

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

САХАБЕЕВ

Родион Григорьевич

**«Свойства полимерных биосовместимых микро- и наночастиц на основе
полимолочной кислоты и рецепторных белков, связывающих вирусы»**

03.01.04 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Шавловский Михаил Михайлович

Санкт-Петербург

2021 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Использование лиганд-рецепторных взаимодействий в терапии вирусных инфекций.....	14
1.2 Взаимодействие вируса гепатита С с клеткой.....	15
1.3 Ловушки для вируса гепатита С на основе полимерных частиц.....	17
1.4 Возможные области медицинского применения микрогранулированного материала.....	21
1.5 Используемые в настоящее время разновидности частиц.....	24
1.6 Преимущества применения полимерных микро- и наночастиц в медицине.....	28
1.7 Иммуногенность антигенов, адсорбированных на носителях разных размеров.....	29
1.8 Микрогранулы на основе полимолочной кислоты. Преимущества и недостатки.....	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1 Синтез, выделение и очистка рекомбинантных белков на примере химерного белка β 2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком.....	39
2.2 Получение частиц на основе полимолочной кислоты и сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем диаметром 100 нм.....	39
2.3 Получение частиц на основе полимолочной кислоты диаметром 1400 нм.....	40
2.4 Ковалентное связывание белка с частицами.....	42
2.5 Исследование полученного конъюгата частиц и рекомбинантного модельного белка β 2M-sfGFP при помощи конфокальной микроскопии ...	42
2.6 Измерение концентрации белка.....	43
2.7 Иммунизация и получение сыворотки крови мышей.....	43

2.8 Иммуноферментный анализ.....	43
2.9 Выделение и криоконсервация спленоцитов мыши.....	44
2.10 Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов	45
2.11 Статистическая обработка данных.....	45
2.12 Создание экспрессионной генетической конструкции белка слияния CD81 со стрептавидином для синтеза в <i>E.coli</i>	46
2.12.1 Подготовка исходной конструкции к клонированию	46
2.12.2 Получение нуклеотидной последовательности CD81	47
2.12.3 Встраивание нуклеотидной последовательности CD81 в плазмиду pET SAA 2-7	48
2.12.4 Отбор колоний, содержащих плазмиды со вставкой гена CD81	48
2.12.5 Секвенирование pET SAA 2-7-CD81	48
2.12.6 Получение штамма <i>E.coli</i> BL21(DE3)/pET SAA 2-7-CD81	48
2.12.7 Культивирование штамма <i>E.coli</i> BL21(DE3)/pET SAA 2-7-CD81..	49
2.12.8 Выделение белка слияния CD81-SAA из растворимой клеточной фракции <i>E.coli</i> BL21(DE3)/pET SAA 2-7-CD81	49
2.12.9 Выделение белка слияния CD81-SAA из телец включения <i>E.coli</i> BL21(DE3)/pET SAA 2-7	50
2.13 MALDI-TOF масс-спектрометрия.....	50
2.14 Триптический гидролиз в геле.....	50
2.15 Получение белка слияния оболочечного белка E2 core вируса гепатита С с зелёным флуоресцентным белком sfGFP.....	51
2.16 Создание ловушек для вирусов на основе полимерных частиц	51
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	55
3.1 Выбор модельного белка.....	55
3.2 Связывание микро- и наночастиц с выбранным модельным белком β 2M-sfGFP.....	56
3.3 Микроскопия частиц, имеющих на своей поверхности β 2M-sfGFP	57

3.4 Изучение иммуногенности белка β 2M-sfGFP, иммобилизованного на поверхности полимерных частиц	62
3.5 Гуморальный иммунный ответ	64
3.5.1 Гуморальный иммунный ответ после первой иммунизации	65
3.5.2 Гуморальный иммунный ответ после второй иммунизации.....	71
3.5.3 Гуморальный иммунный ответ после третьей иммунизации	76
3.5.4 Гуморальный иммунный ответ после четвертой иммунизации	81
3.5.5 Оценка относительного содержания специфических антител после введения антигена, находящегося на поверхности микро- и наночастиц на основе ПМК и сополимера ПМК-ПЭГ во всех 4 иммунизациях.....	86
3.6 Клеточный иммунный ответ	88
3.6.1 Оценка относительного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток в группах, которые были иммунизированы частицами ПМК-ПЭГ 100 нм.	90
3.6.2 Оценка относительного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток в группах, которые были иммунизированы частицами ПМК 1400 нм	92
3.7 Заключение по клеточному и гуморальному иммунному ответу.....	93
3.8 Получение белка слияния CD81-SAA	96
3.9 Результаты масс-спектрометрии CD81-SAA	99
3.10 Получение белка слияния оболочечного белка E2 core вируса гепатита С с зеленым флуоресцентным белком sfGFP.....	101
3.11 Результаты масс-спектрометрии E2-sfGFP	106
3.12 Связывание флуоресцентно меченного вирусного белка E2-sfGFP с рецептором CD81, конъюгированным на частицах	108
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген

АПК – антиген-презентирующие клетки

ВГС - вирус гепатита С

ДК - дендритные клетки

ЛСМ - лазерная сканирующая микроскопия

ПААГ - полиакриламидный гель

ПМК - полимолочная кислота

ПМК-ПЭГ - сополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля

CD81-SAA - рекомбинантный слитый белок CD81 человека со стрептавидином

Cy3 – цианиновый краситель Cy3

E2-sfGFP - рекомбинантный оболочечный слитый белок вируса гепатита С E2 с зеленым флуоресцентным белком Superfolder

