

На правах рукописи

Каширина Елена Игоревна

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

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории клеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН)

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

**Свирщевская Елена Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)», заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и композитов

**Кильдеева Наталия Рустемовна**

доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и промышленной фармации Московского технологического университета

**Кедик Станислав Анатольевич**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «14» марта 2018 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 на базе ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 и на Интернет-сайте <http://ibch.ru>.

Автореферат разослан «    »                      20    г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук



**В.А. Олейников**

## Характеристика работы

### Актуальность исследования

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 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 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, являются актуальной биомедицинской задачей.

С развитием фундаментальных наук в течение последних десятилетий биополимеры нашли широкое применение в медицине, в частности в области разработки систем доставки лекарств. Препараты на основе полимеров могут иметь различный, заряд, размер, электропроводность, температуру плавления, гидрофобность, что объясняет их широкое применение в медицине и биотехнологии. Включение биоактивных молекул разного рода в биосовместимые полимерные нано- и микрочастицы/капсулы в настоящее время является одним из перспективных направлений 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 его отличает 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. Биоразлагаемость, биосовместимость, низкая токсичность, низкая иммуногенность и хорошая мукоадгезия хитозана и альгината

позволяют их использовать для разработки препаратов для парентерального введения, в частности для создания безопасных препаратов для АСИТ.

**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;
5. протективный эффект капсулированных аллергенов *in vivo* в модели аллергии на мышах.

**Научная новизна**

Разработана структура оболочки для капсулирования белков, которая предотвращает контакт IgE с белком, но сохраняет иммуногенность белка, 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 изучена в экспериментах *in vivo* иммуногенность капсулированных белков. Также впервые в мышинной модели аллергии показано, что иммунизация капсулированными аллергенами безопасна и вызывает формирование IgG антител. Впервые показано в мышинной модели, что продукция IgG и IgE антител идет независимо, соответственно, АСИТ не приводит к снижению IgE, но снижает легочную реакцию, что также наблюдается при проведении АСИТ в клинике.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы основана на разработке структуры, методов получения капсулированных белков, а также на 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 которого снижается медленно, аналогично наблюдаемому в клинике при проведении АСИТ. Для решения проблемы эффективности требуется понимание механизмов формирования IgE-продуцирующих клеток.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. гидрофобизированные производные хитозана можно использовать для получения наночастиц методом самосборки;
2. капсулированные в двойную полимерную оболочку из хитозана и 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 экстрактами аллергенов по традиционной схеме или капсулированными аллергенами в быстром протоколе приводят к появлению IgG антител, но не отменяют продукцию IgE.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Полученные результаты опубликованы в 2 зарубежных и 4 отечественных журналах 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).

**Личный вклад автора** заключается в проведении экспериментальных и теоретических исследований. Основные результаты работы получены лично автором при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов.

**Структура и объем диссертации** Диссертационная работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Обсуждение

результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 150 страницах, содержит 41 рисунок и 7 таблиц. Список литературы включает 245 ссылок на литературные источники.

Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н., с.н.с., Е.В. Свищевской, заведующему лабораторией клеточных взаимодействий д.б.н., профессору А.М.Сапожникову и заведующему лабораторией полимеров для биологии д.х.н., профессору В.П. Зубову за предоставленную возможность проведения исследований, к.х.н., в.н.с. П.Д. Решетову за неоценимую помощь в планировании и выполнении диссертационного исследования, н.с., к.т.н, А.А., Ольхову и н.с. О.В. Староверцевой за помощь в освоении работы на установке электроспрея, к.ф.-м.н. К.С. Минееву за проведение характеристик хитозана методом ЯМР, к. х. н., м.н.с. С.В. Сизову за помощь в характеристике образцов методом динамического светорассеяния. аспиранту Д.Б. Чудакову, к.б.н. В.С. Зуевой, к.х.н. А.А. Зубаревой, к.б.н. Т.С. Лялиной и всем сотрудникам лабораторий клеточных взаимодействий и полимеров для биологии ИБХ РАН за ценные консультации и всестороннюю помощь и поддержку.

## **Основное содержание работы**

### **1. Получение и характеристика белков-аллергенов**

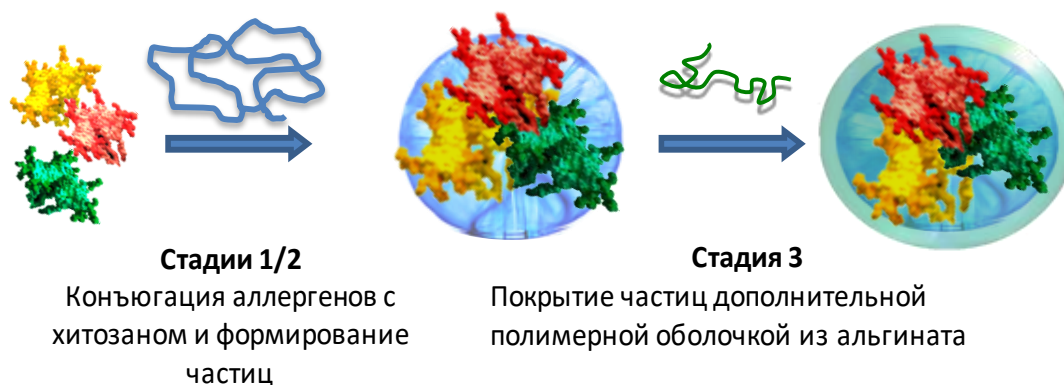
Общим решением безопасности АСИТ является предупреждение контакта аллергенов с IgE антителами, депонированными на тучных клетках, находящихся под сосудистым руслом. Подкожное введение терапевтических препаратов неизбежно приводит к контакту аллергенов с IgE, что вызывает дегрануляцию тучных клеток при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

В исследовании использовали рекомбинантные бактериальные белки из условно патогенного гриба *A. fumigatus* - Asp f 2 и Asp f 3 и клещей домашней пыли *D. farinae*– Der f 1 и Der f 2. При тестировании сывороток больных 79% сывороток распознавали бактериальный Der f 2, 32% и 20% - бактериальные Asp f 2 и Asp f 3 соответственно.

Наработка перечисленных белков осуществлялась в клетках *E. coli* и выделяли на Ni-агарозе. Белки анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Хранение белков осуществляли в 8М мочеvine при -20°C.

