимером с большой ММ (40 кДа). В качестве рабочего диаметра был выбран 1 мкм. Результаты экспериментов приведены в Таблице 7. Далее было необходимо подобрать условия распыления хитозана с белком при которых формировались частицы. Замена части хитозана на белок при соблюдении тех же концентраций не должна значительно влиять на вязкость и электропроводность, т.к. белки не распадаются на ионы и содержат сравнимое с хитозаном количество заряженных групп.

Таблица 7 - Подбор условий для формирования частиц методом электроспрея

Концентрация хитозана	Состав среды 3% укс. к-ты +	Результат	Причина неудачи
10 мг/мл,	водная	Большие капли	Низкая вязкость
20 мг/мл,	водная	Большие капли	Низкая вязкость
30 мг/мл,	водная	Редкие капли	Низкая вязкость, высокая электропроводность
30 мг/мл	водно- спиртовая, 3:1	Волокна и капли	Низкая вязкость, высокая электропроводность
30 мг/мл	водно- спиртовая, 2:1	Волокна и капли	Низкая вязкость, высокая электропроводность
30 мг/мл	водно- спиртовая, 1:1	Спрей, частицы	

При получении раствора для электрораспыления немодифицированный хитозан ММ 40 и СД 85% растворяли в небольшом количестве 10% уксусной кислоты, добавляли активированный карбодиимидом рекомбинантный белок Derf 2 в соотношении белок : хитозан 1 : 10 и раствор перемешивали в течение 12 часов. Затем добавляли спиртовую фазу (соотношения вода:спирт 1:1, концентрация хитозана 30 мкг/мл). Полученную смесь загружали в кювету установки и через капилляр размером 1 мкм распыляли под высоким напряжением на подложку (Рисунок 23). Раствор, при сообщении ему заряда, формировался в виде частиц, отталкивающихся друг от друга, и при прохождении расстояния от капилляра до подложки частицы уменьшались в размере за счет высыхания.

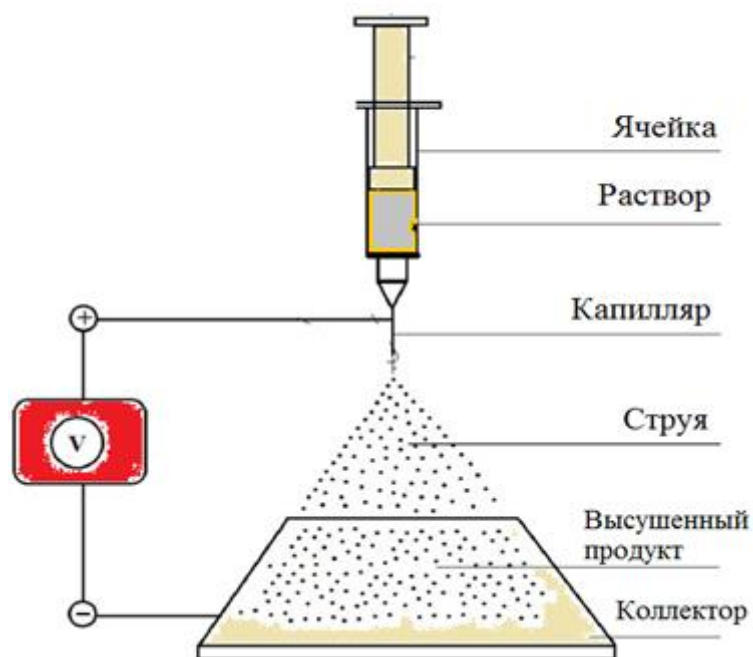


Рисунок 23. Схема установки электрораспылительной сушилки

По стандартной методике на электрораспылительной установке в качестве подложки используется тонкий слой фольги, т.к. подложка должна хорошо проводить ток, направляющий поток частиц в электрическом поле. Мы же столкнулись с трудностью открепления полученных высушенных частиц от фольги с целью их дальнейшего изучения. Поэтому в качестве подложки использовали спирт, находящийся в емкости из фольги. Необходимость использования в качестве собирающей жидкости спирта обусловлена тем, что в водном растворе полученные частицы могли раствориться, что не происходит в органическом растворителе, где немодифицированный гидрофобными остатками хитозан нерастворим и сохраняет форму частиц.

Далее, для получения целевых конструкций, спиртовой раствор частиц по микрокаплям добавляли в водно-спиртовой раствор активированного альгината. Последний в среде с высоким процентным содержанием спирта выпадает в осадок, поэтому соотношение растворителей подбирали таким образом, чтобы, с одной стороны, альгинат был растворим, с другой стороны, частицы белок-хитозан мгновенно не растворялись (соотношение вода:спирт 2:1). В результате получили суспензию частиц (Рисунок 24). Свободный альгинат удаляли центрифугированием (частицы оседали, в отличие от

свободного полимера) с последующим декантированием. Для определения размера и формы частиц хитозан предварительно конъюгировали с FITC. Размер и морфология полученных частиц приведены на рисунке 24. Средний диаметр частиц составил около 450 нм; частицы были гомогенными и стабильными.

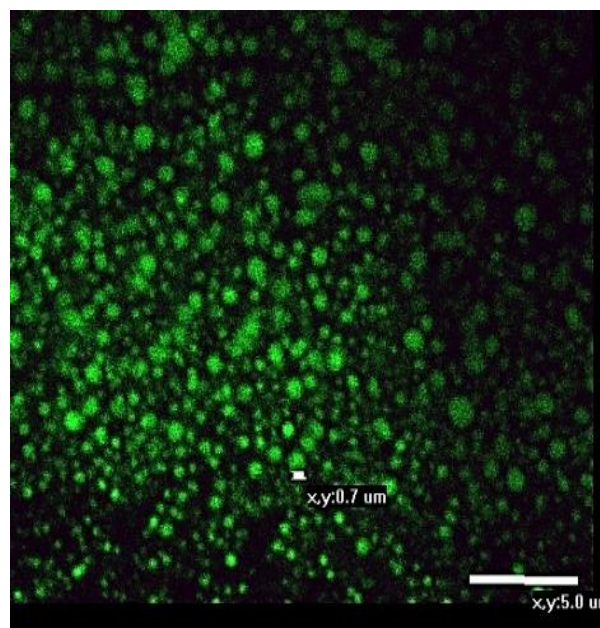
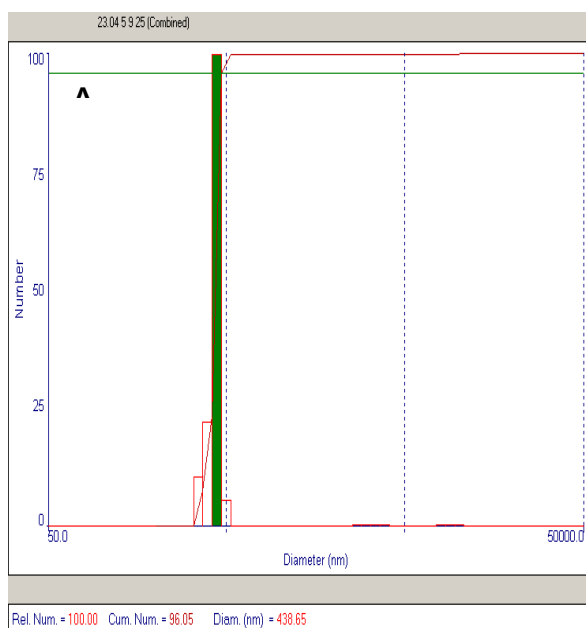


Рисунок 24. Размер (А) и форма (Б) наночастиц хитозана, меченного ФИТЦ, полученных методом электроспрея.

3.2 Иммунологическая характеристика капсулированных аллергенов

Основной задачей работы является капсулирование рекомбинантных белков-аллергенов таким образом, чтобы они не связывались с IgE из сывороток больных с аллергией. В качестве модельных аллергенов в данной работе использовали рекомбинантные белки из КДП и плесневых грибов *Aspergillus fumigatus*. Для выполнения данной задачи необходимо было проверить связывание IgE из сывороток больных с аллергенами, капсулированными в полимерные частицы. Однако для выполнения данной задачи требовалось предварительно подобрать сыворотки, распознающие рекомбинантные аллергены.

3.2.1 Распознавание белков-аллергенов IgE антителами из сывороток больных

Распознавание аллергенов IgE антителами из сывороток больных с аллергией на КДП и гриб *A. Fumigatus* оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Сыворотки крови были предоставлены Институтом вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова МЗ России. В работе использовали 50 сывороток от больных с аллергией на КДП, 50 сывороток - с аллергией на гриб *A. fumigatus* и 25 сывороток здоровых доноров. Данные коммерческого теста RIDA AllergoScreen (R-BiopharmAG, Germany) для предоставленных сывороток приведены на рисунке 25, А и Б. Клещи *D. farinae* (Der f) и *D. Pteronyssinus* (Der p) продуцируют гомологичные аллергены, реакция на них коррелирует с высокой степенью достоверности ($p < 0.001$) (Рисунок 25). RIDA тест основан на иммобилизации экстрактов на мембране и дальнейшем связывании антител с антигеном на мембране, что проявляют вторичными антителами к IgE с пероксидазой хрена. Оценивается интенсивность полосы с помощью денситометра и ранжируется по интенсивности окраски по классам от 0 до 6. При анализе сывороток больных с аллергией на КДП и гриб *A. Fumigatus* обнаружили, что средний класс реакции на КДП был в 2 раза выше, чем на гриб *A. Fumigatus* (Рисунок 25), что соответствует большей аллергенности КДП.

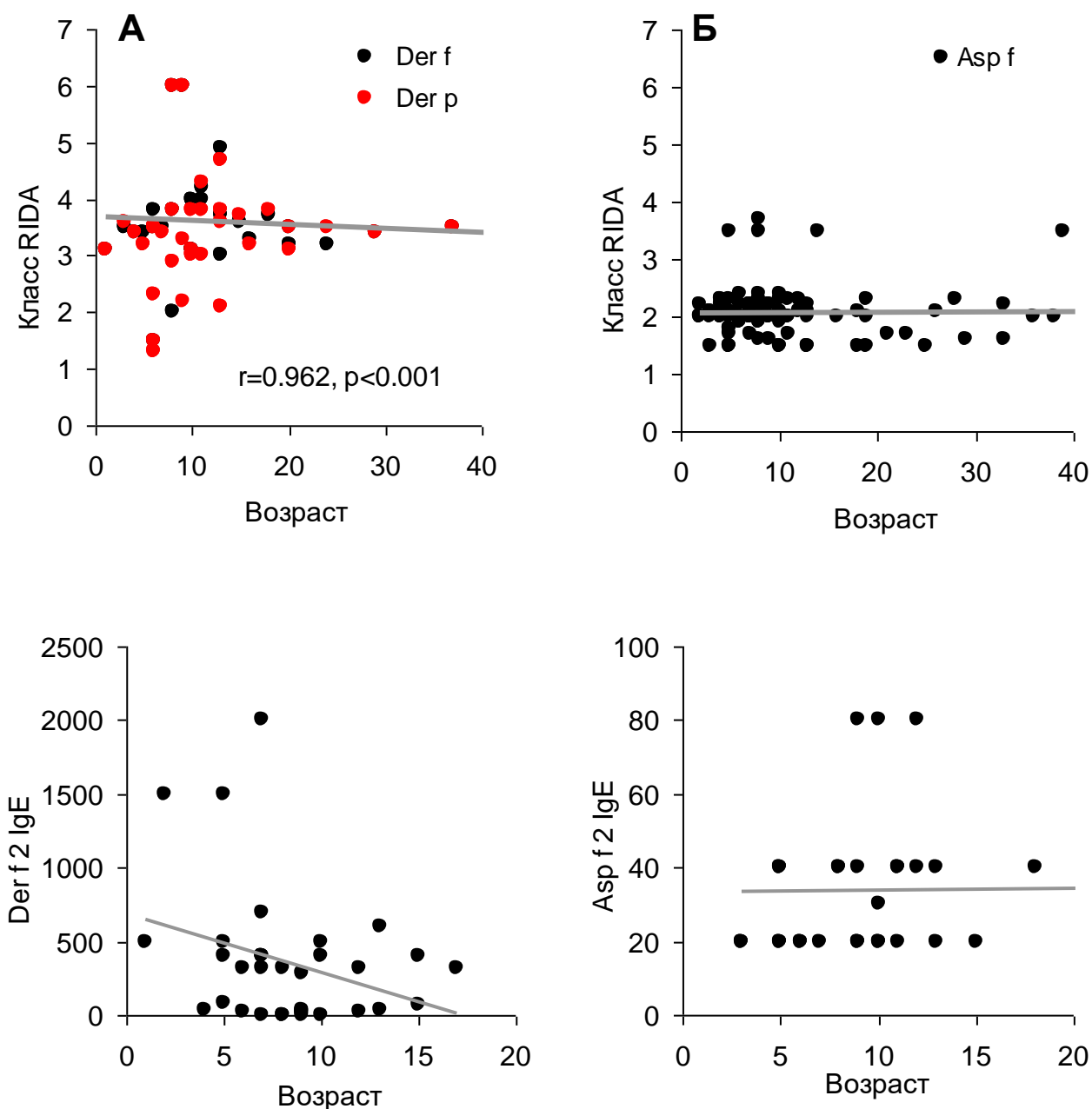


Рисунок 25. Распознавание аллергенов сыворотками больных. А-Б.

Распознавание экстрактов аллергенов КДП *D. farinae* (Derf), *D. pteronyssinus* (Derp) (А) и гриба *A. fumigatus* (Б) в тесте RIDA. Приведена корреляция распознавания КДП Der f и Der p (А). В-Г. Распознавание рекомбинантных аллергенов Der f 2 (В) и Asp f 2 (Г) в ИФА

Анализ распознавания рекомбинантных аллергенов проводили методом ИФА с покрытием планшетов белками Der f 2 или Asp f 2. Из 50 сывороток больных с аллергией на КДП Der f 2 распознавало около 80%, титры варьировали от 10 до 2000 (Рисунок 25, В). Из 50 сывороток больных с

аллергией на гриб Asp f 2 распознавало 40%, но титры были значительно ниже (от 10 до 80) (Рисунок 25, Г). Полученное различие подтвердило данные RIDA о большей иммуногенности аллергенов из КДП. Особенностью аллергического ответа на КДП было снижение титров IgE с возрастом более выраженное при распознавании отдельных аллергенов (Der f 2), но как тенденция наблюдавшееся и в тесте RIDA (Рисунок 25 А и В). В отличие от аллергии на КДП, ответ на грибы практически не менялся с возрастом ни на экстракт, ни на Asp f 2 (Рисунок 25, Б и Г).

Из имеющихся образцов отбирали сыворотки, распознающие рекомбинантные аллергены Der f 2 и Asp f 2 с высоким титром IgE антител. Для белка Asp f 2 максимальные титры были 50-80, для Der f 2 – 500-2000.

3.2.2 Разработка ИФА для анализа распознавания сывороточными IgE капсулированные антигены

Для анализа связывания IgE с капсулированными белками предварительно требуется убедиться, что капсулированные белки сорбируются на планшеты для ИФА и сохраняются в процессе отмывок. Для такой проверки были получены кроличьи высокотитровые сыворотки против белков Derf 1, Derf 2, Aspf 2 и Aspf 3. Данные сыворотки использовали для оценки иммобилизации белков и капсулированных белков на подложке. Поскольку аффинность IgG антител заведомо выше, чем IgE, то IgG антитела должны распознавать и связываться с белками, упакованными в рыхлый полимер. Ранее, мы выполняли работу с дрожжевыми вирусоподобными частицами с пептидами, экспрессированными на С и N концах белка P1, формирующего частицу. Частица собирается дрожжами в виде закрученного пучка белка P1, N-конец которого расположен внутри частицы. Было показано, что высокоаффинные антитела к пептиду распознают пептид на любом конце белка P1 [245].

Анализ связывания кроличьих антител с частицами показал, что при нанесении на планшет в равной концентрации по белку, антитела распознают

белок как в чистом виде, так и в составе капсулированных в ЛСХ и ЛСХ-альгинат белков (Рисунок 26).