HBsAg – рекомбинантный антиген вируса гепатита В

IFN γ – интерферон-гамма

IPTG - изопрропил- β -D-тиогактопиранозид

LELCD81- большая экстраклеточная петля CD81 человека

PBS - физиологический буферный раствор (0,15 М NaCl, 25 мМ Na-фосфат, рН 7,4)

PLAMP - микрочастицы из полимолочной кислоты

SDS - додецилсульфат натрия

sfGFP-зеленый флуоресцентный белок Superfolder

TTR-sfGFP - рекомбинантный слитый белок транстиретин человека с зеленым флуоресцентным белком Superfolder

β 2M-sfGFP - рекомбинантный слитый белок бета2-микроглобулин человека с зеленым флуоресцентным белком Superfolder

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень научной разработанности темы исследования. Вирусные заболевания являются наиболее распространенной в настоящее время группой инфекционных болезней, обладающих огромной социальной значимостью, и борьба с ними является важной задачей. Ежегодно появляются всё новые вирусы, которые наносят большой вред человечеству, такие как вирусы гриппа, гепатит С, вирус иммунодефицита человека, Covid-19. Наиболее эффективным средством сдерживания распространения вирусных инфекций является вакцинация, в том числе с применением полимерных микро- и наночастиц [1]. Однако разработка новых подходов к созданию средств, направленных на снижение вирусной нагрузки, также не теряет своей актуальности.

Известно, что вирусные инфекции связаны с внедрением вирионов в клетки хозяина посредством рецептор-опосредованного механизма. Так, первым этапом внедрения вируса гепатита С в клетку является взаимодействие оболочечного белка вируса E2 с большой экстраклеточной петлей клеточного рецептора CD81 [2]. Вирус иммунодефицита человека проникает в клетку посредством связывания белка оболочки gp120 с клеточным рецептором CD4 [3]. Вирус бешенства аналогичным образом взаимодействует с клеточным белком DYNLL1 посредством белка Р [4]. Вирус Covid-19 внедряется в клетки, используя мембранные рецепторы CD147 и ангиотензинпревращающий фермент [5].

Рецепторы, как правило, характеризуются выраженной видовой и тканевой специфичностью, поэтому наружные белки вируса, ответственные за связывание с рецептором, в ходе эволюции не теряют способности взаимодействовать с рецепторами. В связи с этим свободные рецепторы могут быть использованы для блокирования вирусных частиц. Эта рецепторная избирательность может служить основой для создания лекарственных средств, способных связывать вирусные частицы и

блокировать их распространение в организме. Для этого предполагается получить биodeградебельные полимерные частицы (сферические микро- и наночастицы) с фиксированными размерами, модифицированные фрагментами вирусных рецепторов клеток хозяина. Кровоток может способствовать связыванию циркулирующего вируса и направлению в макрофаги с последующей деградацией. Деградация в макрофагах, по нашему мнению, может способствовать выработке специфических антител. При этом использование таких частиц не зависит от антигенного типа вируса. Таким образом, изменение антигенного типа вируса в ходе инфекции не будет препятствовать применению частиц с одним и тем же рецептором

Настоящая работа направлена на создание «ловушек» для вирусов, в частности, для терапии гепатита С. Конструирование подобных «ловушек» представляется возможным за счет ковалентной иммобилизации на поверхности нано- или микрочастиц из полимолочной кислоты рекомбинантного CD81 – рецептора, который способен связываться с E2-белком вируса гепатита С [2]. Предполагается, что полученные конъюгаты белок-частица будут способны к специфическому необратимому связыванию с вирионами с последующим их поглощением клетками иммунной системы организма. Значительный интерес представляет выяснение влияния частиц на основе полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка.

Целью исследования являлось создание ловушек для вируса гепатита С на основе частиц из полимолочной кислоты и фрагмента рецептора CD81 человека, а также оценка влияния полимерных частиц различного состава и размера на иммунные свойства связанных с ними белков.

Задачи:

1. Создать генетические конструкции и получить в очищенном виде рекомбинантные белки: фрагмент оболочечного белка E2 вируса гепатита С и фрагмент рецептора CD81 человека, который способствует проникновению вируса гепатита С в клетку.

2. Изучить связывание фрагмента рецептора CD81 человека, иммобилизованного на полимерных микрочастицах, с фрагментом оболочечного белка E2 вируса гепатита С.
3. Получить комплексы частиц с модельными белками (с зеленым флуоресцентным белком, с белком слияния бета2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком и белком слияния трансиретина человека с зеленым флуоресцентным белком). Изучить условия иммобилизации белков на поверхности частиц разного состава и размера.
4. В экспериментах на мышах оценить иммуногенность конъюгатов полученных частиц полимолочной кислоты разного состава и размера с модельным белком. Изучить гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей на полученные конъюгаты.

Научная новизна. В работе впервые получены комплексы частиц полимолочной кислоты разного состава и размера с модельным белком слияния β 2-микроглобулином человека и зеленым флуоресцентным белком sfGFP (β 2M-sfGFP), позволяющим проводить визуализацию частиц. Установлено, что для эффективного связывания зеленого флуоресцентного белка с частицами необходимы спейсерные последовательности.

Впервые получены комплексы микрочастиц полимолочной кислоты, содержащих на своей поверхности рекомбинантный фрагмент большой экстраклеточной петли рецептора CD81 человека.