### **2. Получение и физико-химические свойства наночастиц на основе хитозана и его производных**

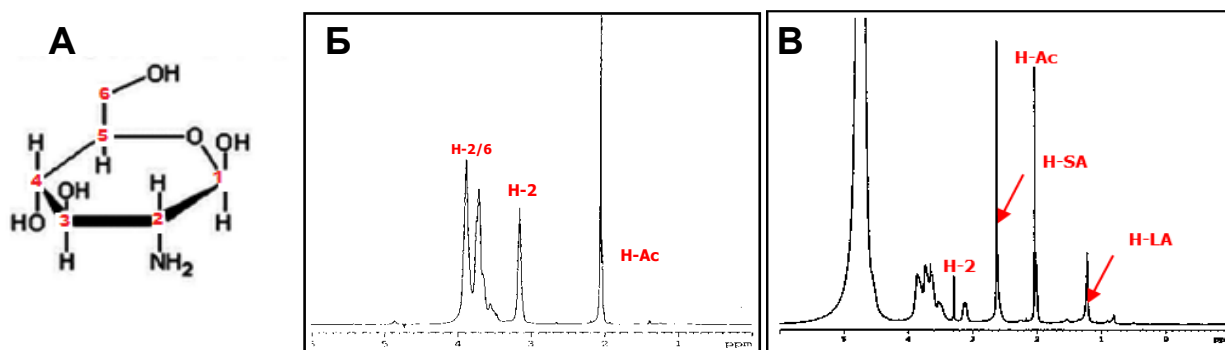
В данной работе предлагается создание барьера между аллергеном и IgE за счет капсулирования белковых аллергенов для АСИТ в полимерный матрикс. Общая схема капсулирования белков приведена на рисунке 1. На стадии 1 формируются частицы на основе производных хитозана, в которые включаются рекомбинантные аллергены (стадии 1/2). На стадии 3 частицы дополнительно покрываются альгинатом для снижения доступа IgE к аллергену



**Рисунок 1.** Принципиальная схема формирования барьера между аллергенами и IgE за счет капсулирования белков в полимерный матрикс.

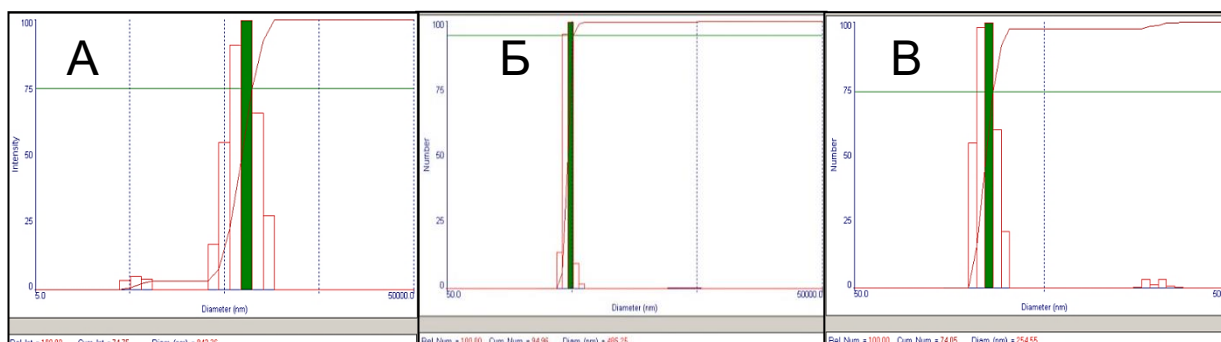
### 3. Характеристика производных хитозана с различными гидрофобными заместителями

Для оптимизации гидрофильно-липофильных и кислотно-основных свойств хитозан модифицировали 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. Путем взаимодействия хитозана с эфирами карбоновых кислот получали гексаноил-, деканоил- и лаурил-хитозан. Степень замещения (СЗ) полученных производных определяли методом протонного ЯМР (Рисунок 2) (Таблица 1).



**Рисунок 2.** Схема  $^1\text{H}$ -ЯМР хитозана. А. Порядок расположения углеродов и прилежащих к ним протонов в звене хитозана. Б. Спектр немодифицированного хитозана. В. Спектр лаурилсукциноилхитозана.

Из полученных производных хитозана при переводе их диализом из спиртового раствора в водный формировались частицы методом самосборки, физико-химические параметры которых приведены в таблице 1. Размер частиц определяли с помощью динамического светорассеяния: основную фракцию частиц гексаноилхитозана составляли крупные частицы и их агрегаты размером около 850 нм. Для деканоил- и лаурилхитозана был получен пул индивидуальных частиц размером 500 и 250 нм соответственно (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Распределение частиц на основе гексаноил-хитозана (А) деканоил-хитозана (Б) и лаурил-хитозана (В) по размеру, определенное методом динамического светорассеяния

**Таблица 1** – 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

Частицы, полученные на основе гексаноил- и деканоил-хитозана, имели более крупный размер, а также образовывали больший процент агрегатов. Таким образом, для дальнейшей работы был выбран лаурилхитозан (ЛХ).

Введение карбоксильных групп осуществляли реакцией с ангидридом янтарной кислоты. Ангидрид янтарной кислоты вводили в реакционную смесь в расчете на степень замещения 20, 40, 60, 80 на 100 групп хитозана. Образцы характеризовали с помощью ЯМР. Характеристики полученных производных представлены в таблице 2.

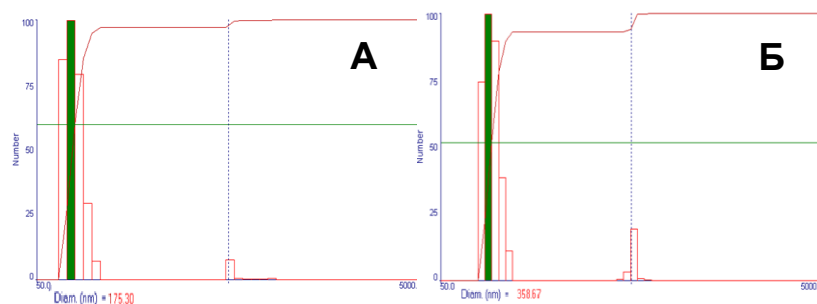


**Таблица 2** - Параметры сукциноилхитозанов с различной СЗ.

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

#### 4. Выбор молекулярной массы хитозана, размера частиц и исходной концентрации полимера.

Дальнейшие исследования были связаны с выбором молекулярной массы (ММ) образцов хитозана для получения стабильных частиц с оптимальным размером. Лауриновые производные получали из хитозана с 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 ( $170\pm 100$ нм), в то время как из образцов с ММ 300 кДа формировались частицы  $350\pm 100$  нм, к тому же возрастал процент агрегатов (рисунок 4).



**Рисунок 4.** Распределение частиц ЛХ с ММ 40 кДа (А) и 300 кДа (Б) по размеру

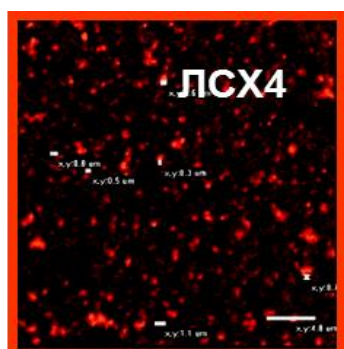
Из полученных результатов можно сделать вывод, что оптимальной ММ для получения наночастиц методом самосборки можно считать 40 кДа.

Влияние исходной концентрации предварительно полученных ЛСХ (СЗ 15% остатками жирных кислот и 60% карбоксильными группами (расчетное)) на образование частиц в воде оценивали в пределах 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. При концентрации выше 5 мг/мл дзета - потенциал снижался, о чем свидетельствовала увеличение размера частиц до 1,5 мкм. Кроме того, при уменьшении концентрации хитозана до 1 мг/мл снижался выход частиц. При концентрации ЛСХ 3 мг/мл формировались частицы

с размером 200-250 нм. Заряд частиц составил - 20-25 мВ. Следовательно, оптимальной считали исходную концентрацию производного хитозана 3 мг/мл.