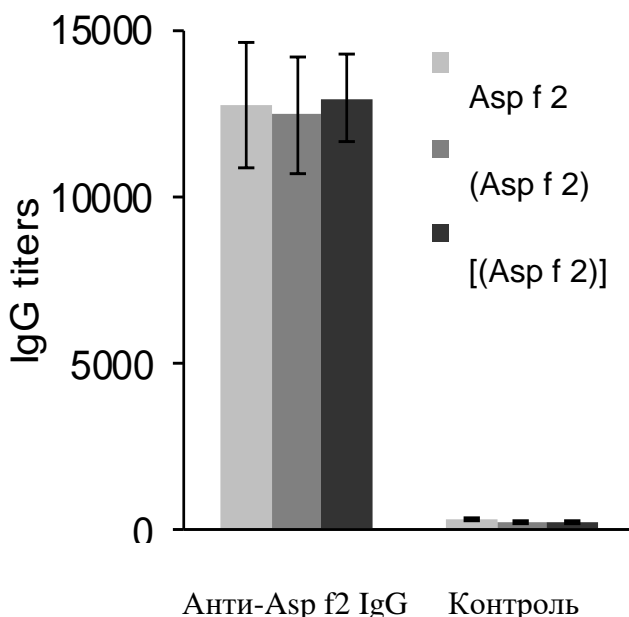


Рисунок 26. Оптимизация ИФА с помощью высокоаффинных кроличьих сывороток к Asp f 2

Рекомбинантный белок Asp f 2, капсулированный в ЛСХ (Asp f 2) или в ЛСХ-альгинат [(Asp f 2)], наносили на подложку в равной концентрации по белку, инкубировали ночь, отмывали стандартно. Анализировали с помощью кроличьих антител к Asp f 2 в разных разведениях. Данные показаны в титрах IgG, при которых распознаются белки.

Аналогично использовали капсулированный белок Dr f 2 с близкими результатами.

Полученные данные показали, что с помощью стандартного ИФА можно оценить эффективность связывания IgE из сывороток больных, поскольку белок в капсулированной форме присутствует на планшете для ИФА.

3.2.3 Анализ связывания капсулированных аллергенов с IgE

На рисунке 27 приведены репрезентативные данные анализа связывания IgE из сывороток больных с капсулированными и свободными белками.

Упаковка белков в ЛСХ снижала связывание на 50% для высокотитровых сывороток к Der f 2 (Рисунок 27, Б) и на 80% для низкотитровых к Asp f 2 (Рисунок 27, А).

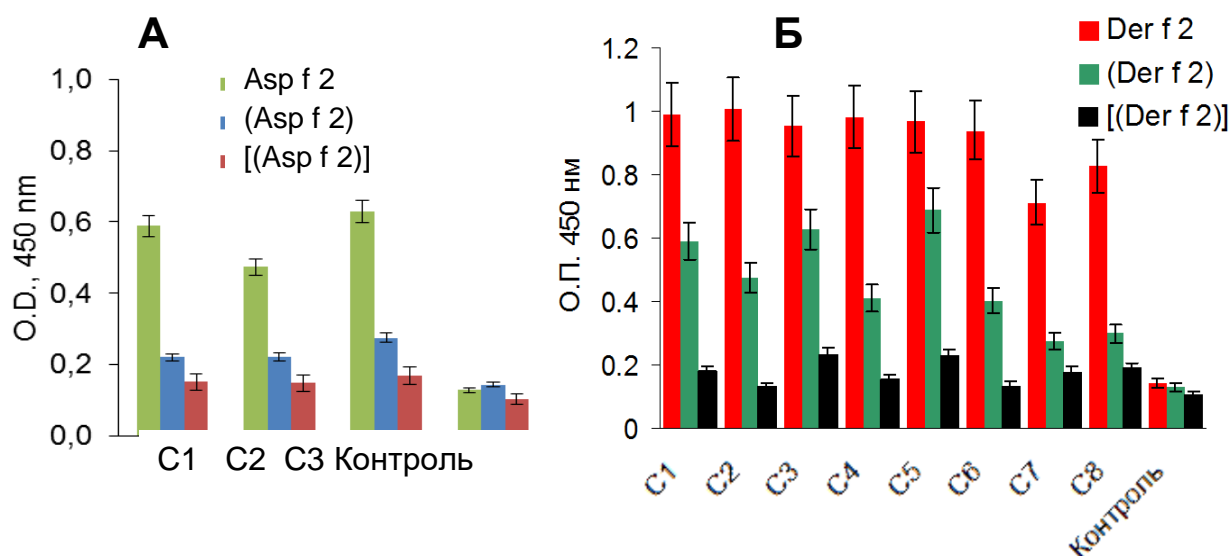


Рисунок 27. Связывание IgE с капсулированными аллергенами.

Связывание IgE из сывороток больных со специфическими аллергенами: рекомбинантными белками Asp f 2 (А) и Der f 2 (Б), с белками, упакованными в ЛСХ (в круглых скобках) и в ЛСХ-альгинат (в квадратных и круглых скобках). С – сыворотки отдельных больных. Контроль – сыворотка здорового донора.

Примеры титровочных кривых на Der f 2, экстракте КДП и капсулированных в ЛСХ 40 и 300 кДа аллергенах, приведены на рисунке 28. Отобранные сыворотки больных с аллергией на КДП распознавали как рекомбинантный Der f 2, так и экстракт КДП (Рисунок 28, А). Сыворотки здоровых доноров были отрицательными во всех тестах. Капсулирование в ЛСХ с разным ММ (40 и 300 кДа) в 2 раза снижало контакт IgE с белками, причем упаковка в ЛСХ 40 кДа лучше экранировала белок (Рисунок 28, Б). Двойная упаковка белка полностью предотвращала связывание, кривые совпадали с контрольными данными для сыворотки здоровых доноров (Рисунок 28, А и Б).

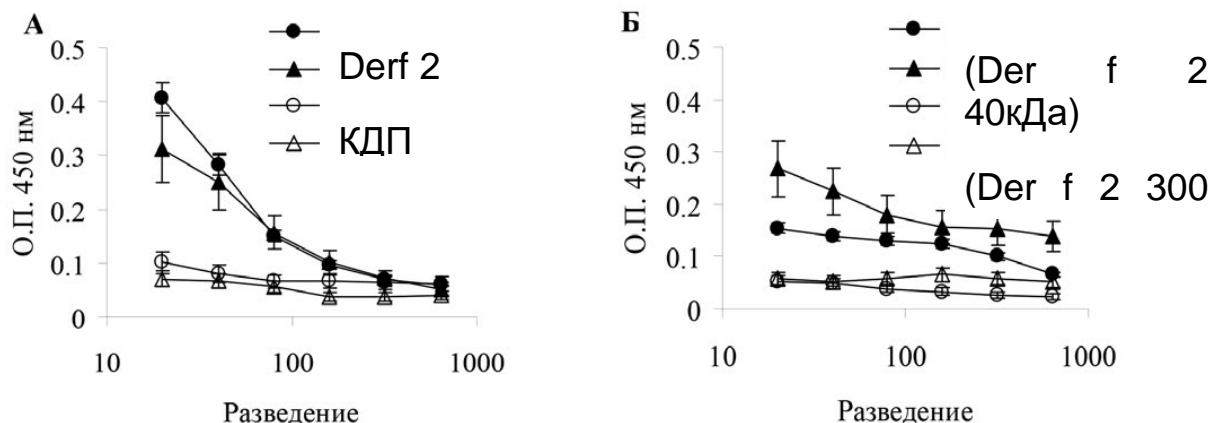


Рисунок 28. Связывание свободных и капсулированных аллергенов с IgE.

А. Титровочные кривые распознавания свободного Der f 2, экстракта КДП IgE из сывороток больных с аллергией (черные значки) и здоровых доноров (светлые значки). Б. Титровочные кривые распознавания IgE в сыворотках больных с аллергией Der f 2, капсулированного в ЛСХ с ММ 40 или 300 кДа (черные значки) или в ЛСХ40 кДа-альгинат или ЛСХ 300 кДа-альгинат (светлые значки).

Таким образом было показано, что двойная упаковка белков полностью блокирует связывание IgE с капсулированным белком, что и требовалось доказать. Однослойной упаковки только в хитозан как с ММ 40, так и 300 кДа было недостаточно для полного блокирования связывания IgE с белками. Таким образом, были получены конструкции капсулированных аллергенов, которые можно безопасно использовать для АСИТ в высоких концентрациях, поскольку аллергены защищены от контакта с IgE, экспонированного на тучных клетках.

3.2.4 Анализ иммунного ответа на капсулированные белки

Механизм действия АСИТ на настоящий момент остается дискуссионным. Поскольку иммунизация АСИТ вызывает формирование IgG4 антител, то можно предположить, что одним из механизмов является

продукция к аллергенам антител G класса, имеющих более высокую, чем IgE, аффинность, что постепенно должно вытеснить пул В-клеток, продуцирующих IgE антитела низкой аффинности. Еще одним возможным механизмом является продукция IgA антител, функционирующих на слизистых оболочках, что может являться способом перехвата аллергена при его попадании на слизистую. Соответственно, предлагаемые капсулированные аллергены должны вызывать формирование IgG и, возможно, IgA антител.

3.2.4.1 Анализ клеточного ответа на капсулированные белки

Продукция IgG антител формируется в лимфатических узлах, где антигены распознаются Т и В-клетками. Переключение В-клеток на синтез IgG ассоциирован с пролиферацией как В, так и Т-клеток. Для анализа иммунного ответа на капсулированные аллергены мышей иммунизировали в подушечку задней лапы смесью Der f 1 и Der f 2 в свободном виде или капсулированном в ЛСХ или ЛСХ-альгинат. Через неделю забирали подколенный лимфоузел, выделяли из него лимфоциты и стимулировали их *in vitro* смесью Der f 1 и Der f 2 в течение 5 дней. Для анализа пролиферации использовали витальный краситель CFSE, которым окрашивали лимфоциты до стимуляции. В результате пролиферации лимфоцитов краситель делится пополам при каждом делении. Анализ пролиферации осуществляли на проточном цитометре. Репрезентативные графики пролиферации приведены на рисунке 29, где пролиферирующие популяции отмечены прямоугольниками. Результаты доли пролиферирующих Т-клеток (%) приведены в таблице 8.

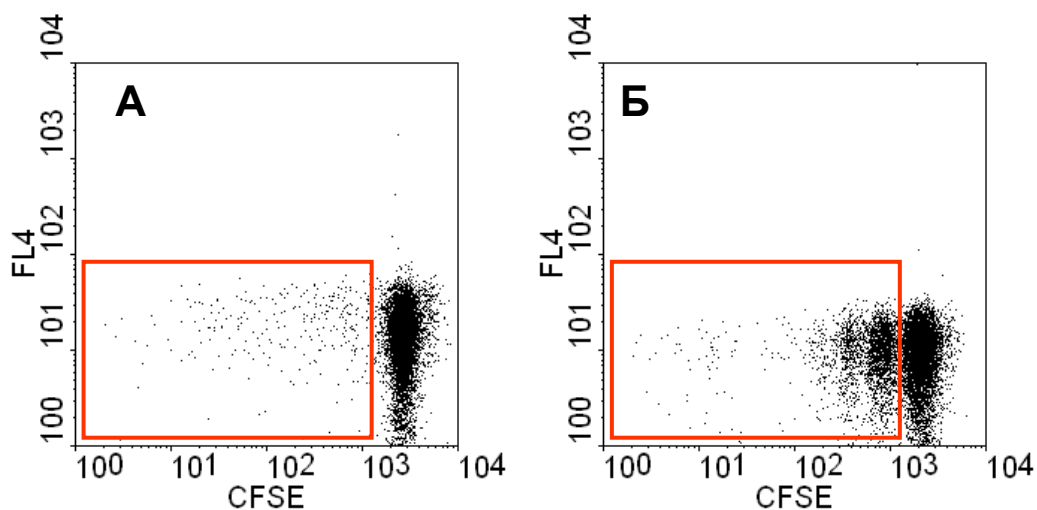


Рисунок 29. Репрезентативные графики пролиферации *invitro* CFSE+ Т-лимфоцитов интактной (А) и иммунной мыши в ответ на смесь (1:1) белков Derf 1 и Derf 2

Таблица 7 - Пролиферация (%) лимфоцитов дренирующего место инъекции подколенного узла мышей, иммунизированных капсулированными белками в подушечку лапки

Концентрация	Антигены/(ЛСХ-антигены)/[(ЛСХ-альгинат-антигены)]		
	Der f 1/Der f 2	(Der f 1/Derf 2)	[(Der f 1 /Der f 2)]
мкг/мл	свободные	ЛСХ	ЛСХ-альгинат
0	2±1	2.3±1	2.5±1.5
10	8.4±4.2	6.2±2.8	17±6
20	18±3	21±4	33±5
40	28±5	26±6	50±7

Показали, что как при иммунизации мышей свободными, так и капсулированными белками формируется пул активированных Т-клеток, отвечающих пролиферацией на специфичный антиген.

3.2.4.2 Анализ фагоцитоза капсулированных белков макрофагами

Иммунный ответ начинается с захвата антигена тканевыми макрофагами. Предположительно, капсулированные белки будут лучше захватываться макрофагами, чем свободные, поскольку фагоцитоз капсулированного материала идет эффективнее, чем раствора. Для анализа фагоцитоза капсулированных антигенов использовали линию макрофагов мыши J774. Для визуализации частиц белки конъюгировали с родамином В, получали капсулированную форму и инкубировали частицы с макрофагами 3 и 12 часов. Фагоцитоз оценивали на 3 ч. Мембраны клеток окрашивали липидом, меченным BодуРy. Показали, что короткая инкубация 3 ч приводит к эффективному захвату частиц (Рисунок 30).

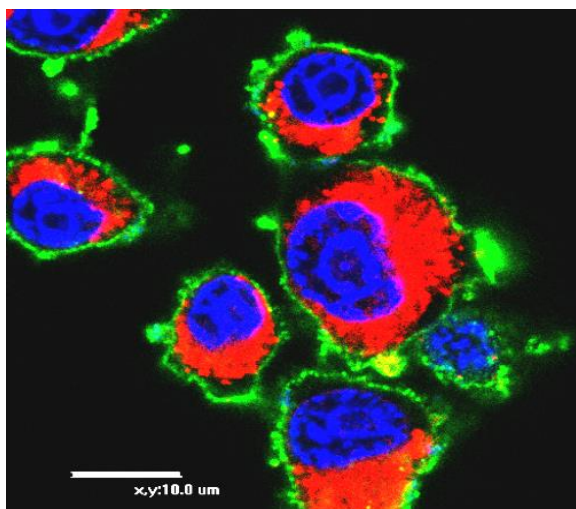


Рисунок 30. Фагоцитоз наночастиц макрофагами. Клетки линии J774 инкубировали с наночастицами, включающими белки Der f 1 и Der f 2, меченные родамином В (красный), в течение 3 ч, фиксировали и анализировали методом конфокальной микроскопии. Мембраны клеток окрашены фосфатидилхолином, меченным BодуРy (зеленый). Ядра клеток окрашены красителем Hoechst (синий). Шкала 10 мкм.

Внутриклеточный транспорт захваченных частиц оценивали через 12 ч с помощью трекеров органелл. Колокализация наблюдалась с лизосомами (Рисунок 31), что соответствует процессингу антигенов, аналогичному процессингу любых карпускулированных объектов (частицы туши, микроорганизмы, споры грибов и др.).