Показано, что такие частицы способны связывать флуоресцентно меченый фрагмент оболочечного белка E2 вируса гепатита С (E2-sfGFP). Образовавшиеся комплексы хорошо визуализируются с помощью флуоресцентной микроскопии.

Впервые комплексно изучен гуморальный и клеточный иммунный ответ на антиген, который ковалентно связан с полимерными частицами на основе ПМК и сополимера ПМК-ПЭГ, различающихся по размерам.

Установлено, что размер частиц влияет на уровень гуморального и клеточного иммунного ответа.

Научная и практическая значимость работы. Полученные результаты показывают, что надмолекулярные комплексы, созданные на базе микрочастиц полимолочной кислоты, содержащие на своей поверхности специфические рецепторные белки, могут улавливать вирусные частицы путем взаимодействия с оболочечными белками вируса.

Связывание полимерных микрочастиц с маркерным зеленым флуоресцентным белком sfGFP, а также включение флуоресцентного белка в структуру капсидного вирусного белка позволяет проводить надежную визуализацию взаимодействия микрочастиц и вируса гепатита С.

Созданная конструкция в перспективе может быть использована для увеличения чувствительности диагностических тестов на вирусный гепатит С за счет концентрирования вирусных частиц из исследуемых образцов биологических жидкостей.

В перспективе также можно рассматривать применение подобных сорбентов вирусных частиц для нейтрализации вирусов в кровотоке с целью снижения вирусной нагрузки. Однако это направление требует дальнейших исследований. Кроме того, использованный в работе подход к созданию полимерных частиц, содержащих элементы рецепторных структур, может быть развит для создания «ловушек» для других вирусов при условии использования специфических оболочечных белков.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Полученные частицы из полимолочной кислоты, модифицированные рекомбинантными фрагментами рецептора CD81 человека, способны связывать лиганд — фрагмент оболочечного белка E2 вируса гепатита С. Свойства таких частиц позволяют предлагать их в качестве ловушек для вируса.

2. Для эффективного взаимодействия полученного флуоресцентно меченного фрагмента оболочечного белка E2 вируса гепатита С с модифицированными микрочастицами необходима его ренатурация из телец включения при помощи ступенчатого диализа.
3. Показано, что модельный белок слияния бета2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком наиболее эффективно связывается со всеми типами полимерных частиц (по сравнению с зеленым флуоресцентным белком и белком слияния транстиретина человека с зеленым флуоресцентным белком). Для эффективного связывания необходимы спейсеры.
4. Установлено, что при внутрибрюшинном введении конъюгированные частицы на основе полимолочной кислоты и сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля с размерами 100 и 1400 нм с модельным зелёным белком вызывают менее выраженный гуморальный иммунный ответ по сравнению со смесью этих же типов частиц с несорбированным на их поверхности модельным белком. Гуморальный иммунный ответ на вводимый антиген зависит от размеров частиц: частицы с диаметром 1400 нм менее эффективны, чем частицы с диаметром 100 нм. Состав частиц (полимолочная кислота, сополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля), в отличие от их размеров, не влияет на выраженность гуморального иммунного ответа.
5. Установлено, что число CD4-позитивных Т-хелперов и число CD8-позитивных цитотоксических Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон гамма, после внутрибрюшинного введения конъюгированных с модельным белком частиц значительно выше, чем после введения смеси частиц со свободным белком.

Степень достоверности результатов. Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным и репрезентативным объемом выборок экспериментальных животных, достаточным количеством

выполненных наблюдений с использованием широкого спектра современных методов исследования, и подтверждена адекватными методами статистической обработки данных. Методы статистической обработки полученных результатов адекватны поставленным задачам. Выводы и основные положения, сформулированные в работе, находятся в полном соответствии с существом выявленных и описываемых автором явлений и процессов.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Соискателем были проведены анализ современной отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение всех экспериментов, выделение и очистка белков, используемых в работе, приготовление препаратов для флуоресцентного анализа, работа с животными, обработка всех полученных данных (в том числе статистический анализ данных), написание статей и подготовка докладов на конференциях. Автором самостоятельно проведен анализ и интерпретация результатов работы, формулирование выводов.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на всероссийских и международных конференциях.

1. IV Научно-техническая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых СПбГТИ (ТУ), 2014 г. *Всероссийская конференция.*
2. Научно-практическая конференция 1-6 декабря 2014 г, СПбГПУ. *Международная конференция.*
3. XVIII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей, посвященная двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ, 2015 г. *Международная конференция.*
4. VI Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», г. Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2016 года. *Международная конференция.*

5. LXXVIII научно–практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины», Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, 2017 г. *Международная конференция.*
6. VI Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии», г. Санкт-Петербург, 20-23 июня 2017 г. *Международная конференция.*
7. Всероссийская научно-практическая конференция, посвящённая 95-летию со дня рождения члена-корреспондента РАМН Б.Ф. Коровкина «Лабораторная диагностика – клинической медицине: традиции и новации», 4-5 декабря 2018 г. *Международная конференция.*
8. IV междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике «МОБИ-ХимФарма 2018», Крым, 23-26 сентября 2018 г. *Международная конференция.*
9. V Российский конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное». Санкт-Петербург, 26–29 марта 2020 г. *Международная конференция.*

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из которых 3 статьи – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ (из них 2 – в журналах, индексируемых в базе данных Scopus), 1 заявка на изобретение и 13 публикаций в материалах научных конференций, симпозиумов и т.п.