### 5. Получение частиц из лаурилсукциноилхитозана методом самосборки

Далее подбирали условия одновременной модификации остатками жирной кислоты (10, 15 или 20%) и янтарным ангидридом (60, 80 или 100%). Частицы формировали методом самосборки во время диализа из водно-спиртового раствора, в котором получали ЛСХ, в водный раствор. Размер и дзета-потенциал полученных частиц определяли методом ДСР (Таблица 3), для определения морфологии использовали меченные родамином В производные хитозана (Рисунок 5).



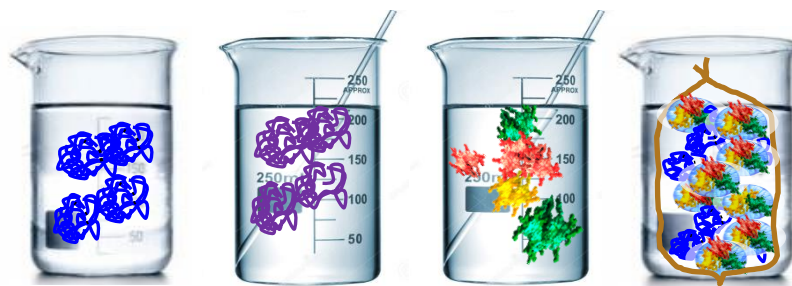
**Рисунок 5.** Конфокальная микроскопия родамин В - меченных наночастиц ЛСХ. Увеличение х60000. Наиболее стабильные частицы формировались из ЛСХ4.

**Таблица 3 -** Оптимизация степени замещения аминогрупп хитозана жирнокислотными и сукциноильными 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

### 6. Включение рекомбинантных белков в состав наночастиц

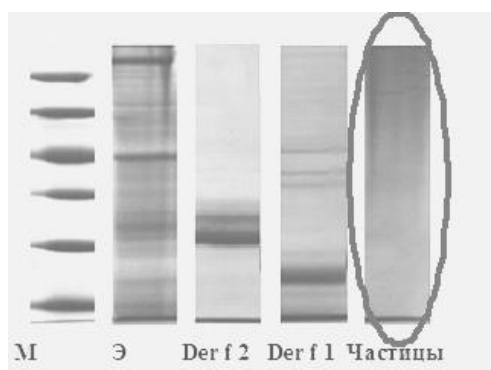
Хитозан растворяли в водно-спиртовом растворе (вода:спирт 2:3). В этих условиях проверяли, чтобы рекомбинантные белки (Derf 1, Derf 2, Aspf 1 и Aspf 2), которые так же являются гидрофобными, были растворимы, что необходимо для более полной иммобилизации аминогрупп белка на карбоксильных группах хитозана. Карбодимид добавлялся в раствор ЛСХ4 (Рисунок 6, стадии 1-2) в расчёте на активацию приблизительно половины карбоксильных групп.



Стадии 1 2 3 4

**Рисунок 6. 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 реакцию по каплям при интенсивном перемешивании и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 12 ч (Рисунок 6, стадия 3). По окончании инкубации в реакцию 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 буфера. Полученный конъюгат обрабатывали небольшим количеством сшивающего агента (активированной карбодимидом лимонной кислотой) для более плотной фиксации лиганда на хитозане. Отсутствие в полученном растворе несшитых белков контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (Рисунок 7).

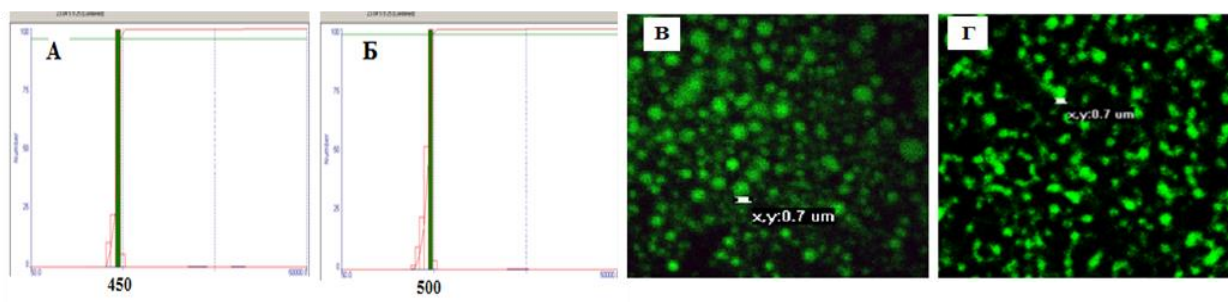


**Рисунок 7. Электрофорез в ПААГ белков и частиц.** М – маркер, Э- экстракт КДП, белки Der f 1 и 2, частицы, содержащие смесь белков Der f 1 и 2 (показано овалом).

Количество связанного белка было близко к количеству введенного в реакцию, что подтверждает полноту прохождения реакции. Для определения выхода и анализа соотношения ЛСХ/белок использовали массу сухой навески наночастиц. Частицы имели слабый положительный заряд и диаметр около 100-120 нм, что определяли методом динамического светорассеяния.

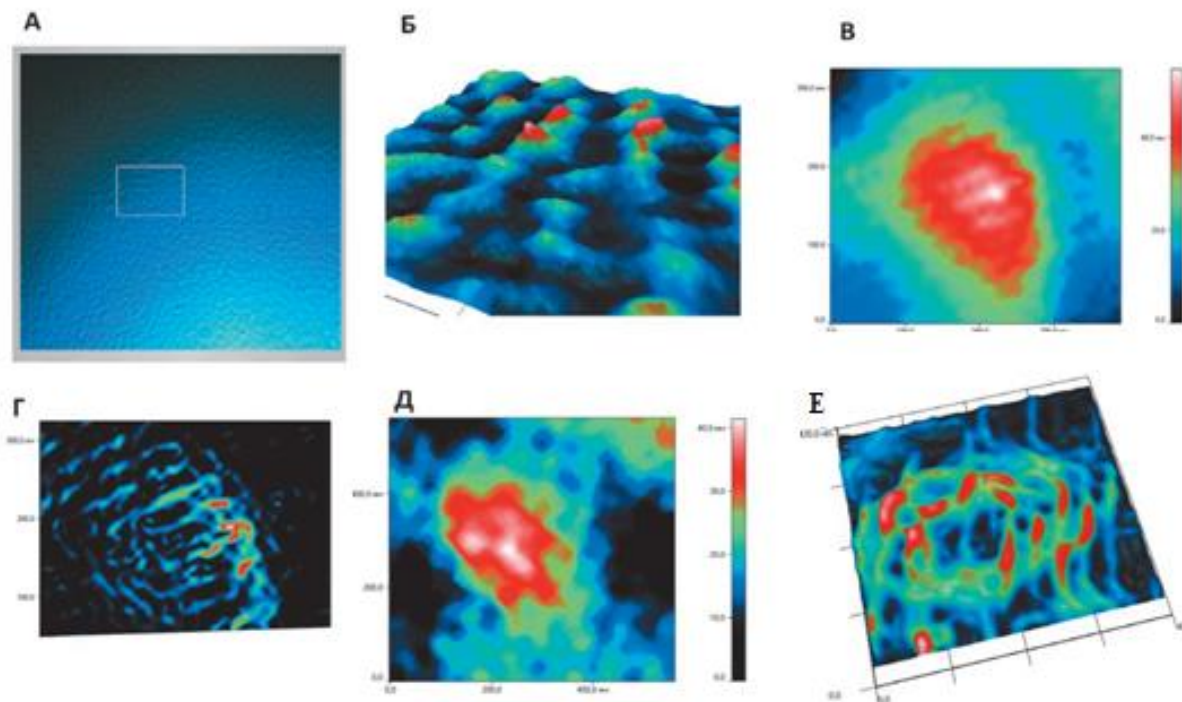
## 7. Получение двухслойных частиц белок-хитозан-альгинат