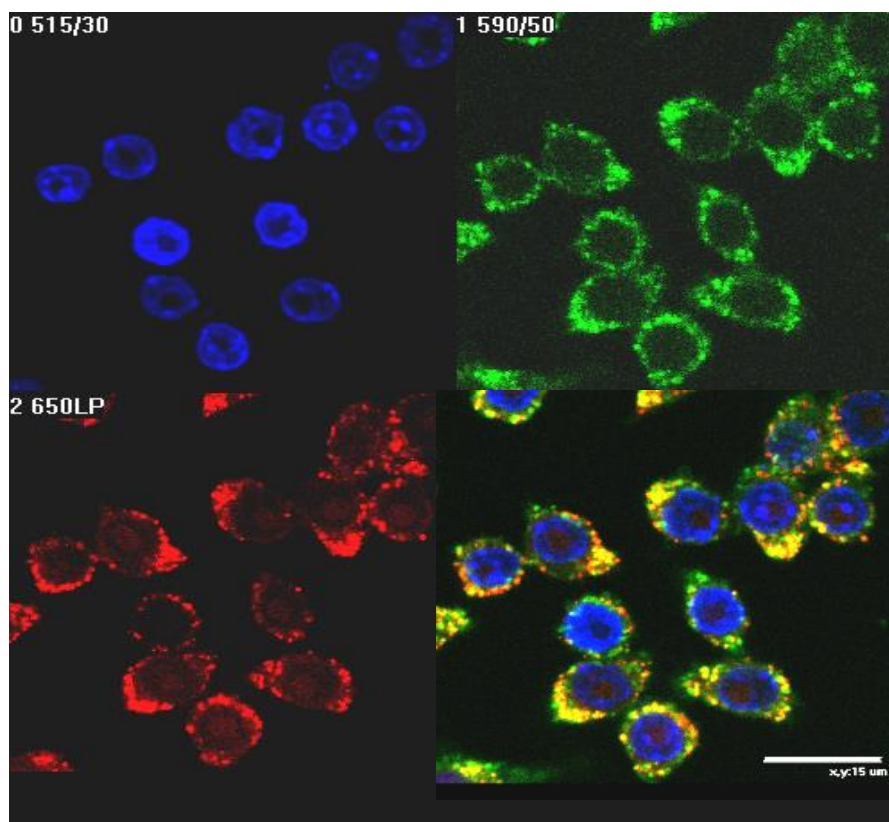


Рисунок 31. Транспорт частиц в лизосомы. Клетки J774 инкубировали с капсулированными белками Der f 1/Der f 2, меченные родамином (красный), лизосомы метили трекером LyzoTrackGreen (зеленый). Приведено изображение в каждом канале и наложение всех каналов. Масштабная линейка 15 мкм.

Ранее нами были получены частицы методом самосборки и электроспрея. Для анализа фагоцитоза частиц, полученных методом электроспрея, получали производные белков, меченные ФИТЦ. Примеры внутриклеточной локализации частиц в макрофагах и фибробластах приведены на рисунке 32, где цитоплазму окрашивали йодистым пропидием (красный). Локализация частиц имеет

характерный рисунок в виде крупных образований неправильной формы, что соответствует лизосомам и фаголизосомам в макрофагах (Рисунок 32, А) и лизосомам в фибробластах (Рисунок 32, Б).

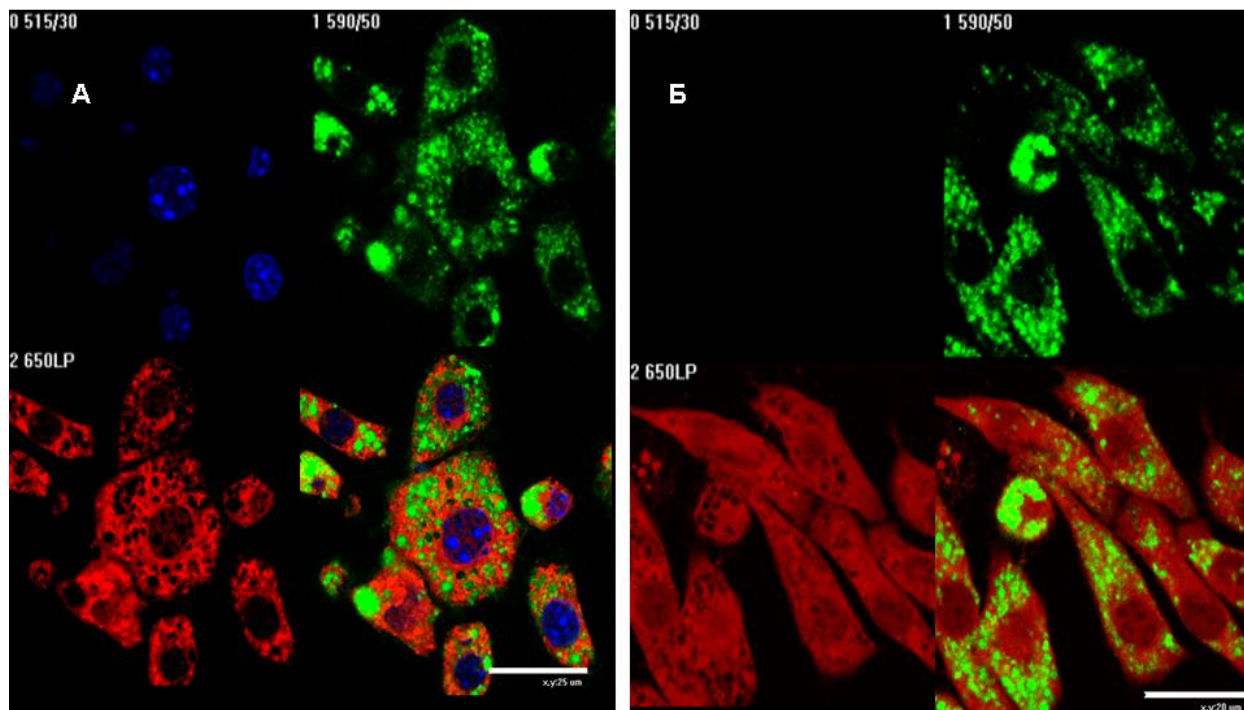


Рисунок 32. Внутриклеточная локализация капсулированных белков в макрофагах RAW.267 (А) и фибробластах L929 (Б). Белки, конъюгированные с ФИТЦ (зеленый) и капсулированные в хитозан методом электроспрея, инкубировали с клетками 6 ч, клетки окрашивали йодистым пропидием (красный) и фиксировали. Синим окрашены ядра. Шкала 15-20 мкм.

3.2.4.3 Индукция гуморального IgG ответа *in vivo*

Анализ индукции гуморального иммунного ответа проводили *in vivo*, для чего мышей иммунизировали свободными или капсулированными антигенами. Свободные белки вводили в смеси с адъювантом гидроокисью алюминия (Alum). Иммунизацию повторяли 2 раза с недельным интервалом, после чего забирали сыворотки и анализировали продукцию IgG, IgA и IgE методом ИФА, используя на подложке рекомбинантные белки. Показали, что иммунизация капсулированными белками вызывает формирование IgG антител (Рисунок 33). Иммунизация свободными белками в адъюванте вызывала формирование

несколько более высоких титров и аффинности IgG антител к Asp f 3, чем при иммунизации капсулированным белком (Рисунок 33, А). При иммунизации капсулированным Der f 2 характер гуморального ответа (титры, аффинность IgG антител) был сравнимым (Рисунок 33, Б).

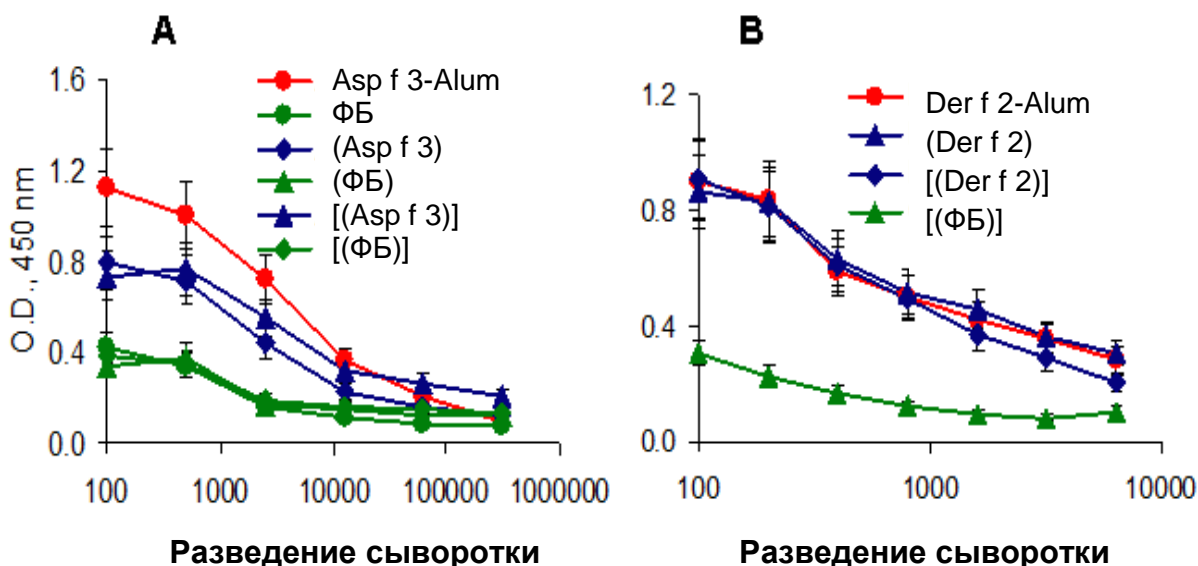


Рисунок 33. Индукция IgG антител в мышах линии BALB/c, иммунизированных свободными или капсулированными белками. Капсуляция в ЛСХ показана круглыми скобками, в ЛСХ-альгинат – квадратными и круглыми. ФБ – фосфатный буфер. Alum – гидроокись алюминия смешивали со свободными белками.

Анализ IgE и IgA показал отсутствие антител этих классов к Asp f 3 и Der f 2 (данные не приводятся). Анализ продукции основных субклассов IgG – IgG1 и IgG2a, показал, что основным субклассом является IgG1 (титр 50000 во всех группах), титры IgG2a были примерно в 5 раз ниже (Рисунок 34).

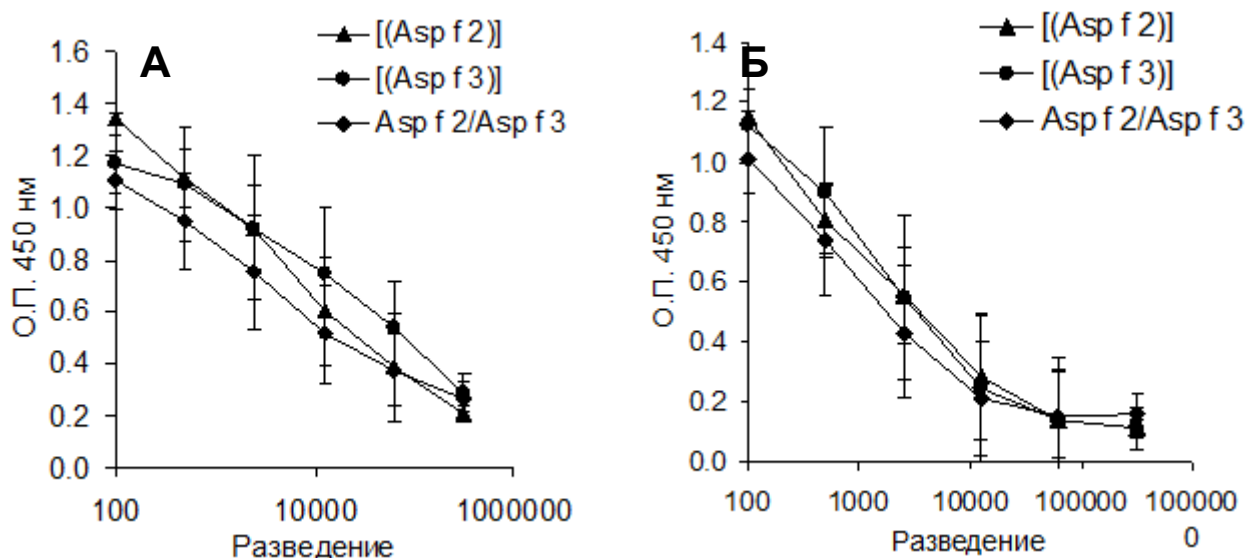


Рисунок 34. Продукция IgG1 (А) и IgG2а (Б) субклассов антител в мышах, иммунизированных капсулированными аллергенами Asp f 2 и Asp f 3

Таким образом, основным эффектом иммунизации является индукция синтеза IgG1 антител к аллергенам, которая не зависит от того, является ли аллерген капсулированным или используется в составе адъювантного протокола.

Полученные данные показывают, что углеводная капсула является сама по себе адъювантом, сравнимым по эффективности с гидроокисью алюминия. С учетом биодергадируемости хитозан-альгинатной конструкции капсуляция может использоваться для разработки вакцин, не содержащих гидроокиси алюминия, не являющейся биодергадируемой.

3.2.4.4 Транспорт капсулированных аллергенов *in vivo*

Для анализа транспорта капсулированных аллергенов *in vivo* использовали белки Derf 2 и Asp f 3, меченые родамином В и капсулированные в ЛСХ-альгинат методом самосборки. Частицы вводили в подушечку задней лапы мыши, через неделю забирали ближайший к месту инъекции подколенный лимфоузел, готовили криосрезы лимфоузла, которые анализировали методом конфокальной микроскопии. Наличие родамина в лимфоузле означает доставку частиц из подушечки лапы в ближайший лимфоузел. На рисунке 35 приведены

изображения криосрезов лимфоузлов, показывающие наличие антигена в лимфоузле и колокализацию частиц с макрофагами.

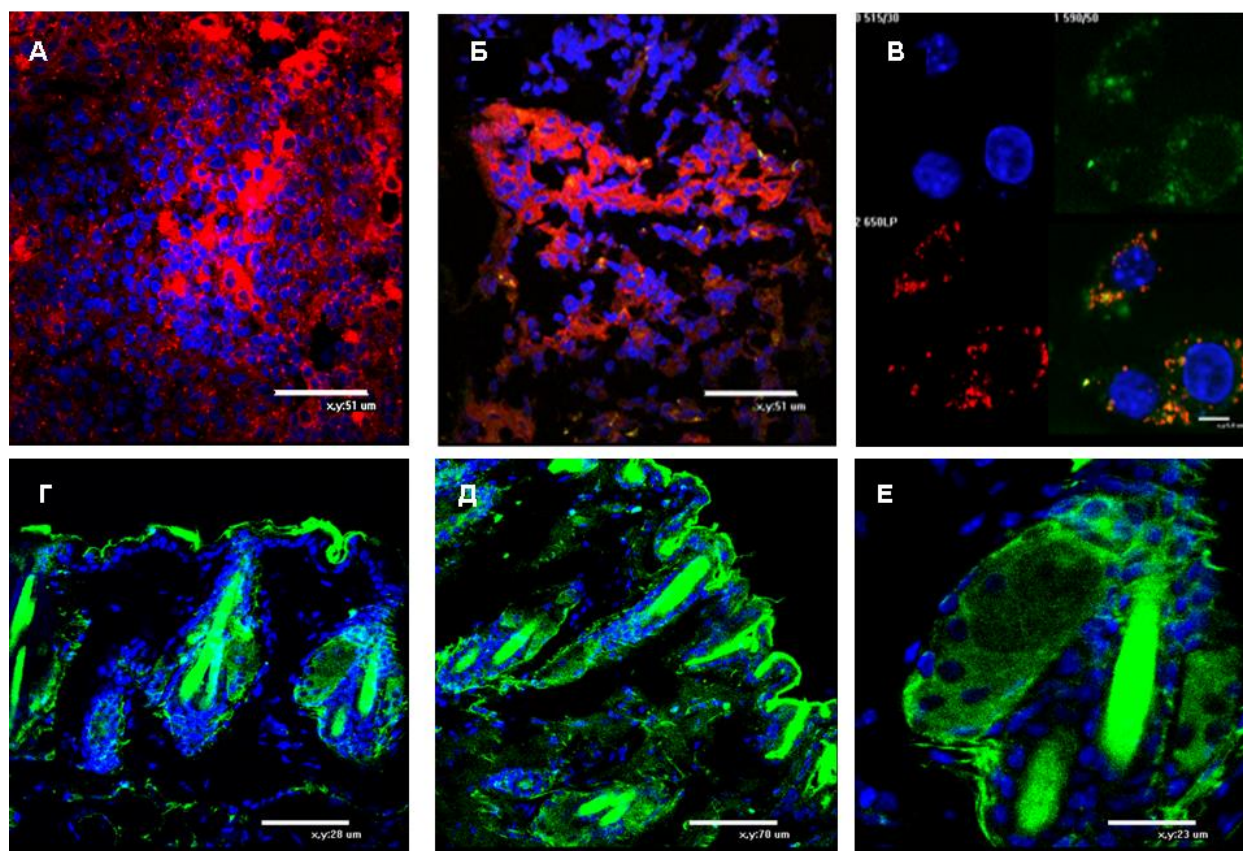


Рисунок 35. Транспорт капсулированных аллергенов *in vivo*. А-В.