Результаты диссертации включены в отчеты о выполнении фундаментальных научных исследований в рамках государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» по темам 0557-2016-0011 и 0557-2019-0009. Исследования неоднократно поддерживались грантами Правительства Санкт-Петербурга для студентов, аспирантов, молодых ученых и молодых кандидатов наук (2014, 2016, 2018 гг.) и Программой поддержки талантливой молодежи У.М.Н.И.К. (2015).

Структура и объем диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», включающий 161 иностранных и 3 отечественных источников. Диссертация изложена на 131 стр. Результаты представлены в 20 таблицах и иллюстрированы 33 рисунками.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Использование лиганд-рецепторных взаимодействий в терапии вирусных инфекций

Комплексная терапия вирусных инфекций в качестве одного из подходов предполагает снижение концентрации вируса в крови больного во время виремии, развивающейся в остром периоде заболеваний. Для ряда хронических вирусных инфекций, таких, например, как инфекционный гепатит С или СПИД, виремия является неотъемлемым компонентом обострения заболевания. При этих инфекциях повышение концентрации вирусных частиц в крови сопровождается появлением генетически измененных вирионов с новой антигенной специфичностью. Иммунный ответ, как показывает практика, не всегда успевает за модификацией антигенной структуры вируса. Использование экзогенных антител или препаратов на их основе при этом часто не обладает достаточной терапевтической эффективностью, поэтому необходимо разрабатывать новые подходы для уменьшения виремии с использованием неспецифических в отношении антигенных вариантов соединений.

Известно, что вирусные инфекции связаны с внедрением вирионов в клетки хозяина посредством рецептор-опосредованного механизма. Так, например, для вируса гепатита С было показано, что первым этапом внедрения ВГС в клетку является взаимодействие оболочечного белка вируса Е2 с большой экстраклеточной петлей клеточного рецептора CD81 [2]. Вирус иммунодефицита человека проникает в клетку посредством связывания белка оболочки gp120 с клеточным рецептором CD4 [3]. Вирус Эпштейна-Барра взаимодействует с рецептором CD21 В-лимфоцитов при помощи мембранного гликопротеида gp350/220. В первую очередь вирусом инфицируются В-лимфоциты, которые обладают высоким уровнем продукции CD21 [6]. Процесс внедрения в клетку вируса простого герпеса 1-го типа носит аналогичный характер. Так, белок вируса gD взаимодействует

с рецептором клетки, после чего происходит конформационное изменение белка gD, что приводит к активации других вирусных рецепторов для полного слияния вируса с клеткой [7]. Вирус лихорадки Западного Нила связывается с клеточным рецептором $\alpha V\beta 3$ интегрином при помощи III домена белка оболочки E [8]. Также в пример можно привести вирус бешенства, который аналогичным образом взаимодействует с клеточным белком DYNLL1 посредством белка P [4]. Вирус Covid-19 внедряется в клетки, используя мембранные рецепторы CD147 и ангиотензинпревращающий фермент [5].

Как указывалось выше, первым этапом в жизнедеятельности вируса является его проникновение в клетку-хозяина. Настоящая работа направлена на создание «ловушек» для вирусов, в частности, для терапии гепатита С. Конструирование подобных «ловушек» происходит за счет ковалентной иммобилизации на поверхности микро- или наночастиц на основе поли(молочной кислоты) рекомбинантного CD81 – рецептора, который способен связываться с E2-белком вируса гепатита С [2]. Предполагается, что полученные конъюгаты белок-частица будут способны к специфическому необратимому связыванию с вирионами с последующим поглощением клетками иммунной системы организма. Конечной целью этих исследований является создание корпускулярных микро- и наноловушек, способных избирательно сорбировать вирусы и обеспечивающих транспорт микроорганизмов в клетки ретикулоэндотелиальной системы. В первую очередь речь идет об извлечении вирусов из кровотока при вирусемиях, что может являться частью комплексной противовирусной терапии.

1.2 Взаимодействие вируса гепатита С с клеткой

Вирус гепатита С (ВГС) относится к положительно направленным одноцепочечным РНК-вирусам рода *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae* [9]. РНК вируса кодирует полипротеин, который подвергается протеолитическому процессингу под действием сигнальных протеаз клетки-

хозяина и протеаз самого вируса на три структурных и шесть неструктурных белков. Вследствие высокой вероятности ошибок РНК-полимеразной реакции ВГС демонстрирует большое генетическое разнообразие и резистентность к лекарственным средствам. Существует 6 основных генотипов ВГС (нумерованные от 1 до 6), которые отличаются более чем на 30% в нуклеотидной последовательности друг от друга [10].

Вирусный нуклеокапсид окружен бислойной фосфолипидной оболочкой с гликопротеинами E1 и E2, которые играют ключевую роль в проникновении вируса в клетку посредством связывания с клеточным рецептором. Гликопротеины E1/E2 представляют собой трансмембранные гликопротеины I типа, которые могут образовывать нековалентные гетеродимеры внутри инфицированных клеток или крупные ковалентно связанные комплексы на вирусной частице. Они включают большой N-концевой эктодомен и короткий C-терминальный трансмембранный домен [11].