Следующей стадией получения целевой конструкции являлось формирование оболочки из альгината, предназначенной для более плотной упаковки белков-аллергенов. 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 перемешивали при RT в течение 30 минут. В результате были получены частицы с включенными в ЛСХ рекомбинантными белками Der f 1, Der f 2, Asp f 1 и Asp f 2, дополнительно покрытыми пленкой из альгиновой кислоты. Частицы имели заряд примерно  $-15$  мВ. Морфологию и гомогенность полученных частиц анализировали методом конфокальной микроскопии с использованием ФИТЦ меченых белков, входящих в состав частиц. Покрытие альгинатом увеличивало размер частиц (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Определение размера и морфологии частиц Derf 1/2-ЛСХ-альгинат (А, В) и Asp f 2/3-ЛСХ-альгинат (Б, Г) методами ДСР (А и Б) и конфокальной микроскопии (В и Г)

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 9.** Структура частиц, полученная методом (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).

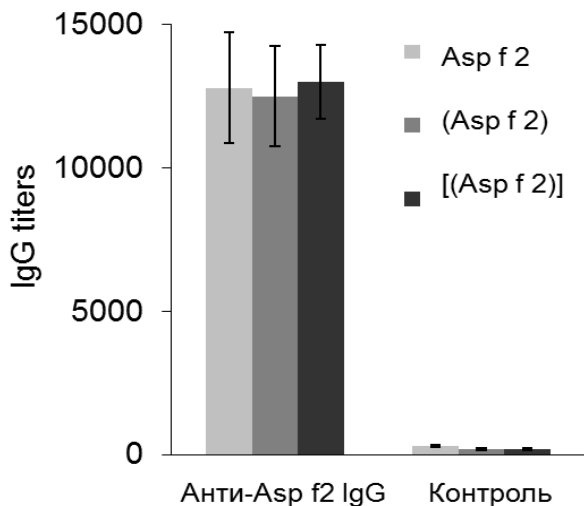
Полученная суспензия состояла из однородных частиц (Рисунок 9 А и Б), имеющих слегка овальную форму (В и Д) полых внутри с выраженной 2-слойной структурой, внутренний слой которой сформирован гидрофобным ядром и белками (Рисунок 9 Г и Е), а внешний – альгиновой кислотой (ЛСХ-АЛГ) (Рисунок 9 Е). На Рисунке 9 также приведены форма и структура ядра частиц (В и Г), где частицы имеют регулярно упакованную однослойную структуру.

## **8. Распознавание белков-аллергенов IgE антителами из сывороток больных и оценка сорбции частиц на подложке**

Распознавание аллергенов IgE антителами из сывороток больных с аллергией на КДП и гриб *A. fumigatus* оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В работе использовали 50 сывороток от больных с аллергией на КДП, 50 сывороток - с аллергией на гриб *A. fumigatus* и 25 сывороток здоровых доноров. 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.

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 Der f 1, Der f 2, Asp f 2 и Asp f 3. 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 10). Аналогично использовали капсулированный белок Der f 2 с близкими результатами.

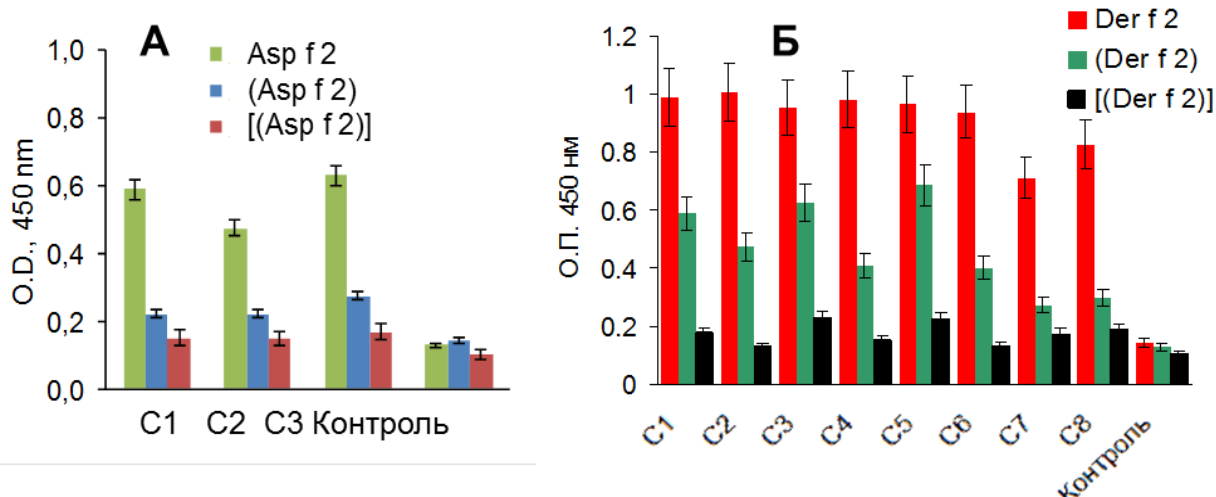


**Рисунок 10. Оптимизация ИФА с помощью высокоаффинных кроличьих сывороток к Asp f 2.** На подложку наносили свободный белок Asp f 2, капсулированный в ЛСХ (Asp f 2) или в ЛСХ-альгинат [(Asp f 2)].