Криосрезы подколенных лимфатических узлов мышей, иммунизированных частицами, несущими белки Derf 2 (А) или Aspf 3 (Б), меченные родамином В (красный). В. Макрофаги окрашивали анти-CD11b-FITC-антителами (Б, В, зеленый), ядра - Hoechst (синий). Шкала соответствует 50 мкм. Г-Е. Эффект переноса меченых белков Der f 1 (Г) и Der f 2 (Д-Е) (зеленый) в составе полимерных частиц ЛСХ-альгинат через волосяные фолликулы при трансэпидермальной доставке. Синим окрашены ядра. Шкала 20 мкм.

Доставка аллергенов для АСИТ возможна различными путями, например сублингвально или трансэпидермально. Сублингвальную доставку невозможно осуществить в мышинной модели, поэтому проводили трансэпидермальную иммунизацию. Для этого с живота мыши удалялась шерсть и накладывался пластырь, на марлевую подушку которого наносили частицы, содержащие

белки, меченные ФИТЦ. Пластырь фиксировали повязкой. Через неделю пластырь удаляли, мышь забивали, забирали кожу в месте нанесения частиц, готовили криосрезы и анализировали их методом конфокальной микроскопии. Наличие ФИТЦ в тканях означает доставку частиц через эпидермальный барьер. Метку обнаружили в волосяных фолликулах, кератине волос, дерме, значительное количество оставалось на поверхности кожи (Рисунок 35, Г-Е).

3.3 АСИТ капсулированными аллергенами

Разработанные капсулированные аллергены предполагается использовать для терапии аллергии в дозах, на 1-2 порядка превышающих стандартные дозы АСИТ. Поскольку механизмы АСИТ до настоящего времени не определены, то единственным методом доклинической проверки эффективности терапии с помощью капсулированных аллергенов являются модельные эксперименты на мышах. В данном разделе проведены эксперименты на мышах с индуцированной аллергией на рекомбинантные белки.

3.3.1 Индукция аллергии на белки Asp f 2 и Asp f 3 у мышей

Для оценки эффективности АСИТ с помощью капсулированных аллергенов требовалась разработка модели аллергии на используемые нами белки. Такая модель ранее была разработана в нашей лаборатории. Для индукции аллергии мышам многократно (20-30 раз) в район холки подкожно вводили аллергены в ФБ в дозе 100 нг/мышь/инъекцию до появления IgE антител. Формирование IgE антител определяли ИФА, в котором в качестве подложки использовали свободные белки. После формирования IgE ответа мышей 3 раза иммунизировали капсулированными аллергенами и через месяц после иммунизации проводили дополнительную сенсibilизацию (Рисунок 36). По окончании сенсibilизации забирали сыворотку крови и определяли титры IgG и IgE антител, специфичных к белкам Asp f 2 и Asp f 3.

После 16 подкожных инъекций смеси белков (1:1) Asp f 2 и Asp f 3 возникала сенсibilизация к аллергенам и сформировался IgE ответ как на Asp f 2, так и на Asp f 3 (Рисунок 37). IgG продукция в группе с индуцированной

аллергией была несколько выше, чем в контрольной интактной группе, но достоверного отличия не было ($p=0.109$) (Рисунок 37).

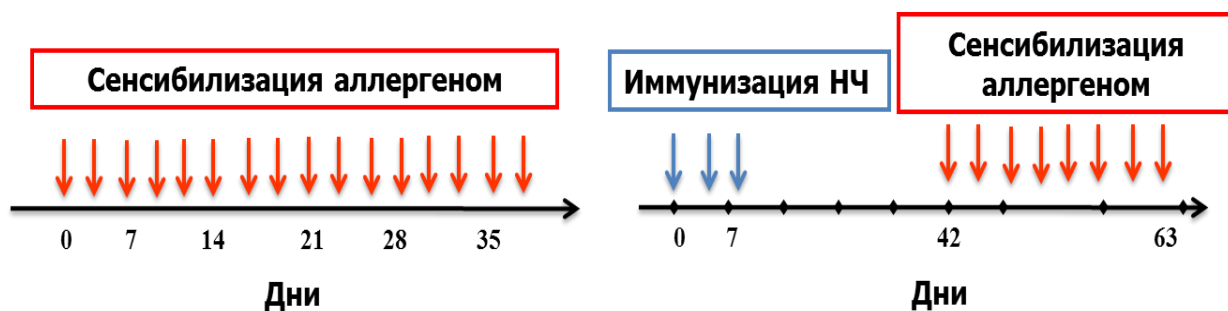


Рисунок 36. Схема индукции IgE к рекомбинантным аллергенам у мышей. Для индукции IgE используется подкожная иммунизация (сенсибилизация) белками в дозе 100 нг/мышь/инъекцию.

После формирования IgE мышей иммунизировали капсулированными аллергенами. Через месяц сенсибилизацию повторяли.

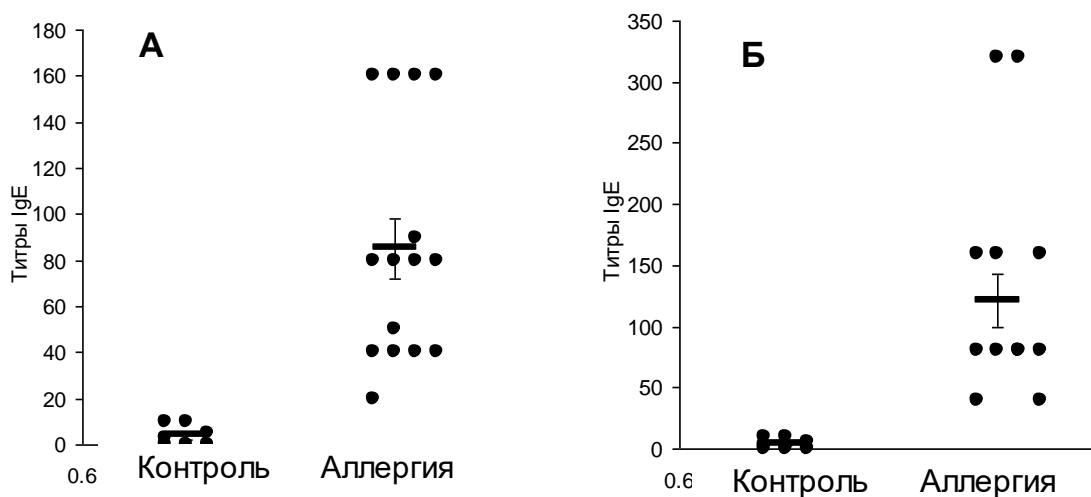


Рисунок 37. Продукция IgE мышами в модели низкодозовой аллергии на Asp f 2 (А) и Asp f 3 (Б). Контроль – интактные мыши. Планками приведены средние значения и стандартная ошибка

Для АСИТ использовали смесь белков Asp f 2 и Asp f 3 и капсулированные в ЛСХ-альгинат отдельно Asp f 2 и Asp f 3. Сыворотки

забирали через 2 недели после иммунизации и через 2 недели после повторной сенсibilизации.

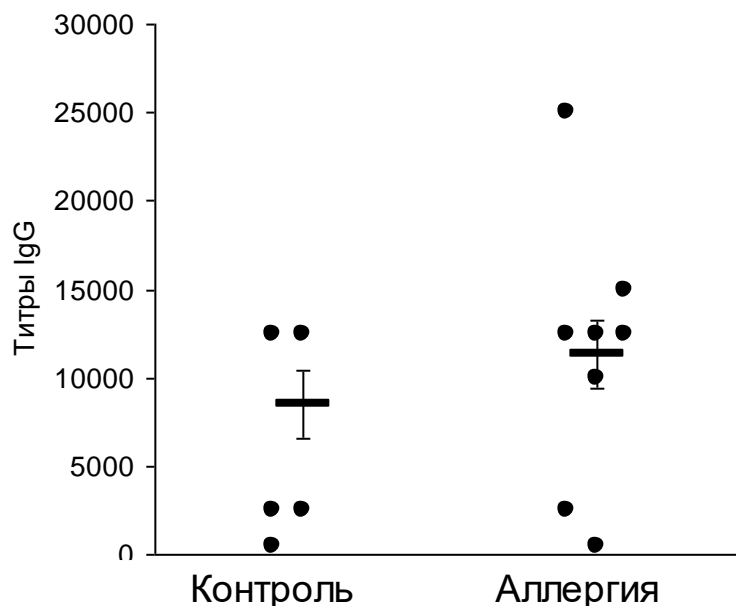


Рисунок 38. Продукция мышами IgG к смеси белков Asp f 2/Asp f 3 в модели низкодозовой аллергии после сенсibilизации. Контроль – интактные мыши.

Планками приведены средние значения и стандартная ошибка.

3.3.2 Эффект иммунизации капсулированными аллергенами на продукцию IgG и IgE антител

Продукцию IgG антител оценивали через 2 недели после иммунизации капсулированными аллергенами. Показали, что капсулированные Asp f 2, Asp f 3 и смесь белков с адьювантом вызывали сравнимое формирование IgG с титрами 280000, 410000 и 230000 соответственно (Рисунок 39). Достоверных различий между иммунизированными группами не было. Все иммунизированные группы достоверно отличались от группы контроля, в которой мышам с индуцированной аллергией вводили ФБ. В группе, иммунизированной белками 20% мышей погибло от анафилактического шока сразу после первой иммунизации. В группах, иммунизированных капсулированными белками, все мыши перенесли иммунизацию без признаков аллергической реакции на белки.

После иммунизации капсулированными аллергенами мышей с индуцированной аллергией на смесь Asp f 2 и Asp f 3 проводили дополнительный цикл сенсibilизации как модель сезонной активации аллергии, наблюдаемой, например, в период цветения растений.

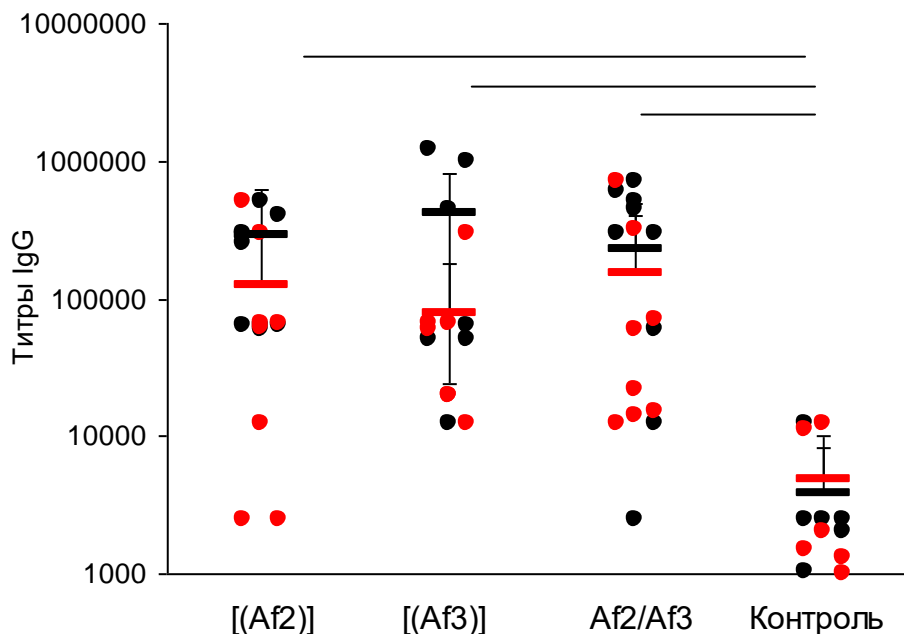


Рисунок 39. Продукция IgG у мышей, иммунизированных капсулированными в ЛСХ-альгинат Asp f 2 [(Af2)], Asp f 3 [(Af3)] или смесью белков (Af2/Af3) в гидроокиси алюминия через 2 недели после иммунизации (черные кружки) и через 2 недели после сенсibilизации (красные кружки). Планками отмечена достоверная разница ($p < 0.05$)

Для анализа продукции IgG и IgE антител у мышей забирали сыворотку крови еще через 2 недели после сенсibilизации. За это время титр IgG антител снизился во всех иммунизированных группах из-за элиминации части продуцирующих В-клеток (Рисунок 39), при этом по-прежнему достоверно был выше, чем в группе без иммунизации.

Анализ продукции IgE показал, что после АСИТ титры IgE достоверно ($p < 0.05$) снижались во всех иммунизированных по сравнению с группой контроля с индуцированной аллергией и без АСИТ (Рисунок 40, черные кружки). Однако после сенсibilизации титры IgE повышались во всех группах, и достоверная разница отсутствовала (Рисунок 40, красные кружки).

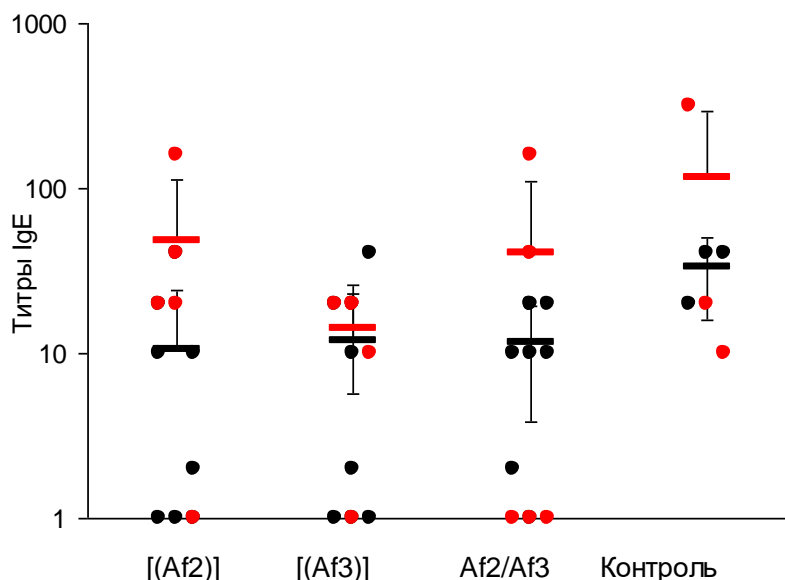


Рисунок 40. Продукция аллерген-специфического IgE у мышей, иммунизированных капсулированными в ЛСХ-альгинат Asp f 2 ([Af2]), Asp f 3 ([Af3]) или смесью белков (Af2/Af3) в гидроокиси алюминия через 2 недели после иммунизации (черные кружки) и через 2 недели после сенсибилизации (красные кружки)

Соответственно, АСИТ как свободными, так и капсулированными белками не вызывает снижения аллерген-специфического IgE. Аналогичные данные получают в клинических исследованиях, показывающих, что продукция IgE может долгое время сохраняться на прежнем уровне, хотя аллергическая симптоматика снижается.

3.3.3 Эффект иммунизации капсулированными аллергенами на системную реакцию

Известно, что АСИТ ассоциирована с уменьшением клинической симптоматики на системном уровне при сохранении высоких титров IgE в крови. Для анализа системного эффекта проведения АСИТ с помощью полученных частиц использовали модель интраназальной сенсибилизации мышей, у которых формировался иммунный ответ в результате вакцинации капсулированными аллергенами, а также у контрольных мышей. Для этого мышам с индуцированной аллергией, получивших АСИТ и дополнительную подкожную сенсибилизацию, в течение недели ежедневно вводили

интраназально свободные аллергены для индукции легочной реакции. Через сутки после последней инъекции мышей забивали, забирали легкие и делали гистологические срезы для анализа воспалительного процесса в легких. Показали, что в контрольной аллергической группе наблюдается воспалительная реакция (Рисунок 41, Б), выраженная в повышенной инфильтрации легких лимфоцитами и нейтрофилами, увеличении объема бокаловидных клеток, производящих слизь (показано стрелками).