Хроническая инфекция ВГС может прогрессировать до тяжелой болезни печени, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному [12]. Современные методы лечения ВГС стали более эффективными благодаря комбинированному применению ингибиторов интерферона, рибавирин и ингибиторов вирусных протеаз. Оптимальные терапевтические схемы лечения должны иметь высокую противовирусную эффективность и обладать меньшей токсичностью. В жизненный цикл ВГС входят прикрепление вируса к клеточной поверхности, вхождение, слияние, трансляция вирусной РНК, посттрансляционная обработка, репликация, сборка и высвобождение вируса [13]. Каждая из этих стадий является потенциальными мишенью для новых противовирусных терапевтических средств.

Было установлено, что на первом этапе взаимодействия ВГС с клеткой происходит связывание оболочечного вирусного белка E2 с клеточным рецептором CD81.

Человеческий CD81 представляет собой тетраспанин, который локализуется на поверхности В-лимфоцитов и гепатоцитов, образуя ко-рецепторный комплекс с CD19 и CD21. Также CD81 взаимодействует с другими тетраспанинами, образуя тетраспаниновую сеть, участвует в различных клеточных функциях, включая адгезию, пролиферацию и дифференцировку [14]. CD81 включает 4 трансмембранных домена, 2 коротких внутриклеточных домена и 2 внеклеточных домена (малый и большой). CD81, вероятно, участвует в процессе взаимодействия ВГС с клеткой после очень ранней фазы заражения вирусом, способствуя конформационному изменению в гликопротеине оболочки E1/E2 ВГС [15]. Было установлено, что CD81 связывается с гликопротеином E2 при помощи своей большой экстраклеточной петли (LEL). Последовательность большой экстраклеточной петли CD81 очень схожа у людей и шимпанзе, которые являются единственными видами, способными к заражению ВГС *in vivo* [16–18].

1.3 Ловушки для вируса гепатита С на основе полимерных частиц

За последние два десятилетия системы доставки лекарственных веществ на основе микро- и наночастиц в органы и ткани стали широко применяться в области биологии и медицины. Биоразлагаемые полимерные частицы, несущие пептидные или белковые антигены, имеют множество преимуществ, включая устойчивую доставку антигенов в течение длительных периодов времени, возможность снижения количества инъекций и пассивного или активного нацеливания на антигенпрезентирующие клетки посредством неспецифического или рецептор-опосредованного фагоцитоза, соответственно. Существует множество полимеров, из которых могут быть получены микро- и наночастицы для доставки лекарств [19]. Однако одним из наиболее часто изучаемых полимеров является ПМК [20]. Этот полимерный биоразлагаемый и биосовместимый материал прошел сертификацию для применения в медицинских целях [21,22]. Частицы из

ПМК были изучены для возможности их применения в качестве основы для создания лекарственных препаратов, а именно переноса белков, пептидов, ДНК [23]. Имеется большое количество исследований, демонстрирующих преимущества использования полимерных частиц для доставки различных антигенов [24–26]. Эти частицы имеют способность разлагаться с разной скоростью и могут действовать как депо, из которого постепенно высвобождается нагруженный антиген или лиганд.

Первоначальная цель использования частиц из ПМК для доставки антигена была вызвана желанием уменьшить количество повторных введений лекарства, необходимого для длительной терапии, путем высвобождения антигена [27,28]. Другим важным преимуществом было снижение затрат на массовую вакцинацию. Большинство вакцин приводят к выработке плазматическими клетками специфических антител, которые способны связываться с токсином или патогеном. Это называется гуморальным иммунитетом [29]. В то время как специфические антитела способны нейтрализовать внеклеточные патогены, специфический клеточный иммунный ответ также является важнейшим механизмом борьбы с внутриклеточными патогенами после инфекции. Клеточный иммунный ответ может ограничивать распространение инфекционных агентов путем распознавания и уничтожения инфицированных клеток или опухолевых клеток. Частицы из ПМК эффективно фагоцитируются антигенпрезентирующими клетками *in vitro* и *in vivo* [30], поэтому много исследований было посвящено изучению их поглощения дендритными клетками и макрофагами. Было показано, что многие антигены, инкапсулированные или адсорбированные на частицах из ПМК, вызывают широкий и мощный гуморальный иммунный ответ [31–33]. Большинство опубликованных доклинических исследований посвящены столбнячному анатоксину (СТ) или ориентированы на более модельные антигены, такие как овалбумин (ОВА) и бычий сывороточный альбумин (БСА) [34,35]. Эти

данные демонстрируют высокий потенциал полимерных микрочастиц для их использования в качестве носителя-адъюванта для вакцин.

Препараты частиц оказались очень подходящими для большого числа антигенов, полученных из различных источников и имеющих очень разные структурные особенности. Помимо индукции сильных и функциональных гуморальных иммунных ответов, частицы из ПМК представляют особый интерес для высвобождения антигенов в течение продолжительных периодов времени и, таким образом, для обеспечения длительной стимуляции иммунной системы.

Также полимерные частицы из ПМК могут связываться с белками на своей поверхности при помощи химической ковалентной связи [36]. Это легло в основу идеи по созданию «ловушек» вирусных частиц. Создание подобных «ловушек» происходит за счет ковалентной иммобилизации на поверхности микро- или наночастиц на основе ПМК рекомбинантного рецептора, специфического для данного вируса. Предполагается, что полученные конъюгаты белок-частица будут способны к связыванию с вирионами, с последующим поглощением клетками иммунной системы организма. Значительный интерес с точки зрения иммунологии представляет выяснение влияния частиц на основе ПМК на иммуногенность связанного с ними белка. Конечной целью этих исследований является создание корпускулярных микро- или наноловушек, способных избирательно сорбировать вирусы и обеспечивать транспорт микроорганизмов в клетки ретикулоэндотелиальной системы.