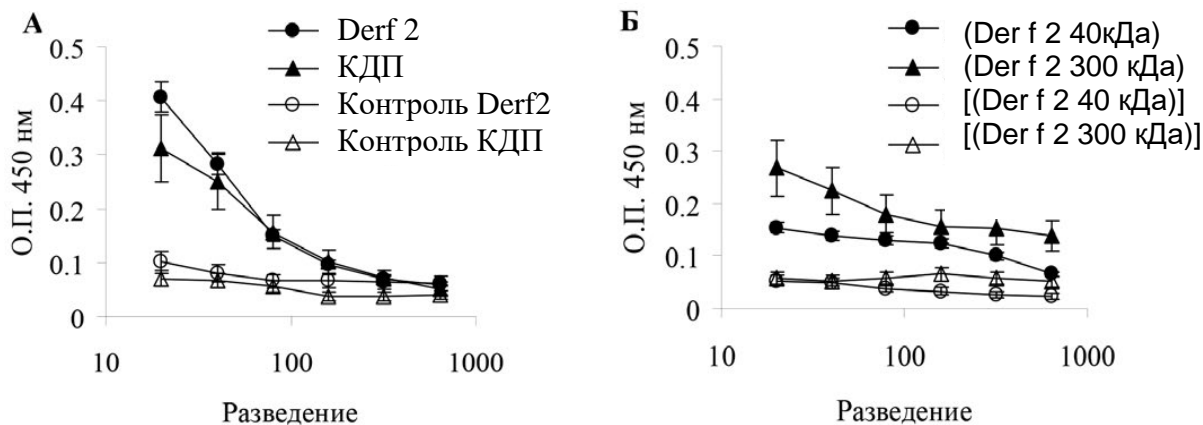
## 9. Анализ связывания капсулированных аллергенов с IgE

На рисунке 11 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 11, Б) и на 80% для низкотитровых к Asp f 2 (Рисунок 11, А). Примеры титровочных кривых на Der f 2, экстракте КДП и капсулированных в ЛСХ 40 и 300 кДа аллергенах приведены на рисунке 12. Отобранные сыворотки больных с аллергией на КДП распознавали как рекомбинантный Der f 2, так и экстракт КДП (Рисунок 12, 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 12, Б). Двойная упаковка белка полностью предотвращала связывание, кривые совпадали с контрольными данными для сыворотки здоровых доноров (Рисунок 12, А и Б).





**Рисунок 11. 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.

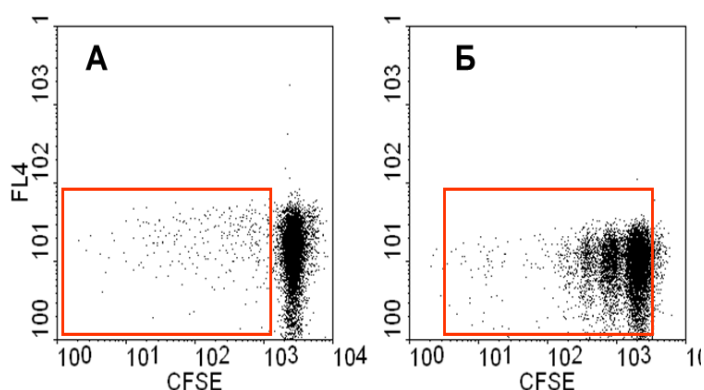


**Рисунок 12. Связывание свободных и капсулированных аллергенов с IgE.** А. Титровочные кривые распознавания свободного Der f 2, экстракта КДП IgE из сывороток больных с аллергией (черные значки) и здоровых доноров (светлые значки). Б. Титровочные кривые распознавания IgE в сыворотках больных с аллергией 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).

## 10. Анализ клеточного ответа на капсулированные белки

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. Анализ пролиферации осуществляли на проточном цитометре. Репрезентативные графики пролиферации приведены на рисунке 13,

где пролиферирующие популяции отмечены прямоугольниками. Результаты доли пролиферирующих Т-клеток (%) приведены в таблице 4.



**Рисунок 13. Пролiferация *in vitro* CFSE+ Т-лимфоцитов интактной (А) и иммунной мыши в ответ на смесь (1:1) белков Der f 1 и Der f 2.**

**Таблица 4 – Пролiferация лимфоцитов дренирующего место инъекции подколенного узла мышей, иммунизированных капсулированными белками в подушечку лапки (%).**

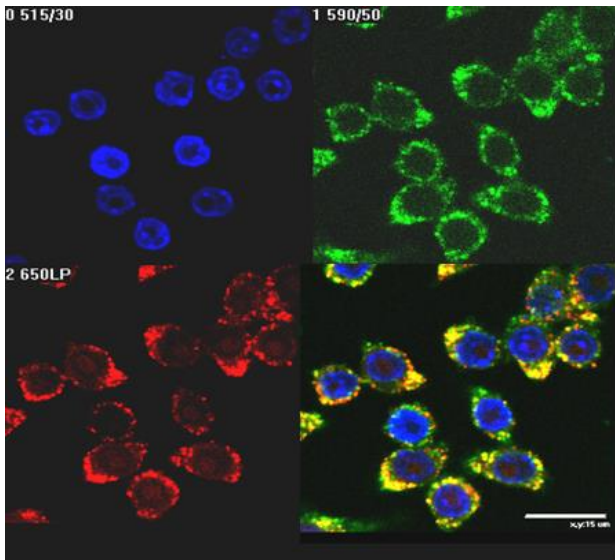
Концентрация мкг/мл	Антигены/(ЛСХ-антигены)/[(ЛСХ-альгинат-антигены)]		
	Der f 1/Der f 2	(Der f 1/Derf 2)	[(Der f 1 /Der f 2)]
	свободные	ЛСХ	ЛСХ-альгинат
0	2±1	2.3±1	2.5±1.5
10	8.4±4.2	6.2±2.8	17±6
20	18±3	21±4	33±5
40	28±5	26±6	50±7

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

## 11. Анализ фагоцитоза капсулированных белков макрофагами

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. Внутриклеточный транспорт захваченных частиц оценивали через 12 ч с помощью трекеров органелл. Колокализация наблюдалась с лизосомами (Рисунок 14), что соответствует процессингу антигенов, аналогичному процессингу любых карпускулированных объектов (частицы туши, микроорганизмы, споры грибов и др.).

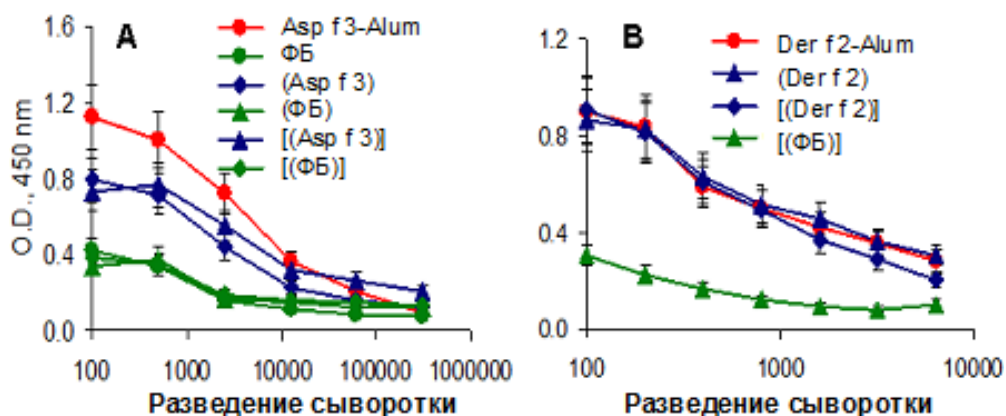




**Рисунок 14. Транспорт частиц в лизосомы.** Клетки J774 инкубировали с капсулированными белками Der f 1/Der f 2, меченные родамином (красный), лизосомы метили трекером LyzoTrackGreen (зеленый). Приведено изображение в каждом канале и наложение всех каналов. Масштабная линейка 15 мкм.