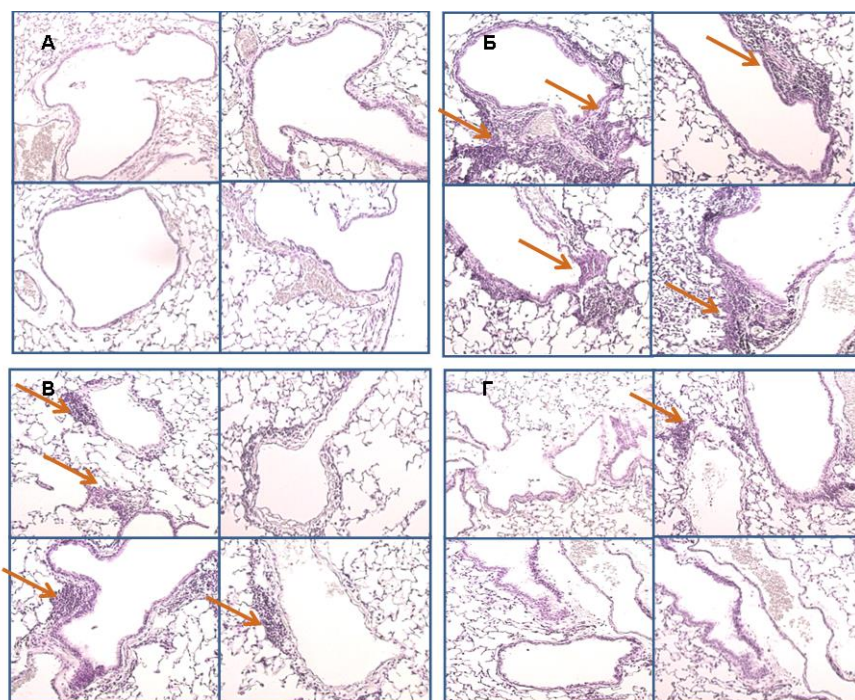


Рисунок 41. Гистология легких мышей, дополнительно сенсibilизированных интраназально (7 раз) белком AspF 2. А - легкие intactных мышей; Б – легкие мышей аллергической группы, не получивших АСИТ; В – легкие мышей, иммунизированных белками в гидроокиси алюминия; Г – легкие мышей, иммунизированных капсулированным белком AspF 2. Стрелками указаны зоны фиброза и бокаловидных клеток. Окраска гематоксилин-эозин.

В результате проведения АСИТ как свободными аллергенами, так и капсулированными белками наблюдали снижение системной легочной реакции (Рисунок 41, В и Г), что соответствует снижению клинической симптоматики. Таким образом, отсутствие эффекта снижения титров IgE сопровождается клиническим улучшением, что связано с механизмами, не зависящими от IgE опосредованных реакций.

4 Заключение

Аллергия является социально значимым заболеванием, ухудшающим качество жизни больного и его семьи, снижающим способность к работе и учебе, увеличивающее нагрузку на здравоохранение и требующее значительных расходов на симптоматическую терапию. Аллергией разной тяжести страдает 25-30% населения развитых стран. Первые признаки аллергических реакций наблюдаются в раннем детстве в виде экземы, плохо поддающейся терапии, ограничивающей полноценное питание детей, приводящей к отводу от прививок, что снижает защищенность от инфекционных заболеваний детскую популяцию. Аллергия имеет генетическую предрасположенность и достоверно чаще встречается у детей, имеющих родителей с аллергией. Основной формой аллергии является реакция I типа, опосредованная образованием IgE антител к безвредным микрообъектам: пыльце растений, спорам грибов, фрагментам тканей бытовых насекомых и домашних животных, пищевым белкам. Чаще всего детская экзема, вызванная пищевыми продуктами, прогрессирует в респираторные формы: синуситы, конъюнктивиты, астму. Механизмы формирования IgE остаются плохо понятными. В связи с этим нет эффективной патогенетической терапии аллергии. Единственным методом предупреждения прогрессирования аллергии, называемого атопическим маршем, на настоящий момент является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), предложенная более 100 лет назад. Эффективность АСИТ остается низкой, что может быть связано с необходимостью использования экстрактов для АСИТ в низких дозах. Из-за риска обострения аллергических реакций и индукции опасного для жизни анафилактического шока АСИТ проводится низкими дозами длительно и может достигать 3-5 лет. Длительность терапии, риск осложнений, использование нестандартизованных экстрактов аллергенов, высокая кросс-реактивность, недостаточная эффективность АСИТ приводят к низкому интересу больных к АСИТ. Поиск методов, позволяющих повысить

эффективность и безопасность терапии, а также снизить ее длительность, является актуальной биомедицинской задачей.

В данной работе была поставлена задача разработки безопасной формы аллергенов для проведения АСИТ с целью повышения терапевтической дозы. Поскольку основным эффекторным звеном аллергической реакции является связывание IgE антител на тучных клетках с аллергеном, что приводит к дегрануляции тучных клеток и высвобождению вазоактивных факторов (гистамин, лейкотриены, простагландин, цитокины и др), то одним из вариантов препаратов для АСИТ является капсулированная форма. Аллергены (рекомбинантные или экстракты), капсулированные в полимерный матрикс, закрыты от контакта с IgE, что предохраняет тучные клетки от дегрануляции при проведении АСИТ. Необходимым условием капсуляции аллергенов является блокирование связывания упакованных аллергенов с IgE антителами. Достаточным условием является необходимость сохранения иммуногенности упакованных в полимерный матрикс антигенов. Поскольку на настоящий момент нет полного понимания механизмов формирования аллергического ответа, то дальнейшую оптимизацию препаратов для АСИТ трудно осуществить. В данной работе мы ограничились выполнением двух требований: капсулированные аллергены не должны распознаваться IgE антителами, но должны сохранять иммуногенность и, как минимум, вызывать формирование IgG антител на упакованный аллерген. Для упаковки были выбраны биodeградируемые углеводные полимеры хитозан и альгинат. Поскольку на настоящий момент считается, что IgE ответ формируется за счет активации белком, то использование углеводного носителя не должно приводить к сенсibilизации на полимер.

Проведенные исследования показали, что однослойной упаковки в частицы хитозана недостаточно для полного экранирования эпитопов белка от контактов с IgE. Покрытие частиц дополнительной оболочкой альгината практически полностью блокировало связывание IgE с аллергенами. Механизм блокирования связывания IgE остается гипотетическим. Можно предположить, что альгинат создает дополнительные стерические затруднения, увеличивая

расстояние между белками и IgE. При проведении ИФА снижение связывания зависело от титров и аффинности антител. Так, для блокирования связывания высокотитровых сывороток требуется двухслойная упаковка аллергенов.

Капсулирование аллергенов не снижает иммуногенности белков, что нами было показано по продукции IgG антител при иммунизации мышей капсулированными и свободными белками. Соответственно, в работе были выполнены как необходимые, так и достаточные условия на капсулирование аллергенов.

Проверка эффективности АСИТ капсулированными аллергенами показала, что формирование IgE не оказывает значительного влияния на уровень IgE. В клинике при проведении АСИТ также не удастся снизить IgE, что, по-видимому, связано с независимыми механизмами формирования IgE и IgG антител. Тем не менее после АСИТ наблюдается клиническое улучшение, механизмы которого изучаются, но до сих пор нет понимания. В данной работе мы также наблюдали меньшую реакцию на интраназальную сенсibilизацию у мышей, иммунизированных аллергенами. Эффект наблюдался у мышей, иммунизированных как свободными, так и капсулированными белками. Различием была анафилактическая реакция и гибель 20% мышей, получивших АСИТ свободными белками. В группе мышей, иммунизированных капсулированными аллергенами, побочных анафилактических реакций не наблюдали, что показывает безопасность такой терапии.

Несмотря на полученные результаты, требуется изучение механизма формирования IgE продуцирующих клеток и поиск более эффективных методов терапии, приводящих к снижению уровня аллерген-специфического IgE.

5 Выводы

В результате проведенных исследований:

1. Разработан метод получения наночастиц на основе производных хитозана методами самосборки и электроспрея.
2. Методом самосборки в наночастицы лаурисулцинилхитозана-альгината включены белки из аллергенов КДП *D. farinae* и гриба *A. fumigatus*. Показано, что капсулированные аллергены не связывают IgE из сывороток больных.
3. Капсулирование аллергена усиливает фагоцитоз макрофагами и доставку антигена в лимфоузлы.
4. Иммунизация мышей капсулированными аллергенами эффективно индуцирует IgG1 и IgG2a ответ.
5. Формирование высоких титров IgG1 и IgG2a не влияет на продукцию IgE, но снижает клинические проявления аллергии, что согласуется с клиническими данными.

6 Список сокращений

IgA – иммуноглобулин А

IgG – иммуноглобулин G

TLR – Toll-подобный рецептор

NOS - N-оксисукцинимидный эфир

АБЛА – аллергический бронхолегочный аспергиллез

АПК – антиген-представляющая клетка

АСИТ – аллергенспецифическая иммунотерапия

АХЧ - альгинат -хитозановые частицы

БАВ – биологически активное вещество

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЖК – высшие жирные кислоты

ГК – гиалуроновая кислота

ГКГС – главный комплекс гистосовместимости

ГХ – гексаноил-хитозан

ДМСО - диметилсульфоксид

ДСР – динамическое светорассеяние

ДП – дзета потенциал

ДЦГК - дициклогексилкарбодиимид

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КДП – клещи домашней пыли

КДИ – карбодиимид

ИЛ – интерлейкин

ИС – иммунная система

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛК – лауриновая кислота

ЛСХ – лаурилсукциноилхитозан

ЛУ – лимфатические узлы,

ММ – молекулярная масса

НЧ – наночастица

ПМ - полимерные мицеллы

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭК – полиэлектролитные комплексы

РЭС - ретикуло-эндотелиальная система,

СА – степень ацилирования

СД – степень дезацетилирования

СЗ – степень замещения

СИТ – специфическая иммунотерапия

СХ – сукциноил-хитозан

Тх – Т-хелперы

Тх2 – Т-хелперы 2-го типа

ФБ – фосфатный буфер

ФИТЦ (FITC) – флуоресцеин изотиоцианат

ХЧ – хитозановые частицы

ЯА – янтарный ангидрид

7 Список литературы

1. Rajan T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation // *Trends in Immunology*. – 2003. – Т. 24, № 7. – С. 376-379.
2. Floistrup H., Swartz J., Bergstrom A., Alm J. S., Scheynius A., van Hage M., Waser M., Braun-Fahrlander C., Schram-Bijkerk D., Huber M., Zutavern A., von Mutius E., Ublagger E., Riedler J., Michaels K. B., Pershagen G., Grp P. S. Allergic disease and sensitization in Steiner school children // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2006. – Т. 117, № 1. – С. 59-66.
3. Pajno G. B., Barberio G., De Luca F., Morabito L., Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study // *Clin Exp Allergy*. – 2001. – Т. 31, № 9. – С. 1392-7.
4. Ferreira F., Briza P., Infuhr D., Schmidt G., Wallner M., Wopfner N., Thalhamer J., Achatz G. Modified recombinant allergens for safer immunotherapy // *Inflamm Allergy Drug Targets*. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 5-14.
5. Valenta R., Vrtala S., Focke-Tejkl M., Bugajska S., Ball T., Twardosz A., Spitzauer S., Gronlund H., Kraft D. Genetically engineered and synthetic allergen derivatives: candidates for vaccination against type I allergy // *Biol Chem*. – 1999. – Т. 380, № 7-8. – С. 815-24.
6. Cromwell O., Hafner D., Nandy A. Recombinant allergens for specific immunotherapy // *J Allergy Clin Immunol*. – 2011. – Т. 127, № 4. – С. 865-72.
7. Mutschlechner S., Deifl S., Bohle B. Genetic allergen modification in the development of novel approaches to specific immunotherapy // *Clin Exp Allergy*. – 2009. – Т. 39, № 11. – С. 1635-42.
8. Wambre E., James E. A., Kwok W. W. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy // *Curr Opin Immunol*. – 2012. – Т. 24, № 6. – С. 700-6.
9. Hellman L. Regulation of IgE homeostasis, and the identification of potential targets for therapeutic intervention // *Biomed Pharmacother*. – 2007. – Т. 61, № 1. – С. 34-49.
10. Poulsen L. K., Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development // *Ann Med*. – 2007. – Т. 39, № 6. – С. 440-56.
11. Andrews R. P., Burrell L., Rosa-Rosa L., Cunningham C. M., Brzezinski J. L., Bernstein J. A., Khurana Hershey G. K. Analysis of the Ser786Pro interleukin-4 receptor alpha allelic variant in allergic and nonallergic asthma and its functional consequences // *Clin Immunol*. – 2001. – Т. 100, № 3. – С. 298-304.
12. Akdis M., Burgler S., Cramer R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E., Klunker S., Meyer N., O'Mahony L., Palomares O., Rhyner C., Ouaked N., Schaffartzik A., Van De Veen W., Zeller S., Zimmermann M., Akdis C. A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases // *J Allergy Clin Immunol*. – 2011. – Т. 127, № 3. – С. 701-21 e1-70.
13. Licona-Limon P., Kim L. K., Palm N. W., Flavell R. A. T(H)2, allergy and group 2 innate lymphoid cells // *Nature Immunology*. – 2013. – Т. 14, № 6. – С. 536-542.

14. Neill D. R., Wong S. H., Bellosi A., Flynn R. J., Daly M., Langford T. K. A., Bucks C., Kane C. M., Fallon P. G., Pannell R., Jolin H. E., McKenzie A. N. J. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity // *Nature*. – 2010. – T. 464, № 7293. – C. 1367-U9.
15. Walford H. H., Lund S. J., Baum R. E., White A. A., Bergeron C. M., Husseman J., Bethel K. J., Scott D. R., Khorram N., Miller M., Broide D. H., Doherty T. A. Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness // *Clin Immunol*. – 2014. – T. 155, № 1. – C. 126-35.
16. Price A. E., Liang H. E., Sullivan B. M., Reinhardt R. L., Easley C. J., Erle D. J., Locksley R. M. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – T. 107, № 25. – C. 11489-94.
17. Saenz S. A., Siracusa M. C., Monticelli L. A., Ziegler C. G., Kim B. S., Brestoff J. R., Peterson L. W., Wherry E. J., Goldrath A. W., Bhandoola A., Artis D. IL-25 simultaneously elicits distinct populations of innate lymphoid cells and multipotent progenitor type 2 (MP2) cells // *J Exp Med*. – 2013. – T. 210, № 9. – C. 1823-37.
18. Al-Shami A., Spolski R., Kelly J., Keane-Myers A., Leonard W. J. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model // *J Exp Med*. – 2005. – T. 202, № 6. – C. 829-39.
19. Kim H. J., Kim Y. J., Lee S. H., Yu J., Jeong S. K., Hong S. J. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Tregs // *Clin Immunol*. – 2014. – T. 153, № 1. – C. 178-86.
20. Xiong H. Z., Dolpady J., Wabl M., de Lafaille M. A. C., Lafaille J. J. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies // *Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – T. 209, № 2. – C. 353-364.
21. Talay O., Yan D. H., Brightbill H. D., Straney E. E. M., Zhou M. J., Ladi E., Lee W. P., Egen J. G., Austin C. D., Xu M., Wu L. C. IgE(+) memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway (vol 13, pg 396, 2012) // *Nature Immunology*. – 2013. – T. 14, № 12. – C. 1302-1304.
22. Takhar P., Smurthwaite L., Coker H. A., Fear D. J., Banfield G. K., Carr V. A., Durham S. R., Gould H. J. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis // *Journal of Immunology*. – 2005. – T. 174, № 8. – C. 5024-5032.
23. Cameron L., Gounni A. S., Frenkiel S., Lavigne F., Vercelli D., Hamid Q. S epsilon S mu and S epsilon S gamma switch circles in human nasal mucosa following ex vivo allergen challenge: evidence for direct as well as sequential class switch recombination // *J Immunol*. – 2003. – T. 171, № 7. – C. 3816-22.
24. Niederberger V., Niggemann B., Kraft D., Spitzauer S., Valenta R. Evolution of IgM, IgE and IgG(1-4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms // *Eur J Immunol*. – 2002. – T. 32, № 2. – C. 576-84.
25. Resch Y. S. M., M. Kabesch, et al. Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children // *Allergy Clin. Immunol* – T. 136 (2015). – C. 1083-1091.