В первую очередь речь идет об извлечении вирусов из кровотока при вирусемиях, что может являться частью комплексной противовирусной терапии. Работ, где описывается влияние полимерных частиц разных размеров на основе ПМК или ПМК-ПЭГ на иммуногенность иммобилизованного на их поверхности белка, крайне мало.

Для многих вирусов специфические рецепторы хозяина хорошо известны. Так, например, вирус гепатита С проникает в клетки, в частности в гепатоциты, используя мембранный рецептор CD81. Таким образом, аналоги этого рецептора могут служить в качестве соединения, антигенно неспецифично связывающего вирусные частицы. Использование растворимых аналогов CD81, скорее всего, малоэффективно, так как растворимые белковые молекулы быстро элиминируются из кровотока и могут не полностью блокировать вирусные частицы даже в случае их связывания с поверхностным вирусным лигандом. Таким поверхностным лигандом для рецептора CD81 является E2 – поверхностный белок вируса гепатита С, поэтому мы предлагаем создание антивирусного препарата на основе микрогранулированных биосовместимых и биodeградируемых сорбентов, модифицированных рекомбинантным аналогом CD81 (рисунок 1).

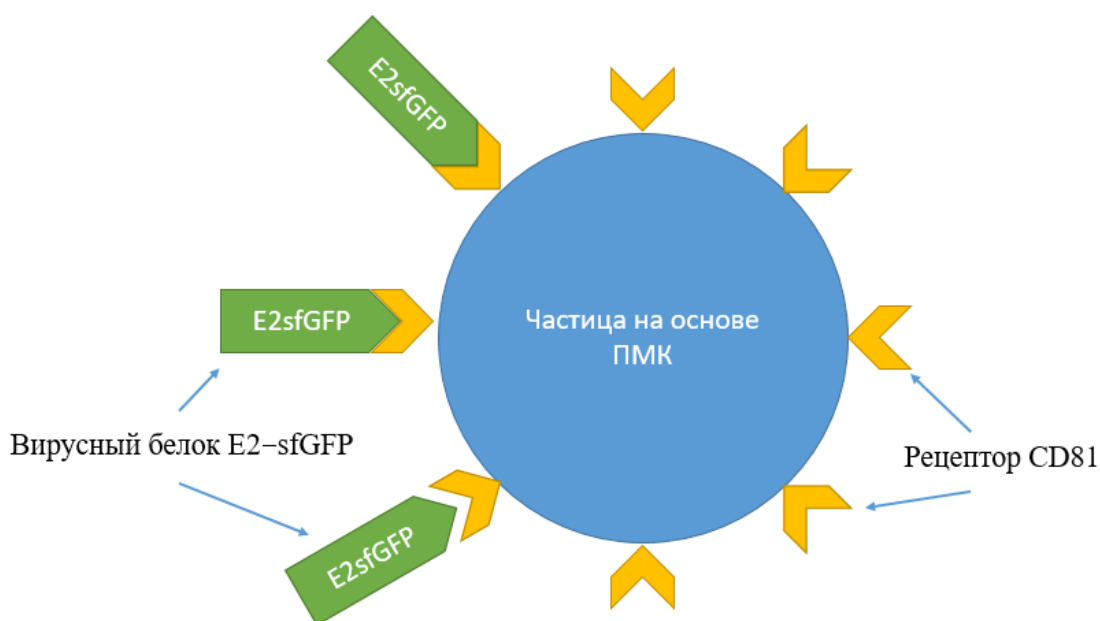


Рисунок 1. Ловушка на основе полимолочной кислоты для вируса гепатита С.

Одним из возможных преимуществ гранулированных сорбентов вирусных частиц, на наш взгляд, является способность таких сорбентов подвергаться ускоренному фагоцитозу. При этом нагруженные вирусными частицами гранулы сорбента, попадая в клетки ретикулоэндотелиальной

системы, в частности в макрофаги, должны вызывать быстрый иммунный ответ. В свою очередь образование антител к генетическим вариантам вирусных белков должно способствовать дополнительному обезвреживанию циркулирующих вирусов. В конечном итоге данный подход может эффективно предотвращать заражение новых клеток поступающими в кровотоки вирусными частицами. Таким образом, предполагается, что использование рецепторного механизма элиминации вируса может служить дополнительным инструментом для терапии гепатита С, а также и других острых и хронических вирусных инфекций.

Для создания вирус-специфичных сорбентов было решено использовать микро- и наночастицы из полимолочной кислоты, которые способны гидролизоваться в организме под воздействием эстераз.

1.4 Возможные области медицинского применения микрогранулированного материала

В последнее десятилетие нанотехнологии и получаемые на их основе наноматериалы находят все более широкое применение в биологии и медицине. Использование нанотехнологий сводится к трем основным направлениям: диагностика социально значимых заболеваний; направленная доставка молекул лекарственных веществ; создание новых наноматериалов медицинского назначения с заданными свойствами. Это потенциально может стать настоящим прорывом в плане улучшения медицинского обслуживания [37]. Методы и подходы наномедицины позволяют решать многие медицинские проблемы на молекулярном и макромолекулярном уровнях с повышением эффективности лечения [38].