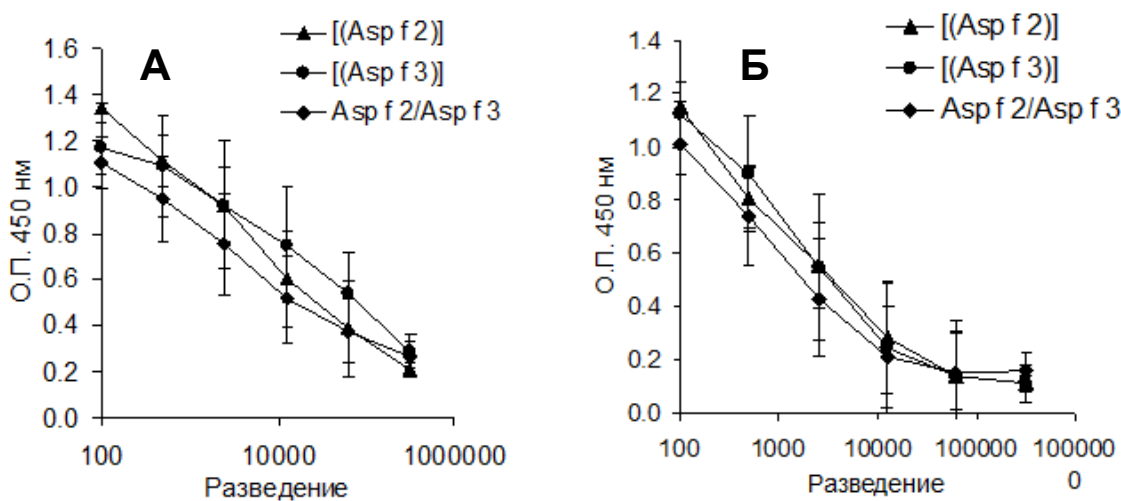
## 12. Индукция гуморального IgG ответа *in vivo*

Анализ индукции гуморального иммунного ответа проводили *in vivo*, для чего мышей иммунизировали свободными или капсулированными антигенами. Свободные белки вводили в смеси с адьювантом 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 15). Иммунизация свободными белками в адьюванте вызывала формирование несколько более высоких титров и аффинности IgG антител к Asp f 3, чем при иммунизации капсулированным белком (Рисунок 15, А). При иммунизации капсулированным Der f 2 характер гуморального ответа (титры, аффинность IgG антител) был сравнимым (Рисунок 15, Б).



**Рисунок 15. Индукция IgG антител в мышях 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 16).

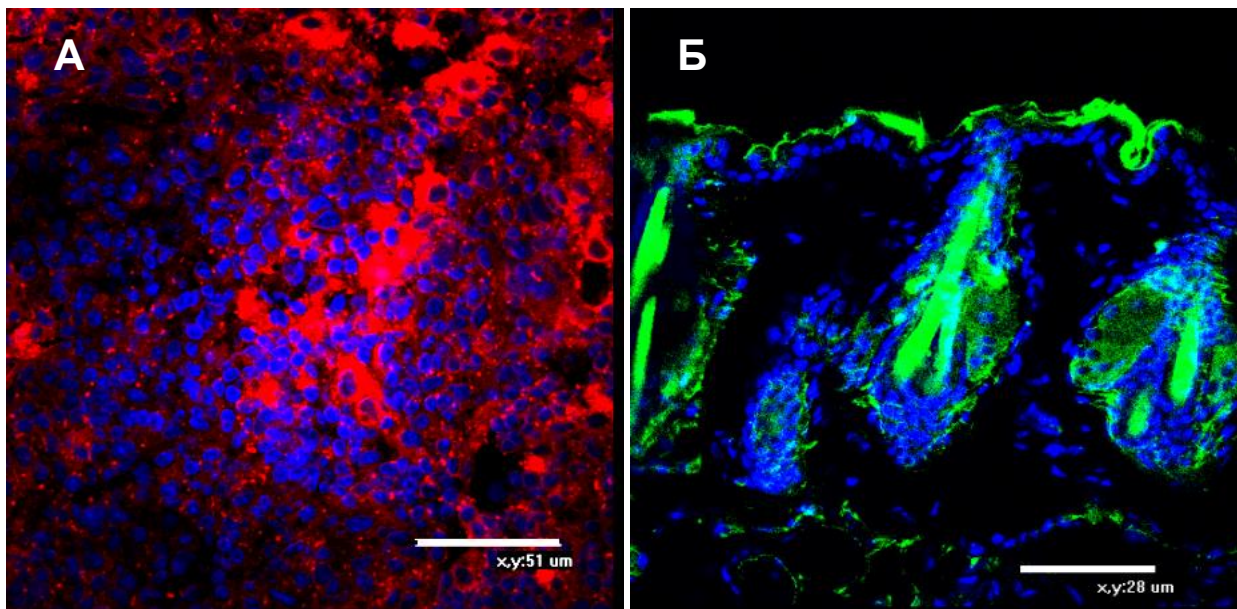


**Рисунок 16. Продукция IgG1 (А) и IgG2a (Б) субклассов антител в мышах, иммунизированных капсулированными аллергенами Asp f 2 и Asp f 3.**

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.

### 13. Транспорт капсулированных аллергенов *in vivo*

Для анализа транспорта капсулированных аллергенов *in vivo* использовали белки Der f 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 17 А приведены изображения криосреза лимфоузла, показывающие наличие антигена в лимфоузле и колокализацию частиц с макрофагами.

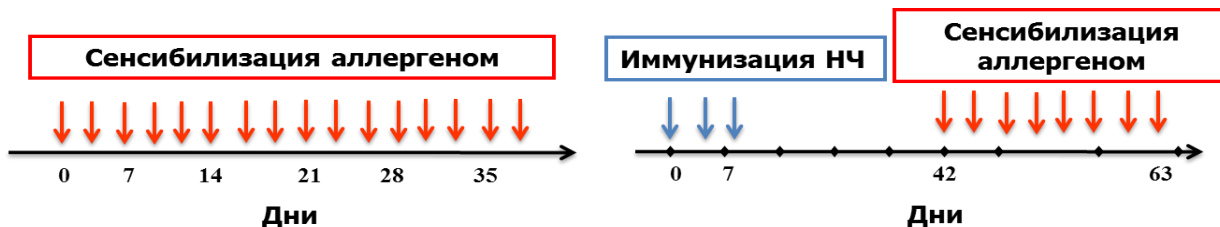


**Рисунок 17. Транспорт капсулированных аллергенов *in vivo*.** А. Криосрез подколенных лимфатических узлов мыши, иммунизированной частицами, несущими белки Der f 2 меченные родамином В (красный цвет). Б. Эффект переноса меченых белков Der f 1 (зеленый) в составе полимерных частиц ЛСХ-альгинат через волосяные фолликулы при трансэпидермальной доставке. Синим цветом окрашены ядра. Шкала 20 мкм.

Для исследования трансэпидермальной доставки частиц 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 17, Б).