26. Jarvis D., Zock J. P., Heinrich J., Svanes C., Verlato G., Olivieri M., Villani S., Ponzio M., Leynaert B., Sunyer J., Dahlman-Hoglund A., Chinn S., Luczynska C., Norback D., Burney P. Cat and dust mite allergen levels, specific IgG and IgG4, and respiratory symptoms in adults // *J Allergy Clin Immunol.* – 2007. – T. 119, № 3. – C. 697-704.
27. Miranda-Calderon J. E., Medina-Torres L., Tinoco-Mendez M., Moreno-Esparza R., Ruiz-Ramirez L., Gracia-Mora J., Gracia-Mora I., Bernad-Bernad M. J. Characterization of physical interaction between Casiopeina III-ia and chitosan. Toward a Cas III-ia drug delivery system // *Carbohydr Res.* – 2011. – T. 346, № 1. – C. 121-6.
28. Zalewska-Janowska A., Spiewak R., Kowalski M. L. Cutaneous Manifestation of Drug Allergy and Hypersensitivity // *Immunology and Allergy Clinics of North America.* – 2017. – T. 37, № 1. – C. 165-+.
29. Lee C., Seo J., Hwang H. S., Thao le Q., Lee S., Lee E. S., Lee E. H., Choi H. G., Youn Y. S. Treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhaled tacrolimus-loaded chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles // *Biomed Pharmacother.* – 2016. – T. 78. – C. 226-33.
30. Perezabad L., Lopez-Abente J., Alonso-Lebrero E., Seoane E., Pion M., Correa-Rocha R. The establishment of cow's milk protein allergy in infants is related with a deficit of regulatory T cells (Treg) and vitamin D // *Pediatr Res.* – 2017. – T. 81, № 5. – C. 722-730.
31. Kosoy R., Agashe C., Grishin A., Leung D. Y., Wood R. A., Sicherer S. H., Jones S. M., Burks A. W., Davidson W. F., Lindblad R. W., Dawson P., Merad M., Kidd B. A., Dudley J. T., Sampson H. A., Berin M. C. Transcriptional Profiling of Egg Allergy and Relationship to Disease Phenotype // *PLoS One.* – 2016. – T. 11, № 10. – C. e0163831.
32. Bacher P., Heinrich F., Stervbo U., Nienen M., Vahldieck M., Iwert C., Vogt K., Kollet J., Babel N., Sawitzki B., Schwarz C., Bereswill S., Heimesaat M. M., Heine G., Gadermaier G., Asam C., Assenmacher M., Kniemeyer O., Brakhage A. A., Ferreira F., Wallner M., Worm M., Scheffold A. Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans // *Cell.* – 2016. – T. 167, № 4. – C. 1067-1078 e16.
33. Steiner M., Hawranek T., Schneider M., Ferreira F., Horejs-Hoeck J., Harrer A., Himly M. Elevated Toll-Like Receptor-Induced CXCL8 Secretion in Human Blood Basophils from Allergic Donors Is Independent of Toll-Like Receptor Expression Levels // *PLoS One.* – 2016. – T. 11, № 2. – C. e0149275.
34. Secrist H., Chelen C. J., Wen Y., Marshall J. D., Umetsu D. T. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals // *J Exp Med.* – 1993. – T. 178, № 6. – C. 2123-30.
35. Ebner C., Siemann U., Bohle B., Willheim M., Wiedermann U., Schenk S., Klotz F., Ebner H., Kraft D., Scheiner O. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen // *Clin Exp Allergy.* – 1997. – T. 27, № 9. – C. 1007-15.

36. Hales B. J., Martin A. C., Pearce L. J., Laing I. A., Hayden C. M., Goldblatt J., Le Souef P. N., Thomas W. R. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease // *J Allergy Clin Immunol.* – 2006. – T. 118, № 2. – C. 361-7.
37. Jutel M., Akdis M., Budak F., Aebischer-Casaulta C., Wrzyszczyk M., Blaser K., Akdis C. A. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy // *Eur J Immunol.* – 2003. – T. 33, № 5. – C. 1205-14.
38. Verhoef A., Alexander C., Kay A. B., Larche M. T cell epitope immunotherapy induces a CD4+ T cell population with regulatory activity // *PLoS Med.* – 2005. – T. 2, № 3. – C. e78.
39. Ravetch J. V. Fc receptors // *Current Opinion in Immunology.* – 1997. – T. 9, № 1. – C. 121-125.
40. Clark M. R. IgG effector mechanisms // *Antibody Engineering.* – 1997. – T. 65. – C. 88-110.
41. James L. K., Bowen H., Calvert R. A., Dodev T. S., Shamji M. H., Beavil A. J., McDonnell J. M., Durham S. R., Gould H. J. Allergen specificity of IgG(4)-expressing B cells in patients with grass pollen allergy undergoing immunotherapy // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2012. – T. 130, № 3. – C. 663-+.
42. TePas E. C., Umetsu D. T. Immunotherapy of asthma and allergic diseases // *Current Opinion in Pediatrics.* – 2000. – T. 12, № 6. – C. 574-578.
43. Passalacqua G., Albano M., Fregonese L., Riccio A., Pronzato C., Mela G. S., Canonica G. W. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis // *Lancet.* – 1998. – T. 351, № 9103. – C. 629-32.
44. Litwin A., Flanagan M., Entis G., Gottschlich G., Esch R., Gartside P., Michael J. G. Oral immunotherapy with short ragweed extract in a novel encapsulated preparation: a double-blind study // *J Allergy Clin Immunol.* – 1997. – T. 100, № 1. – C. 30-8.
45. TePas E. C., Hoyte E. G., McIntire J. J., Umetsu D. T. Clinical efficacy of microencapsulated timothy grass pollen extract in grass-allergic individuals // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2004. – T. 92, № 1. – C. 25-31.
46. Milgrom H., Fick R. B., Su J. Q., Reimann J. D., Bush R. K., Watrous M. L., Metzger W. J., Grp r.-E. S. Treatment of a allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody // *Monatsschrift Kinderheilkunde.* – 2001. – T. 149, № 5. – C. 506-506.
47. Svirshchevskaya E. V., Viskova N., Shevchenko M., Alekseeva L., Marchenko A., Benevolensky S., Kurup V. P. High-affinity IgG to a major *A. fumigatus* allergen, Asp f 2, retards allergic response // *Med Sci Monit.* – 2004. – T. 10, № 10. – C. BR371-80.
48. Sicherer S. H., Sampson H. A. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: pathophysiology, epidemiology, diagnosis, and management // *J Allergy Clin Immunol.* – 1999. – T. 104, № 3 Pt 2. – C. S114-22.
49. Sicherer S. H. Epidemiology of food allergy // *J Allergy Clin Immunol.* – 2011. – T. 127, № 3. – C. 594-602.

50. Warner A., Bostrom S., Moller C., Kjellman N. I. Mite fauna in the home and sensitivity to house-dust and storage mites // *Allergy*. – 1999. – T. 54, № 7. – C. 681-90.
51. Platts-Mills T. A., Thomas W. R., Aalberse R. C., Vervloet D., Champman M. D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop // *J Allergy Clin Immunol*. – 1992. – T. 89, № 5. – C. 1046-60.
52. Zock J. P., Heinrich J., Jarvis D., Verlato G., Norback D., Plana E., Sunyer J., Chinn S., Olivieri M., Soon A., Villani S., Ponzio M., Dahlman-Hoglund A., Svanes C., Luczynska C. Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the European Community Respiratory Health Survey II // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2006. – T. 118, № 3. – C. 682-690.
53. de Ana S. G., Torres-Rodriguez J. M., Ramirez E. A., Garcia S. M., Belmonte-Soler J. Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients // *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. – 2006. – T. 16, № 6. – C. 357-363.
54. Kurup V. P., Shen H. D., Banerjee B. Respiratory fungal allergy // *Microbes and Infection*. – 2000. – T. 2, № 9. – C. 1101-1110.
55. Kurup V. P., Kumar A. Immunodiagnosis of Aspergillosis // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1991. – T. 4, № 4. – C. 439-456.
56. Bush R. K., Portnoy J. M. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases // *J Allergy Clin Immunol*. – 2001. – T. 107, № 3 Suppl. – C. S430-40.
57. Chapman M. D. Environmental allergen monitoring and control // *Allergy*. – 1998. – T. 53, № 45 Suppl. – C. 48-53.
58. Gronlund H., Saarne T., Gafvelin G., van Hage M. The major cat allergen, Fel d 1, in diagnosis and therapy // *Int Arch Allergy Immunol*. – 2010. – T. 151, № 4. – C. 265-74.
59. Partti-Pellinen K., Marttila O., Mäkinen-Kiljunen S., Haahtela T. Occurrence of dog, cat, and mite allergens in public transport vehicles // *Allergy*. – 2000. – T. 55, № 1. – C. 65-8.
60. Sever M. L., Arbes S. J., Jr., Gore J. C., Santangelo R. G., Vaughn B., Mitchell H., Schal C., Zeldin D. C. Cockroach allergen reduction by cockroach control alone in low-income urban homes: a randomized control trial // *J Allergy Clin Immunol*. – 2007. – T. 120, № 4. – C. 849-55.
61. Cuesta C., Placido J. L., Delgado L., Miranda M., Moreira Silva J. P., Castel-Branco M. G., Vaz M. [Cockroach allergy: a study of its prevalence using skin tests with commercial extracts] // *Allergol Immunopathol (Madr)*. – 1995. – T. 23, № 6. – C. 295-300.
62. King T. P. Chemical and biological properties of some atopic allergens // *Adv Immunol*. – 1976. – T. 23. – C. 77-105.
63. Piippo-Savolainen E., Remes S., Kannisto S., Korhonen K., Korppi M. Asthma and lung function 20 years after wheezing in infancy: results from a prospective follow-up study // *Arch Pediatr Adolesc Med*. – 2004. – T. 158, № 11. – C. 1070-6.

64. Frati F., Incorvaia C., Lombardi C., Senna G. Allergen immunotherapy: 100 years, but it does not look like // *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* – 2012. – T. 44, № 3. – C. 99-106.
65. Yang L., Hirose S., Suzuki K., Hiroi T., Takaiwa F. Expression of hypoallergenic Der f 2 derivatives with altered intramolecular disulphide bonds induces the formation of novel ER-derived protein bodies in transgenic rice seeds // *J Exp Bot.* – 2012. – T. 63, № 8. – C. 2947-59.
66. Bonura A., Passantino R., Costa M. A., Montana G., Melis M., Bondi M. L., Butteroni C., Barletta B., Corinti S., Di Felice G., Colombo P. Characterization of a Par j 1/Par j 2 mutant hybrid with reduced allergenicity for immunotherapy of Parietaria allergy // *Clin Exp Allergy.* – 2012. – T. 42, № 3. – C. 471-80.
67. Heydenreich B., Bellinghausen I., Lorenz S., Henmar H., Strand D., Wurtzen P. A., Saloga J. Reduced in vitro T-cell responses induced by glutaraldehyde-modified allergen extracts are caused mainly by retarded internalization of dendritic cells // *Immunology.* – 2012. – T. 136, № 2. – C. 208-17.
68. Vrtala S., Focke-Tejkl M., I S., Kraft D., Valenta R. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates // *Methods.* – 2004. – T. 32, № 3. – C. 313-320.
69. Vrtala S., Hirtenlehner K., Susani M., Akdis M., Kussebi F., Akdis C. A., Blaser K., Hufnagl P., Binder B. R., Politou A., Pastore A., Vangelista L., Sperr W. R., Semper H., Valent P., Ebner C., Kraft D., Valenta R. Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen, Bet v 1 // *Faseb Journal.* – 2001. – T. 15, № 9. – C. 2045-+.
70. Wagner S., Radauer C., Bublin M., Mann-Sommergruber K. H., Kopp T., Greisenegger E. K., Vogel L., Vieths S., Scheiner O., Breiteneder H. Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2008. – T. 121, № 1. – C. 246-252.
71. Bonura A., Amoroso S., Locorotondo G., Di Felice G., Tinghino R., Geraci D., Colombo P. Hypoallergenic variants of the Parietaria judaica major allergen Par j 1: a member of the non-specific lipid transfer protein plant family // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2001. – T. 126, № 1. – C. 32-40.
72. Orlandi A., Grasso F., Corinti S., Marinaro M., Bonura A., Boirivant M., Colombo P., Di Felice G. The recombinant major allergen of Parietaria judaica and its hypoallergenic variant: in vivo evaluation in a murine model of allergic sensitization // *Clin Exp Allergy.* – 2004. – T. 34, № 3. – C. 470-7.
73. Schramm G., Kahlert H., Suck R., Weber B., Stuwe H. T., Muller W. D., Bufe A., Becker W. M., Schlaak M. W., Jager L., Cromwell O., Fiebig H. "Allergen engineering": variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity // *J Immunol.* – 1999. – T. 162, № 4. – C. 2406-14.
74. Vrtala S., Focke M., Kopec J., Verdino P., Hartl A., Sperr W. R., Fedorov A. A., Ball T., Almo S., Valent P., Thalhamer J., Keller W., Valenta R. Genetic engineering of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 6, to reduce allergenic activity and preserve immunogenicity // *J Immunol.* – 2007. – T. 179, № 3. – C. 1730-9.

75. Westritschnig K., Focke M., Verdino P., Goessler W., Keller W., Twardosz A., Mari A., Horak F., Wiedermann U., Hartl A., Thalhamer J., Sperr W. R., Valent P., Valenta R. Generation of an allergy vaccine by disruption of the three-dimensional structure of the cross-reactive calcium-binding allergen, Phl p 7 // *J Immunol.* – 2004. – Т. 172, № 9. – С. 5684-92.
76. Takai T., Yokota T., Yasue M., Nishiyama C., Yuuki T., Mori A., Okudaira H., Okumura Y. Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy // *Nat Biotechnol.* – 1997. – Т. 15, № 8. – С. 754-8.
77. Gafvelin G., Parmley S., Neimert-Andersson T., Blank U., Eriksson T. L., van Hage M., Punnonen J. Hypoallergens for allergen-specific immunotherapy by directed molecular evolution of mite group 2 allergens // *J Biol Chem.* – 2007. – Т. 282, № 6. – С. 3778-87.
78. Saarne T., Kaiser L., Gronlund H., Rasool O., Gafvelin G., van Hage-Hamsten M. Rational design of hypoallergens applied to the major cat allergen Fel d 1 // *Clin Exp Allergy.* – 2005. – Т. 35, № 5. – С. 657-63.
79. Calderon M. A., Larenas D., Kleine-Tebbe J., Jacobsen L., Passalacqua G., Eng P. A., Varga E. M., Valovirta E., Moreno C., Malling H. J., Alvarez-Cuesta E., Durham S., Demoly P. European Academy of Allergy and Clinical Immunology task force report on 'dose-response relationship in allergen-specific immunotherapy' // *Allergy.* – 2011. – Т. 66, № 10. – С. 1345-1359.
80. Гуцин И.С. К. О. М. Аллергия и аллергенспецифическая иммунотерапия // – 2010. – С. 228
81. Gross F., Metzner G., Behn U. Mathematical modeling of allergy and specific immunotherapy: Th1-Th2-Treg interactions // *J Theor Biol.* – 2011. – Т. 269, № 1. – С. 70-8.
82. Kolbe L., Heusser C., Kolsch E. Epitope-dependent nonreciprocal regulation of IgE and IgG2a antibody formation // *Int Arch Allergy Immunol.* – 1994. – Т. 103, № 2. – С. 214-6.
83. Arps V., Sudowe S., Kolsch E. Antigen dose-dependent differences in IgE antibody production are not due to polarization towards Th1 and Th2 cell subsets // *European Journal of Immunology.* – 1998. – Т. 28, № 2. – С. 681-686.
84. Sakai K., Yokoyama A., Kohno N., Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma // *Clinical and Experimental Immunology.* – 1999. – Т. 118, № 1. – С. 9-15.
85. Nair L. S., Laurencin C. T. Biodegradable polymers as biomaterials // *Progress in Polymer Science.* – 2007. – Т. 32, № 8-9. – С. 762-798.
86. Lee K. Y., Yuk S. H. Polymeric protein delivery systems // *Progress in Polymer Science.* – 2007. – Т. 32, № 7. – С. 669-697.
87. Espevik T., Otterlei M., Skjak-Braek G., Ryan L., Wright S. D., Sundan A. The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers // *Eur J Immunol.* – 1993. – Т. 23, № 1. – С. 255-61.
88. Cole D. R., Waterfall M., McIntyre M., Baird J. D. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure // *Diabetologia.* – 1992. – Т. 35, № 3. – С. 231-7.
89. Zimmermann U., Klock G., Federlin K., Hannig K., Kowalski M., Bretzel R. G., Horcher A., Entenmann H., Sieber U., Zekorn T. Production of mitogen-

- contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis // *Electrophoresis*. – 1992. – T. 13, № 5. – C. 269-74.
90. Xing L., Dawei C., Liping X., Rongqing Z. Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome // *J Control Release*. – 2003. – T. 93, № 3. – C. 293-300.
 91. Benes L., Claustrat B., Horriere F., Geoffriau M., Konsil J., Parrott K. A., DeGrande G., McQuinn R. L., Ayres J. W. Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: a crossover study with melatonin // *J Pharm Sci*. – 1997. – T. 86, № 10. – C. 1115-9.
 92. Edelman E. R., Nathan A., Katada M., Gates J., Karnovsky M. J. Perivascular graft heparin delivery using biodegradable polymer wraps // *Biomaterials*. – 2000. – T. 21, № 22. – C. 2279-86.
 93. Rasmussen M. R., Snabe T., Pedersen L. H. Numerical modelling of insulin and amyloglucosidase release from swelling Ca-alginate beads // *J Control Release*. – 2003. – T. 91, № 3. – C. 395-405.
 94. Kim B., Bowersock T., Griebel P., Kidane A., Babiuk L. A., Sanchez M., Attah-Poku S., Kaushik R. S., Mutwiri G. K. Mucosal immune responses following oral immunization with rotavirus antigens encapsulated in alginate microspheres // *J Control Release*. – 2002. – T. 85, № 1-3. – C. 191-202.
 95. Smidsrod O., Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells // *Trends Biotechnol*. – 1990. – T. 8, № 3. – C. 71-8.
 96. Sugawara S., Imai T., Otagiri M. The controlled release of prednisolone using alginate gel // *Pharm Res*. – 1994. – T. 11, № 2. – C. 272-7.
 97. Murata Y., Jinno D., Liu D., Isobe T., Kofuji K., Kawashima S. The drug release profile from calcium-induced alginate gel beads coated with an alginate hydrolysate // *Molecules*. – 2007. – T. 12, № 11. – C. 2559-66.
 98. Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // *Mar Drugs*. – 2015. – T. 13, № 3. – C. 1133-74.
 99. Ahmadi F., Oveisi Z., Samani S. M., Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications // *Res Pharm Sci*. – 2015. – T. 10, № 1. – C. 1-16.
 100. Pugnali A., Solmi R., Muzzarelli R., Emanuelli M., Moroni F., Gazzanelli G., Baldassarre V., Biagini G. [Chitosan. Biochemical structural characteristics and bio-morphology] // *Boll Soc Ital Biol Sper*. – 1988. – T. 64, № 2. – C. 101-8.
 101. Hsu S. H., Chang Y. B., Tsai C. L., Fu K. Y., Wang S. H., Tseng H. J. Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2011. – T. 85, № 2. – C. 198-206.
 102. Kim H., Tator C. H., Shoichet M. S. Chitosan implants in the rat spinal cord: biocompatibility and biodegradation // *J Biomed Mater Res A*. – 2011. – T. 97, № 4. – C. 395-404.
 103. Liu T. M., Wu X. Z., Qiu Y. R. Enhanced biocompatibility and antibacterial property of polyurethane materials modified with citric acid and chitosan // *J Biomater Sci Polym Ed*. – 2016. – T. 27, № 12. – C. 1211-31.
 104. Kean T., Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2010. – T. 62, № 1. – C. 3-11.

105. Choi B. K., Kim K. Y., Yoo Y. J., Oh S. J., Choi J. H., Kim C. Y. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans* // *Int J Antimicrob Agents*. – 2001. – T. 18, № 6. – C. 553-7.
106. Agrawal P., Strijkers G. J., Nicolay K. Chitosan-based systems for molecular imaging // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2010. – T. 62, № 1. – C. 42-58.
107. Xie W., Xu P., Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2001. – T. 11, № 13. – C. 1699-701.
108. Salah R., Michaud P., Mati F., Harrat Z., Lounici H., Abdi N., Drouiche N., Mameri N. Anticancer activity of chemically prepared shrimp low molecular weight chitin evaluation with the human monocyte leukaemia cell line, THP-1 // *Int J Biol Macromol*. – 2013. – T. 52. – C. 333-9.
109. Feng J., Zhao L., Yu Q. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2004. – T. 317, № 2. – C. 414-20.
110. Rizzo M., Giglio R. V., Nikolic D., Patti A. M., Campanella C., Cocchi M., Katsiki N., Montalto G. Effects of chitosan on plasma lipids and lipoproteins: a 4-month prospective pilot study // *Angiology*. – 2014. – T. 65, № 6. – C. 538-42.
111. Katas H., Raja M. A., Lam K. L. Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA // *Int J Biomater*. – 2013. – T. 2013. – C. 146320.
112. Desai K. G. Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. – 2016. – T. 33, № 2. – C. 107-58.
113. Vasiliev Y. M. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation // *Expert Rev Vaccines*. – 2015. – T. 14, № 1. – C. 37-53.
114. Scherliess R., Buske S., Young K., Weber B., Rades T., Hook S. In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations // *Vaccine*. – 2013. – T. 31, № 42. – C. 4812-9.
115. Neimert-Andersson T., Binnmyr J., Enoksson M., Langeback J., Zettergren L., Hallgren A. C., Franzen H., Lind Enoksson S., Lafolie P., Lindberg A., Al-Tawil N., Andersson M., Singer P., Gronlund H., Gafvelin G. Evaluation of safety and efficacy as an adjuvant for the chitosan-based vaccine delivery vehicle ViscoGel in a single-blind randomised Phase I/IIa clinical trial // *Vaccine*. – 2014. – T. 32, № 45. – C. 5967-74.
116. Reed S. G., Orr M. T., Fox C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines // *Nat Med*. – 2013. – T. 19, № 12. – C. 1597-608.
117. Koppolu B., Zaharoff D. A. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells // *Biomaterials*. – 2013. – T. 34, № 9. – C. 2359-69.
118. Svirshchevskaya E. V., Alekseeva L. G., Reshetov P. D., Phomicheva N. N., Parphenyuk S. A., Ilyina A. V., Zueva V. S., Lopatin S. A., Levov A. N., Varlamov V. P. Mucoadjuvant properties of lipo- and glycoconjugated derivatives of oligochitosans // *Eur J Med Chem*. – 2009. – T. 44, № 5. – C. 2030-7.

119. Хантимирова Л. М. Сравнительная оценка иммуногенности охарактеризованных препаратов на основе хитозана и других адьювантов в составе инактивированных вакцин против гриппа // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016.
120. Shahidi F., Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects // *Adv Food Nutr Res.* – 2005. – Т. 49. – С. 93-135.
121. Kanauchi O., Deuchi K., Imasato Y., Shizukuishi M., Kobayashi E. Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 1995. – Т. 59, № 5. – С. 786-90.
122. Muzzarelli R. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives // *Cell Mol Life Sci.* – 1997. – Т. 53, № 2. – С. 131-40.
123. Sorlier P., Hartmann D. J., Denuziere A., Viton C., Domard A. Preparation and development of anti-chitosan antibodies // *J Biomed Mater Res A.* – 2003. – Т. 67, № 3. – С. 766-74.
124. VandeVord P. J., Matthew H. W., DeSilva S. P., Mayton L., Wu B., Wooley P. H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice // *J Biomed Mater Res.* – 2002. – Т. 59, № 3. – С. 585-90.
125. Xia Z., Wu S., Chen J. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide // *Int J Biol Macromol.* – 2013. – Т. 59. – С. 242-5.
126. Tsao C. T., Chang C. H., Lin Y. Y., Wu M. F., Han J. L., Hsieh K. H. Kinetic study of acid depolymerization of chitosan and effects of low molecular weight chitosan on erythrocyte rouleaux formation // *Carbohydr Res.* – 2011. – Т. 346, № 1. – С. 94-102.
127. Kasaai M. R., Arul J., Charlet G. Fragmentation of chitosan by ultrasonic irradiation // *Ultrason Sonochem.* – 2008. – Т. 15, № 6. – С. 1001-8.
128. Zhang H., Du Y., Yu X., Mitsutomi M., Aiba S. Preparation of chitoooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme // *Carbohydr Res.* – 1999. – Т. 320, № 3-4. – С. 257-60.
129. Zhang H., Neau S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation // *Biomaterials.* – 2001. – Т. 22, № 12. – С. 1653-8.
130. Скрябин К. Г. Хитин и хитозан получение, свойства и применение // Наука. – 2002.
131. Комаров Б. А. // Материалы 6 международной конференции “Новые достижения в исследовании хитина/хитозана”. . – 2001. – С. 187.
132. Hirano S., Ohe Y., Ono H. Selective N-acylation of chitosan // *Carbohydr Res.* – 1976. – Т. 47, № 2. – С. 315-20.
133. Terbojevich M., Pizziolo G., Peggion E., Cosani A., Scoffone E. The mechanism of polymerization of N-carboxyanhydrides in dimethylformamide. Evidence of the presence of cyclic terminals in polymers obtained by strong base initiation // *J Am Chem Soc.* – 1967. – Т. 89, № 11. – С. 2733-6.
134. А.В. Ильина В. Е. Т., А.И. Албулов, В.П. Варламов. // Биохимия. – 1999. № 35. – С. 536-568.
135. Hirano S. K. Y. // *Carbohydrate polymers.* – 1975. – Т. 65, № 1. – С. 166-168.
136. Hirano S. Y. Y. // *Carbohydrate polymers.* – 2002. – Т. 48 –С. 203-207.

137. Korchagina E. V., Philippova O. E. Effects of Hydrophobic Substituents and Salt on Core-Shell Aggregates of Hydrophobically Modified Chitosan: Light Scattering Study // *Langmuir*. – 2012. – T. 28, № 20. – С. 7880-7888.
138. Al-Rawi M., Diabate S., Weiss C. Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells // *Arch Toxicol*. – 2011. – T. 85, № 7. – С. 813-26.
139. Albers C. E., Hofstetter W., Siebenrock K. A., Landmann R., Klenke F. M. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations // *Nanotoxicology*. – 2013. – T. 7, № 1. – С. 30-6.
140. Frohlich E., Samberger C., Kueznik T., Absenger M., Roblegg E., Zimmer A., Pieber T. R. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress // *J Toxicol Sci*. – 2009. – T. 34, № 4. – С. 363-75.
141. Nair S., Sasidharan A., Divya Rani V. V., Menon D., Nair S., Manzoor K., Raina S. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells // *J Mater Sci Mater Med*. – 2009. – T. 20 Suppl 1. – С. S235-41.
142. Petushkov A., Intra J., Graham J. B., Larsen S. C., Salem A. K. Effect of crystal size and surface functionalization on the cytotoxicity of silicalite-1 nanoparticles // *Chem Res Toxicol*. – 2009. – T. 22, № 7. – С. 1359-68.
143. Bae K., Moon C., Lee Y., Park T. Intracellular Delivery of Heparin Complexed with Chitosan-g-Poly(Ethylene Glycol) for Inducing Apoptosis // *Pharmaceutical Research*. – 2009. – T. 26, № 1. – С. 93-100.
144. Hoemann C. D., Guzman-Morales J., Tran-Khanh N., Lavallee G., Jolicoeur M., Lavertu M. Chitosan Rate of Uptake in HEK293 Cells is Influenced by Soluble versus Microparticle State and Enhanced by Serum-Induced Cell Metabolism and Lactate-Based Media Acidification // *Molecules*. – 2013. – T. 18, № 1. – С. 1015-1035.
145. Yue Z. G., Wei W., Lv P. P., Yue H., Wang L. Y., Su Z. G., Ma G. H. Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles // *Biomacromolecules*. – 2011. – T. 12, № 7. – С. 2440-2446.
146. Zaki N. M., Nasti A., Tirelli N. Nanocarriers for Cytoplasmic Delivery: Cellular Uptake and Intracellular Fate of Chitosan and Hyaluronic Acid-Coated Chitosan Nanoparticles in a Phagocytic Cell Model // *Macromolecular Bioscience*. – 2011. – T. 11, № 12. – С. 1747-1760.
147. А.А. Г. Изучение внутриклеточного транспорта хитозана с помощью фотоактивируемого красителя на основе родамина // . – 2015.
148. Amidi M., Mastrobattista E., Jiskoot W., Hennink W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – T. 62, № 1. – С. 59-82.
149. Avadi M. R., Sadeghi A. M., Mohammadpour N., Abedin S., Atyabi F., Dinarvand R., Rafiee-Tehrani M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method // *Nanomedicine*. – 2010. – T. 6, № 1. – С. 58-63.
150. Du W. L., Niu S. S., Xu Y. L., Xu Z. R., Fan C. L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – T. 75, № 3. – С. 385-389.

151. Prabakaran M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery // *Int J Biol Macromol.* – 2015. – T. 72. – C. 1313-22.
152. Ohya Y., Shiratani M., Kobayashi H., Ouchi T. Release Behavior of 5-Fluorouracil from Chitosan-Gel Nanospheres Immobilizing 5-Fluorouracil Coated with Polysaccharides and Their Cell-Specific Cytotoxicity // *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry.* – 1994. – T. A31, № 5. – C. 629-642.
153. Goldberg M., Langer R., Jia X. Q. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering // *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition.* – 2007. – T. 18, № 3. – C. 241-268.
154. La predicazione dei cappuccini nel Cinquecento in Italia. – Loreto (Ancona): Libreria "S. Francesco d'Assisi, 1956. – 594 p. c.
155. Bodnar M., Hartmann J. F., Borbely J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles // *Biomacromolecules.* – 2005. – T. 6, № 5. – C. 2521-2527.
156. Qu J. M., Liu G., Wang Y. M., Hong R. Y. Preparation of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles used for hyperthermia // *Advanced Powder Technology.* – 2010. – T. 21, № 4. – C. 461-467.
157. Berthold A., Cremer K., Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs // *Journal of Controlled Release.* – 1996. – T. 39, № 1. – C. 17-25.
158. Tian X. X., Groves M. J. Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from *Mycobacterium vaccae* in chitosan nanoparticles // *J Pharm Pharmacol.* – 1999. – T. 51, № 2. – C. 151-7.
159. El-Shabouri M. H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2002. – T. 249, № 1-2. – C. 101-108.
160. Chauvierre C., Labarre D., Couvreur P., Vauthier C. Plug-in spectrometry with optical fibers as a novel analytical tool for nanoparticles technology: Application to the investigation of the emulsion polymerization of the alkylcyanoacrylate // *Journal of Nanoparticle Research.* – 2003. – T. 5, № 3-4. – C. 365-371.
161. Chauvierre C., Labarre D., Couvreur P., Vauthier C. Novel polysaccharide-decorated poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles // *Pharmaceutical Research.* – 2003. – T. 20, № 11. – C. 1786-1793.
162. Bravo-Osuna I., Vauthier C., Farabollini A., Palmieri G. F., Ponchel G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles // *Biomaterials.* – 2007. – T. 28, № 13. – C. 2233-43.
163. de Moura M. R., Aouada F. A., Mattoso L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2008. – T. 321, № 2. – C. 477-483.
164. Cheng M. H., Huang Y. X., Zhou H. J., Liu Z., Li J. F. Rapid preparation and characterization of chitosan nanoparticles for oligonucleotide // *Current Applied Physics.* – 2010. – T. 10, № 3. – C. 797-800.