Ключевым направлением в наномедицине является разработка биоматериалов и биогибридных материалов, осуществляемая путём внедрения биологических объектов (например, пептидов, белков) в искусственно созданные контейнеры. Этот подход позволяет получать направленно сформированные препараты, предназначенные для

использования в различных областях биомедицины и наномедицины, в том числе, для доставки лекарственных средств, генов и клеток, создания материалов для регенерации живых тканей, диагностики и биовизуализации.

Один из современных методов доставки лекарств заключается в том, что живые клетки используются в качестве переносчиков лекарственных средств. Впервые эта идея была реализована для опосредованной доставки лекарств клетками на основе Т-лимфоцитов. Подобные системы получили название «фармациты» [39,40]. Появление клеточной доставки лекарств с использованием эритроцитов, бактерий, лимфоцитов, стволовых клеток и т.д. открыло новый рубеж в наномедицине [41–44].

Традиционно биоматериалы для доставки лекарств должны удовлетворять определенному числу требований, в частности, быть биосовместимыми, биodeградируемыми, обладать способностью к химической функционализации, распознаванию и связыванию со специфической молекулярной мишенью в организме человека. Биогибридные материалы, в свою очередь, обладают всеми преимуществами живых клеток, а именно характеризуются собственными механизмами доставки, длительным периодом распада, разнообразием поверхностных лигандов, гибкой морфологией и клеточной сигнальной системой. Они способны предложить исключительную возможность увеличения терапевтической эффективности и минимизации неблагоприятных и неспецифических эффектов. Таким образом, технология биогбридов имеет широкие возможности и перспективы для дальнейшего развития.

К настоящему моменту приложены значительные усилия для понимания ключевых особенностей клеточно-опосредованных систем доставки лекарств, таких как естественные клеточные тропизмы, самомаркировка, механизмы клеточного и тканевого включения, свойства

антигенных компонентов [45,46]. Несмотря на заметный прогресс в этой области, прямое включение биологических компонентов в синтетические материалы недостаточно изучено. Более того, даже учитывая все прорывные достижения последних лет, например, в области создания светочувствительных систем или биомембран, функциональная эффективность таких биогбридов остается ниже, чем у исходных биологических систем [47]. В связи с этим, всестороннее изучение особенностей взаимодействия биоматериалов и биогбридных систем с живыми организмами представляет собой актуальную задачу.

Наиболее широкое применение в данный момент получили наночастицы. Наночастицами обычно считаются образования из атомов или молекул с размерами менее 100 нм, микрочастицами – образования до 5000 нм. В настоящее время получение «контейнеров» на основе различных наночастиц для инкапсулирования лекарственных веществ является одной из перспективных областей, привлекающей большое внимание исследователей во всем мире. Использование «контейнеров» обеспечивает пролонгированное высвобождение лекарственного вещества в организме пациента, позволяет снизить отрицательное влияние побочных явлений вследствие избыточных изначальных концентраций с сохранением желаемого терапевтического эффекта, что особенно важно при использовании ряда сильнодействующих препаратов, таких как стероиды, гормоны, противораковые препараты, антибиотики. Процесс выделения препарата в органы или ткани мишени обеспечивается постепенным высвобождением целевого вещества из «наноконтейнера». При этом адресная доставка «контейнера» в больной орган или ткань должна достигаться за счёт наличия на его поверхности специальных биологических молекул, называемых «векторами». Данные технологии применяются во многих отраслях медицины и биологии, в частности для лечения рака [48,49], генной терапии наследственных заболеваний [50],

регенеративной медицины [51], доставки лекарственных средств, визуализации органов и тканей [49], а также для создания биосенсоров [52]. Эти нанотехнологии могут использоваться для совместной доставки визуализирующих агентов и лекарств, биомолекул или генов, сочетая в себе диагностику и терапию в единой системе [53].

1.5 Используемые в настоящее время разновидности частиц

Успешное применение нанотехнологий в медицине ускорило открытие и проектирование новых наноразмерных систем с различным составом. В состав микро- и наночастиц могут входить различные компоненты, например, полимеры, липиды, металлические или неорганические соединения. Самыми широко используемыми системами доставки лекарственных веществ в настоящее время являются: мицеллы, липосомы, дендримеры, углеродные нанотрубки, фуллерены, наночастицы золота или других металлов [54], а также наногранулы на основе различных органических полимеров.

Фармацевтические препараты с внутриклеточным действием должны быть доставлены в клетки. Это не является проблемой для проникающих в клетки небольших молекул (например, кортикостероидов или ингибиторов карбоксиангидразы), но этот фактор серьезно ограничивает клиническую применимость слабо проникающих препаратов, которые действуют на внутриклеточные мишени (например, пептиды, малую интерферирующую РНК, некодирующую РНК, антисмысловую ДНК). Для доставки таких соединений применялись системы внутриклеточной доставки лекарств, например, липосомы и наночастицы, причем в большинстве исследований основное внимание уделялось адресной доставке препарата к опухолям.

Существует несколько макроскопических преград на пути адресной доставки лекарственных веществ, таких как эндотелий кровеносных сосудов, ретикуло-эндотелиальная система, печень, селезенка, способная выводить микро- и наночастицы из организма до их взаимодействия с клеткой-

мишенью, белки крови, также способные к взаимодействию с частицами, и различные иммунологические аспекты.