#### 14. Индукция аллергии на белки Asp f 2иAsp f 3 у мышей

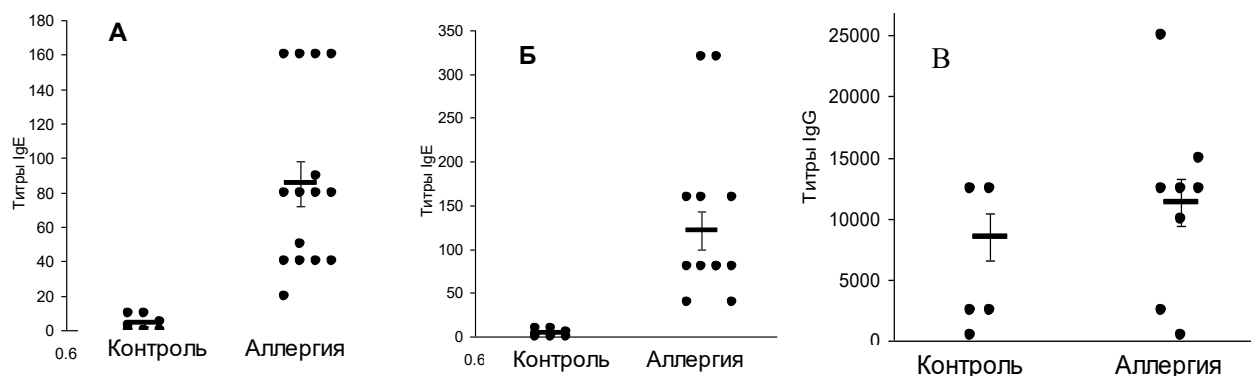
Для индукции аллергии мышам многократно (20-30 раз) в район холки подкожно вводили аллергены в ФБ в дозе 100 нг/мышь/инъекцию до появления IgE антител. Формирование IgE антител определяли ИФА, в котором в качестве подложки использовали свободные белки. После формирования IgE ответа мышей 3 раза иммунизировали капсулированными аллергенами и через месяц после иммунизации проводили дополнительную сенсibilизацию (Рисунок 18). По окончании сенсibilизации забирали сыворотку крови и определяли титры IgG и IgE антител, специфичных к белкам Asp f 2 и Asp f 3.



**Рисунок 18.** Схема индукции IgE к рекомбинантным аллергенам у мышей. Для индукции IgE используется подкожная иммунизация (сенсибилизация) белками в дозе 100 нг/мышь/инъекцию.

После 16 подкожных инъекций смеси белков (1:1) Asp f 2 и Asp f 3 возникала сенсибилизация к аллергенам и сформировался IgE ответ как на Asp f 2, так и на Asp f 3. IgG продукция в группе с индуцированной аллергией была несколько выше, чем в контрольной интактной группе, но достоверного отличия не было ( $p=0.109$ ) (Рисунок 19).

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



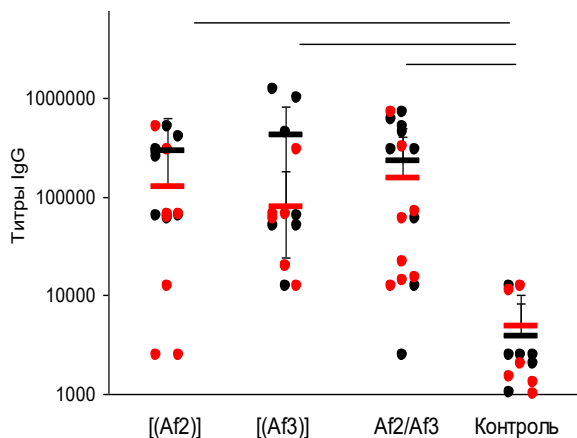
**Рисунок 19.** Продукция IgE мышами в модели низкодозовой аллергии на Asp f 2 (А) и Asp f 3 (Б). В-Продукция мышами IgG к смеси белков Aspf 2/Aspf 3 в модели низкодозовой аллергии после сенсибилизации. Контроль – интактные мыши. Планками приведены средние значения и стандартная ошибка.

### 16. 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 20). 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.

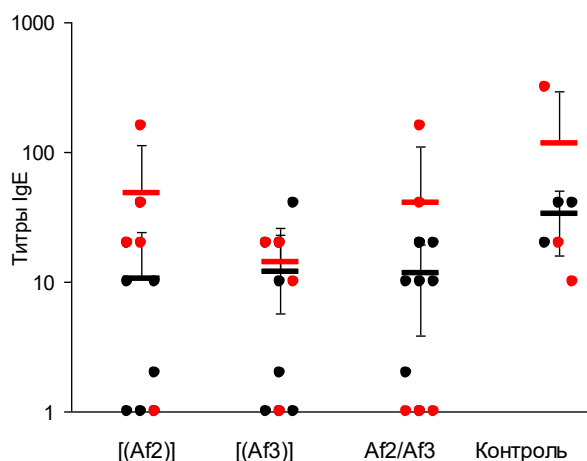


**Рисунок 20.** Продукция IgG у мышей, иммунизированных капсулированными в ЛСХ-альгинат Asp f 2 [(Af2)], Asp f 3 [(Af3)] или смесью белков (Af2/Af3) в гидроокиси алюминия через 2 недели после иммунизации (черные кружки) и через 2 недели после сенсibilизации (красные кружки). Планками отмечена достоверная 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 21), 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 21, черные кружки). Однако после сенсibilизации титры IgE повышались во всех группах, и достоверная разница отсутствовала (Рисунок 21, красные кружки).

Соответственно, АСИТ как свободными, так и капсулированными белками не приводит к элиминации IgE-продуцирующих В-клеток. Аналогичные данные получают в клинических исследованиях, показывающих, что продукция IgE может долгое время сохраняться на прежнем уровне, хотя аллергическая симптоматика снижается.

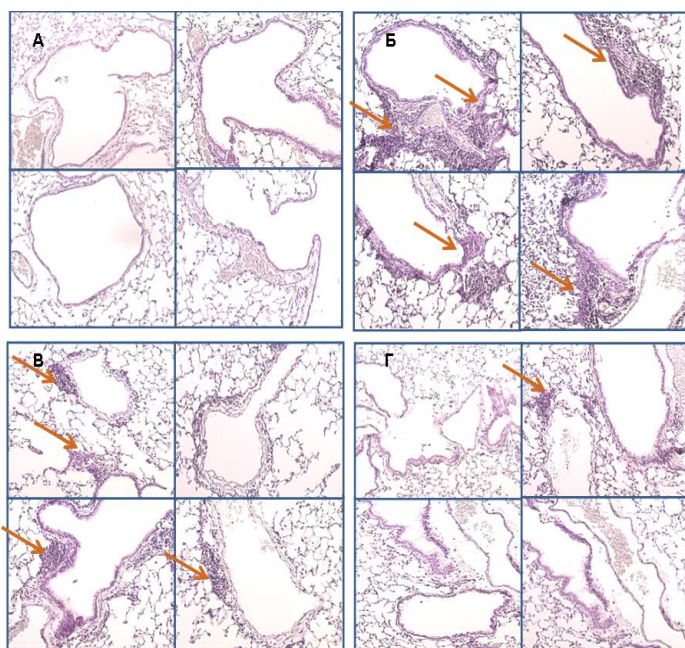


**Рисунок 21.** Продукция аллерген-специфического IgE у мышей, иммунизированных капсулированными в ЛСХ-альгинат Asp f 2 [(Af2)], Asp f 3 [(Af3)] или смесью белков (Af2/Af3) в гидроокиси алюминия через 2 недели после иммунизации (черные кружки) и через 2 недели после сенсibilизации (красные кружки)



## 17. Эффект иммунизации капсулированными аллергенами на системную реакцию

Для анализа системного эффекта проведения АСИТ с помощью полученных частиц использовали модель интраназальной сенсibilизации 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 сенсibilизацию, 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.