165. Kim D. G., Jeong Y. I., Choi C., Roh S. H., Kang S. K., Jang M. K., Nah J. W. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles // *Int J Pharm.* – 2006. – T. 319, № 1-2. – C. 130-8.
166. Grenha A., Seijo B., Serra C., Remunan-Lopez C. Chitosan nanoparticle-loaded mannitol microspheres: Structure and surface characterization // *Biomacromolecules.* – 2007. – T. 8, № 7. – C. 2072-2079.
167. Huang H. Y., Shieh Y. T., Shih C. M., Twu Y. K. Magnetic chitosan/iron (II, III) oxide nanoparticles prepared by spray-drying // *Carbohydrate Polymers.* – 2010. – T. 81, № 4. – C. 906-910.
168. Gazori T., Khoshayand M. R., Azizi E., Yazdizade P., Nomanie A., Haririan I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization // *Carbohydrate Polymers.* – 2009. – T. 77, № 3. – C. 599-606.
169. Saranya N., Moorthi A., Saravanan S., Devi M. P., Selvamurugan N. Chitosan and its derivatives for gene delivery // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2011. – T. 48, № 2. – C. 234-238.
170. Branco M. C., Schneider J. P. Self-assembling materials for therapeutic delivery // *Acta Biomater.* – 2009. – T. 5, № 3. – C. 817-31.
171. Alexis F., Pridgen E. M., Langer R., Farokhzad O. C. Nanoparticle technologies for cancer therapy // *Handb Exp Pharmacol.* – 2010.10.1007/978-3-642-00477-3_2 № 197. – C. 55-86.
172. Mei L., Zhang Z., Zhao L., Huang L., Yang X. L., Tang J., Feng S. S. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2013. – T. 65, № 6. – C. 880-90.
173. Lu Y., Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs // *Int J Pharm.* – 2013. – T. 453, № 1. – C. 198-214.
174. Nishiyama M., Sawai H., Kosugi S. The current state of genetic counseling before and after amniocentesis for fetal karyotyping in Japan: a survey of obstetric hospital clients of a prenatal testing laboratory // *J Genet Couns.* – 2013. – T. 22, № 6. – C. 795-804.
175. Oerlemans C., Bult W., Bos M., Storm G., Nijssen J. F., Hennink W. E. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release // *Pharm Res.* – 2010. – T. 27, № 12. – C. 2569-89.
176. Wang A. Z., Langer R., Farokhzad O. C. Nanoparticle delivery of cancer drugs // *Annu Rev Med.* – 2012. – T. 63. – C. 185-98.
177. Davis M. E., Chen Z. G., Shin D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer // *Nat Rev Drug Discov.* – 2008. – T. 7, № 9. – C. 771-82.
178. Parveen S., Misra R., Sahoo S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging // *Nanomedicine.* – 2012. – T. 8, № 2. – C. 147-66.
179. Kedar U., Phutane P., Shidhaye S., Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting // *Nanomedicine.* – 2010. – T. 6, № 6. – C. 714-29.
180. Rosler A., Vandermeulen G. W., Klok H. A. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2001. – T. 53, № 1. – C. 95-108.

181. Hassani L. N., Hendra F., Bouchemal K. Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems // *Drug Discov Today*. – 2012. – T. 17, № 11-12. – C. 608-14.
182. Chen J., Ding J., Xiao C., Zhuang X., Chen X. Emerging antitumor applications of extracellularly reengineered polymeric nanocarriers // *Biomater Sci*. – 2015. – T. 3, № 7. – C. 988-1001.
183. Jones M., Leroux J. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers // *Eur J Pharm Biopharm*. – 1999. – T. 48, № 2. – C. 101-11.
184. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2002. – T. 54, № 5. – C. 631-51.
185. Ryu J., Lee H. J., Kim K. A., Lee J. Y., Lee K. S., Park J., Choi S. Y. Intracellular delivery of p53 fused to the basic domain of HIV-1 Tat // *Mol Cells*. – 2004. – T. 17, № 2. – C. 353-9.
186. Mora-Huertas C. E., Fessi H., Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery // *Int J Pharm*. – 2010. – T. 385, № 1-2. – C. 113-42.
187. Percec V., Wilson D. A., Leowanawat P., Wilson C. J., Hughes A. D., Kaucher M. S., Hammer D. A., Levine D. H., Kim A. J., Bates F. S., Davis K. P., Lodge T. P., Klein M. L., DeVane R. H., Aqad E., Rosen B. M., Argintaru A. O., Sienkowska M. J., Rissanen K., Nummelin S., Ropponen J. Self-assembly of Janus dendrimers into uniform dendrimersomes and other complex architectures // *Science*. – 2010. – T. 328, № 5981. – C. 1009-14.
188. She W., Li N., Luo K., Guo C., Wang G., Geng Y., Gu Z. Dendronized heparin-doxorubicin conjugate based nanoparticle as pH-responsive drug delivery system for cancer therapy // *Biomaterials*. – 2013. – T. 34, № 9. – C. 2252-64.
189. Schluter A. D., Rabe J. P. Dendronized Polymers: Synthesis, Characterization, Assembly at Interfaces, and Manipulation // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2000. – T. 39, № 5. – C. 864-883.
190. Bae Y., Kataoka K. Intelligent polymeric micelles from functional poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymers // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2009. – T. 61, № 10. – C. 768-84.
191. Shukla R. K., Tiwari A. Carbohydrate molecules: an expanding horizon in drug delivery and biomedicine // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. – 2011. – T. 28, № 3. – C. 255-92.
192. Bae B. C., Na K. Self-quenching polysaccharide-based nanogels of pullulan/folate-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy // *Biomaterials*. – 2010. – T. 31, № 24. – C. 6325-35.
193. Kim S., Chae S. Y., Na K., Kim S. W., Bae Y. H. Insulinotropic activity of sulfonyleurea/pullulan conjugate in rat islet microcapsule // *Biomaterials*. – 2003. – T. 24, № 26. – C. 4843-51.
194. Kim S., Park K. M., Ko J. Y., Kwon I. C., Cho H. G., Kang D., Yu I. T., Kim K., Na K. Minimalism in fabrication of self-organized nanogels holding both anti-cancer drug and targeting moiety // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2008. – T. 63, № 1. – C. 55-63.
195. Park K., Lee G. Y., Kim Y. S., Yu M., Park R. W., Kim I. S., Kim S. Y., Byun Y. Heparin-deoxycholic acid chemical conjugate as an anticancer drug carrier and its antitumor activity // *J Control Release*. – 2006. – T. 114, № 3. – C. 300-6.

196. Lee H., Lee K., Park T. G. Hyaluronic acid-paclitaxel conjugate micelles: synthesis, characterization, and antitumor activity // *Bioconjug Chem.* – 2008. – T. 19, № 6. – C. 1319-25.
197. Yang J. S., Zhou Q. Q., He W. Amphiphaticity and self-assembly behavior of amphiphilic alginate esters // *Carbohydr Polym.* – 2013. – T. 92, № 1. – C. 223-7.
198. Guo R., Zhang L., Jiang Z., Cao Y., Ding Y., Jiang X. Synthesis of alginic acid-poly[2-(diethylamino)ethyl methacrylate] monodispersed nanoparticles by a polymer-monomer pair reaction system // *Biomacromolecules.* – 2007. – T. 8, № 3. – C. 843-50.
199. Kurita K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin // *Progress in Polymer Science.* – 2001. – T. 26, № 9. – C. 1921-1971.
200. Sashiwa H., Aiba S. I. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials // *Progress in Polymer Science.* – 2004. – T. 29, № 9. – C. 887-908.
201. Zhang Y., Huo M. R., Zhou J. P., Yu D., Wu Y. P. Potential of amphiphilically modified low molecular weight chitosan as a novel carrier for hydrophobic anticancer drug: Synthesis, characterization, micellization and cytotoxicity evaluation // *Carbohydrate Polymers.* – 2009. – T. 77, № 2. – C. 231-238.
202. Du Y. Z., Wang L., Yuan H., Wei X. H., Hu F. Q. Preparation and characteristics of linoleic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles as a carrier for doxorubicin // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2009. – T. 69, № 2. – C. 257-63.
203. Hu F. Q., Ren G. F., Yuan H., Du Y. Z., Zeng S. Shell cross-linked stearic acid grafted chitosan oligosaccharide self-aggregated micelles for controlled release of paclitaxel // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2006. – T. 50, № 2. – C. 97-103.
204. Hu F. Q., Wu X. L., Du Y. Z., You J., Yuan H. Cellular uptake and cytotoxicity of shell crosslinked stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles encapsulating doxorubicin // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2008. – T. 69, № 1. – C. 117-25.
205. You J., Hu F. Q., Du Y. Z., Yuan H. Polymeric micelles with glycolipid-like structure and multiple hydrophobic domains for mediating molecular target delivery of paclitaxel // *Biomacromolecules.* – 2007. – T. 8, № 8. – C. 2450-6.
206. Can Z., Ping Q. N., Zhang H. J., Jian S. Preparation of N-alkyl-O-sulfate chitosan derivatives and micellar solubilization of taxol // *Carbohydrate Polymers.* – 2003. – T. 54, № 2. – C. 137-141.
207. Zhang C., Qineng P., Zhang H. Self-assembly and characterization of paclitaxel-loaded N-octyl-O-sulfate chitosan micellar system // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2004. – T. 39, № 1-2. – C. 69-75.
208. Zhang C., Qu G., Sun Y., Yang T., Yao Z., Shen W., Shen Z., Ding Q., Zhou H., Ping Q. Biological evaluation of N-octyl-O-sulfate chitosan as a new nano-carrier of intravenous drugs // *Eur J Pharm Sci.* – 2008. – T. 33, № 4-5. – C. 415-23.
209. Bouterfa H., Picht T., Kess D., Herbold C., Noll E., Black P. M., Roosen K., Tonn J. C. Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines // *Neurosurgery.* – 2000. – T. 46, № 2. – C. 419-30.

210. Opanasopit P., Ngawhirunpat T., Rojanarata T., Choochottiros C., Chirachanchai S. N-phthaloylchitosan-g-mPEG design for all-trans retinoic acid-loaded polymeric micelles // *Eur J Pharm Sci.* – 2007. – T. 30, № 5. – C. 424-31.
211. Opanasopit P., Ngawhirunpat T., Rojanarata T., Choochottiros C., Chirachanchai S. Camptothecin-incorporating N-phthaloylchitosan-g-mPEG self-assembly micellar system: effect of degree of deacetylation // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2007. – T. 60, № 1. – C. 117-24.
212. Li X., Kong X., Shi S., Zheng X., Guo G., Wei Y., Qian Z. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery // *BMC Biotechnol.* – 2008. – T. 8. – C. 89.
213. Borges O., Cordeiro-da-Silva A., Romeijn S. G., Amidi M., de Sousa A., Borchard G., Junginger H. E. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination // *J Control Release.* – 2006. – T. 114, № 3. – C. 348-58.
214. Du C., Zhao J., Fei J., Gao L., Cui W., Yang Y., Li J. Alginate-based microcapsules with a molecule recognition linker and photosensitizer for the combined cancer treatment // *Chem Asian J.* – 2013. – T. 8, № 4. – C. 736-42.
215. Gombotz W. R., Wee S. F. Protein release from alginate matrices // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2012. – T. 64. – C. 194-205.
216. Liu Z., Lv D., Liu S., Gong J. B., Wang D., Xiong M., Chen X. N., Xiang R., Tan X. Y. Alginic Acid-Coated Chitosan Nanoparticles Loaded with Legumain DNA Vaccine: Effect against Breast Cancer in Mice // *Plos One.* – 2013. – T. 8, № 4.
217. Anal A. K., Bhopatkar D., Tokura S., Tamura H., Stevens W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein // *Drug Development and Industrial Pharmacy.* – 2003. – T. 29, № 6. – C. 713-724.
218. Borges O., Cordeiro-Da-Silva A., Romeijn S. G., Amidi M., de Sousa A., Borchard G., Junginger H. E. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination // *Journal of Controlled Release.* – 2006. – T. 114, № 3. – C. 348-358.
219. Malik B., Goyal A. K., Markandeywar T. S., Rath G., Zakir F., Vyas S. P. Microfold-cell targeted surface engineered polymeric nanoparticles for oral immunization // *Journal of Drug Targeting.* – 2012. – T. 20, № 1. – C. 76-84.
220. Borges O., Silva M., de Sousa A., Borchard G., Junginger H. E., Cordeiro-da-Silva A. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen // *International Immunopharmacology.* – 2008. – T. 8, № 13-14. – C. 1773-1780.
221. Godbey W. T., Wu K. K., Mikos A. G. Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle // *Journal of Biomedical Materials Research.* – 1999. – T. 45, № 3. – C. 268-275.
222. Lavertu M., Methot S., Tran-Khanh N., Buschmann M. D. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation // *Biomaterials.* – 2006. – T. 27, № 27. – C. 4815-4824.

223. Liu Z., Lv D., Liu S., Gong J., Wang D., Xiong M., Chen X., Xiang R., Tan X. Alginate acid-coated chitosan nanoparticles loaded with legumain DNA vaccine: effect against breast cancer in mice // *PLoS One*. – 2013. – T. 8, № 4. – C. e60190.
224. Amoozgar Z., Park J. Y., Lin Q. N., Yeo Y. Low Molecular-Weight Chitosan as a pH-Sensitive Stealth Coating for Tumor-Specific Drug Delivery // *Molecular Pharmaceutics*. – 2012. – T. 9, № 5. – C. 1262-1270.
225. Fernandes J. C., Qiu X. P., Winnik F. M., Benderdour M., Zhang X. L., Dai K. R., Shi Q. Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies // *International Journal of Nanomedicine*. – 2012. – T. 7. – C. 5833-5845.
226. Vila A., Sanchez A., Janes K., Behrens I., Kissel T., Jato J. L. V., Alonso M. J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2004. – T. 57, № 1. – C. 123-131.
227. Lee E., Lee J., Jon S. A Novel Approach to Oral Delivery of Insulin by Conjugating with Low Molecular Weight Chitosan // *Bioconjugate Chemistry*. – 2010. – T. 21, № 10. – C. 1720-1723.
228. Gan Q., Wang T., Cochrane C., McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2005. – T. 44, № 2-3. – C. 65-73.
229. Rivera M. C., Pinheiro A. C., Bourbon A. I., Cerqueira M. A., Vicente A. A. Hollow chitosan/alginate nanocapsules for bioactive compound delivery // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – T. 79. – C. 95-102.
230. Caruso F. Hollow inorganic capsules via colloid-templated layer-by-layer electrostatic assembly // *Colloid Chemistry II*. – 2003. – T. 227. – C. 145-168.
231. Ye S., Wang C., Liu X., Tong Z. Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release // *J Biomater Sci Polym Ed*. – 2005. – T. 16, № 7. – C. 909-23.
232. Chen F., Zhang Z. R., Huang Y. Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers // *Int J Pharm*. – 2007. – T. 336, № 1. – C. 166-73.
233. Biswas S., Chattopadhyay M., Sen K. K., Saha M. K. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice // *Carbohydr Polym*. – 2015. – T. 121. – C. 403-10.
234. Sergent J. A., Paget V., Chevillard S. Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line // *Ann Occup Hyg*. – 2012. – T. 56, № 5. – C. 622-30.
235. Opanasopit P., Aumklad P., Kowapradit J., Ngawhiranpat T., Apirakaramwong A., Rojanarata T. Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2) // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2007. – T. 12, № 5. – C. 447-455.

236. Huang M., Khor E., Lim L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: Effects of molecular weight and degree of deacetylation // *Pharmaceutical Research*. – 2004. – Т. 21, № 2. – С. 344-353.
237. Yang Y., He Q., Duan L., Cui Y., Li J. Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application // *Biomaterials*. – 2007. – Т. 28, № 20. – С. 3083-90.
238. Lopes M., Shrestha N., Correia A., Shahbazi M. A., Sarmiento B., Hirvonen J., Veiga F., Seica R., Ribeiro A., Santos H. A. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin // *J Control Release*. – 2016. – Т. 232. – С. 29-41.
239. Al-Qadi S., Grenha A., Carrion-Recio D., Seijo B., Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: in vivo evaluation of insulin-loaded formulations // *J Control Release*. – 2012. – Т. 157, № 3. – С. 383-90.
240. Shahnaz G., Vetter A., Barthelmes J., Rahmat D., Laffleur F., Iqbal J., Perera G., Schlocker W., Dunnhaput S., Augustijns P., Bernkop-Schnurch A. Thiolated chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: bioavailability and pharmacokinetic characterization // *Int J Pharm*. – 2012. – Т. 428, № 1-2. – С. 164-70.
241. Wen Z. S., Xu Y. L., Zou X. T., Xu Z. R. Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice // *Mar Drugs*. – 2011. – Т. 9, № 6. – С. 1038-55.
242. Janes K. A., Fresneau M. P., Marazuela A., Fabra A., Alonso M. J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin // *J Control Release*. – 2001. – Т. 73, № 2-3. – С. 255-67.
243. Ильина А.В. В. В. П., Ермаков Ю.А., Орлов В.Н., Скрыбин К.Г. Хитозан – природный полимер для формирования наночастиц // *Доклады Академии Наук*. – 2008. – Т. Том 421, № №2.С.1–3.
244. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines // *Pharm Res*. – 1997. – Т. 14, № 10. – С. 1431-6.
245. Марченко А.Н. К. Д. Г., Свирцевская Е.В., Беневоленский С.В. . Использование N-конца ТуА белка для получения вирусо-подобных частиц. // *Биотехнология*. – 2001. – Т. 2. – С. 3-11.