**Рисунок 22. Гистология легких мышей.** А - легкие intactных мышей; Б – легкие мышей аллергической группы, не получивших АСИТ; В – легкие мышей, иммун-х белками в гидроокиси алюминия; Г – легкие мышей, иммунизированных капсулированным белком Asp f 2. Стрелками указаны зоны фиброза и бокаловидных клеток. Окраска гематоксилин-эозин.

Показали, что в контрольной аллергической группе наблюдается воспалительная реакция (Рисунок 22, Б), выраженная в повышенной инфильтрации легких лимфоцитами и нейтрофилами, увеличении объема бокаловидных клеток, производящих слизь (показано стрелками).

В результате проведения АСИТ как свободными аллергенами, так и капсулированными белками наблюдали снижение системной легочной реакции (Рисунок 22, 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.

## Выводы

1. Разработан метод получения наночастиц на основе производных хитозана методами самосборки и электроспрея.
2. Методом самосборки в наночастицы лаурилсукциноилхитозана-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.

## Список опубликованных научных работ

1. Каширина Е. И., Решетов П. Д., Алексеева Л. Г., Зубов В. П., Свирщевская Е. В., Иммуногенность белков, капсулированных в полимерные наночастицы на основе хитозана-альгината // Российский иммунологический журнал РАН, 2014, том 8 (17), № 3, 901- 904, 2014.
2. Е.И. Каширина, П.Д. Решетов, Л.Г. Алексеева, С.В. Хлгатын, Д.Ю. Рязанцев, С.В. Гурьянова, В.П. Зубов, Е.В. Свирщевская. Капсулирование аллергенов клещей домашней пыли в наночастицы на основе хитозана и альгината // Российские нанотехнологии, 2015, ТОМ 10, № 7– 8, стр 98-104.
3. Чудаков Д.Б., Рязанцев Д.Ю., Каширина Е.И., Бержец В.М., Свирщевская Е.В. Роль дозы аллергена в индукции у мышей *ige* антител на белки клещей домашней пыли // Иммунология, 2014, Т.35, № 6, стр. 321-328.
4. Каширина Е.И., Савина А.А., Щербинина Т.С. Характеристика иммунного ответа на противоялергенную капсулированную вакцину // Российский иммунологический журнал РАН 2015, том 9 (18) №2 (1), 245-246.
5. Е. Kashirina, P,Reshetov, L. Alekseeva, V. Berzhets, D. Ryazantsev, V. Zubov, D. Chudakov, E. Svirshchetskaya / Encapsulation of allergens into chitosan-alginate nanoparticles prevents IgE binding // J.J. Vaccines Vaccination 2015, 1(3): 012
6. E. Svirshchetskaya G. Fattakhova, S. Khlgatian, D. Chudakov, E. Kashirina, D. Ryazantsev, O. Kotsareva, S. Zavriev. Direct versus sequential immunoglobulin switch in allergy and antiviral responses. Clinical Immunology 170 (2016) 31–38
7. A. Zubareva, B. Shagdarova, V. Varlamov, E. Kashirina, E. Svirshchetskaya. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives // European Polymer Journal 2017; 93, 743-749.

## Участие в конференциях, тезисы докладов:

1. Elena Kashirina, Olga Staroverova, Vitaly Zubov, Anatoly Olkhov, Elena Svirshchetskaya. Formation of chitosan nanogels by electro spray. International Conference on Bio-based Polymers and Composites (BiPoCo) Szeged, Hungary, Aug 28th - Sep 1st, 2016.
2. Kashirina E.I., Shcherbinina T., Alekseeva L.G, Svirshchetskaya E.V. Induction of humoral immune response by allergens capsulated into polymeric chitosan- alginate nanoparticles. EAACI Allergy School Allergen Immunotherapy (AIT) 7 – 9 April 2016 Copenhagen, Denmark.

3. Каширина Е.И., Зубов В.П., Свирщевская Е.В. «Индукция гуморального иммунного ответа с помощью аллергенов, капсулированных в полимерные наночастицы на основе полисахаридов» // XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» - Москва, 2016
4. Kashirina E.I., T. Shcherbinina, Svirshchevskaya E.V. Induction of humoral immune response by allergens capsulated into polymeric chitosan-alginate nanoparticles // EAACI allergy school on allergen immunotherapy – Denmark, 2016
5. Kashirina E.I., Reshetov P.D., Alekseeva L.G., Svirshchevskaya E.V. Immunogenic properties of allergens capsulated into polymeric chitosan-alginate nanoparticles // 13 EAACI Immunology Winter School «Basic immunology research in allergy and clinical immunology» – France, 2015
6. Каширина Е.И., Решетов П.Д., Рязанцев Д.Ю., Алексеева Л.Г., Свирщевская Е.В. Механизм действия капсулированных вакцин для лечения аллергии на клещей домашней пыли // XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» - Москва, 2015.
7. Чудаков Д.Б., Каширина Е.И., Свирщевская Е.В. Уровень Der f 2 специфичных IgG4 и IgE в сыворотках крови больных с аллергией на клещей домашней пыли // XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» - Москва, 2015.
8. Каширина Е.И., Решетов П.Д., Рязанцев Д.Ю., Алексеева Л.Г., Свирщевская Е.В. Безопасные вакцины на основе полимеров с включенными Т- и В-эпитопами аллергенов для лечения аллергии I типа.// Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии - Москва, 2014.
9. Kashirina E.I., Reshetov P.D., Ryazantsev D.Yu., Svirshchevskaya E.V. Hiding allergens into polymeric matrix: safe vaccines for allergen specific immunotherapy // 12 EAACI Immunology Winter School –Romania, 2014
10. Kashirina E.I., Svirshchevskaya E.V., Reshetov P.D., Alekseeva L.G, Ryazantsev D.Yu. Protected allergens caged into polymer nanoparticles based on Chitosan and alginate. Winter Youth Scientific School "Perspective directions of physico-chemical biology and biotechnology" 10-14 February 2014 (In Russian).
11. Reshetov P.D., Alekseeva L.G., Kashirina E.I., Ryazantsev D.Yu., Prokhorov A.V., Berzets V.M., Zubov V.P., Svirshchevskaya E.V. The system for the delivery of antiallergic vaccines based on chitosan-alginate nanoparticles. Kargin's memorial conference, Polymers-2014, 27–31 January 2014.(In Russian).
12. Kashirina E.I., Reshetov P.D., Grynevich R.S., Prokhorov A.V., Ryazantsev D.Yu., Dimitrieva T.V., Berzhets V.M., Svirshchevskaya E.V. Chitosan-alginate core-shell caged vaccines for allergy treatment. International Congress of Immunology, Milan, 2013.