Наносферы. Среди большого количества возможных материалов, биodeградируемые и биосовместимые полимеры в форме двумерных (пленки, покрытия) и трехмерных (микро- и наночастицы, гидрогели) самоорганизующихся структур являются наиболее многообещающими для создания носителей биомолекул и лекарственных препаратов. Получение полимерных материалов — одна из наиболее развитых областей промышленности в мире. Полимеры используются в различных биомедицинских областях по причине легкости своей обработки, простоты получения и широкого спектра свойств. Для применения в случае тесного контакта с жидкостями организма, клетками и тканями, они могут быть сконструированы таким образом, чтобы обеспечивать безопасный контакт в течение длительного времени без существенной потери функциональности и агрегирования с белками [55].

Замедленное высвобождение лекарственного препарата из полимерной матрицы или наночастиц достигается за счет применения расщепляемых линкеров между лекарством и полимером-носителем, либо за счет разложения полимерной частицы и изменения её свойств. Различные природные и синтетические, биodeградируемые и биосовместимые полимеры, такие как гиалуроновая кислота, хитозан, гепарин, полиаминокислоты и их полиэлектролитные комплексы, будут использоваться в качестве носителей для пролонгированного высвобождения лекарств в целях получения систем доставки лекарств на основе биоматериалов, а также для их последующей гибридизации с живыми клетками для получения биогибридов. Полимеры будут получены в виде наночастиц, пленок или твердых гидрогелевых носителей в зависимости от способа введения и способа доставки (внеклеточного и внутриклеточного).

На основе этих полимеров также могут быть созданы наночастицы различной морфологии.

Фуллерены – молекулярные соединения, принадлежащие к классу аллотропных форм углерода, представляющие собой полые выпуклые замкнутые многогранники и обладающие аномально высокой стабильностью [56]. В настоящее время известно, что более трети элементов периодической таблицы могут быть помещены внутрь молекулы фуллерена C₆₀. В молекулах фуллеренов атомы углерода расположены в вершинах правильных шести- и пятиугольников, из которых составлена поверхность сферы или эллипсоида. Самый симметричный и наиболее полно изученный представитель семейства фуллеренов — фуллерен C₆₀, в котором углеродные атомы образуют многогранник, состоящий из 20 шестиугольников и 12 пятиугольников [57].

Углеродные нанотрубки – протяжённые цилиндрические структуры диаметром от одного до нескольких десятков нанометров и длиной до нескольких сантиметров - состоят из одной или нескольких свернутых в трубку гексагональных графитовых плоскостей [56]. Идеальная нанотрубка представляет собой свёрнутую в цилиндр графитовую плоскость, то есть поверхность, выложенную правильными шестиугольниками, в вершинах которых расположены атомы углерода. Угол ориентации, в свою очередь, задаёт хиральность нанотрубки, которая определяет, в частности, её электрические характеристики.

Липосомы – искусственно получаемые частицы, которые образованы одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными бислоями. Липосомы бывают однослойными и многослойными [58]. Они широко используются в качестве переносчиков различных веществ (от ионов до белков) в клетки-мишени. Для направленной доставки содержимого липосом к их поверхности ковалентно пришивают адресные молекулы, например, антитела к поверхностным белкам клеток-мишеней. Липосомы

доставляют целевое вещество в клетки либо путем слияния с их мембраной, либо за счет эндоцитоза [59].

Выделяют несколько типов липосом:

1. Малые моноламеллярные липосомы (диаметром 10 – 100 нм).
2. Большие моноламеллярные липосомы (диаметром 100 – 1000 нм).
3. Гигантские моноламеллярные липосомы (диаметром более 1 мкм).
4. Мультиламеллярные липосомы (образованы множеством концентрически расположенных сферических бислоев).
5. Олиговезикулярные липосомы (малые липосомы располагаются внутри большой липосомы).

У липосом имеется ряд преимуществ как транспортных частиц: мембрана липосом имеет сродство с биологической мембраной, поэтому они не вызывают нежелательной аллергической реакции и биodeградируемы; благодаря наличию в липосомах липидного бислоя они могут использоваться для транспортировки как гидрофильных, так и гидрофобных веществ; содержимое липосом изолировано от внешней среды до момента попадания в клетку-мишень, что делает их идеальным переносчиком токсичных веществ, либо веществ, требующих защиты от внешней среды во время транспортировки до клетки-мишени; благодаря полусинтетической природе липосом можно широко варьировать их размеры, характеристики, состав поверхности. Это позволяет липосомам переносить широкий круг веществ: противоопухолевые и противомикробные препараты, гормоны, ферменты, вакцины, а также генетический материал [60].

Часто в медицине липосомы широко используют для точной, целенаправленной доставки лекарственных веществ в онкологии и иммунологии. Все перечисленные объекты активно используются в медицине и биологии.

1.6 Преимущества применения полимерных микро- и наночастиц в медицине

Особой областью применения полимерных частиц является создание на их основе лекарственных и вакцинных препаратов. Полимерные микро- и наночастицы можно применять в медицине для захвата различных биологически активных молекул [76]. Фактически, полимерные частицы способны адсорбировать на своей поверхности антигены, а также способны захватывать антигены внутрь себя. Было доказано, что взаимодействие антигена с полимерным носителем усиливает индукцию иммунного ответа [61,62]. Полимерные микро- и наночастицы, в отличие от липосом, способны легко связывать (особенно на поверхности) как гидрофильные, так и гидрофобные биомолекулы. Липосомы же обладают низкой эффективностью захвата антигенов из-за слабой способности к связыванию с гидрофильными молекулами и быстрого рассеивания. Также липосомы весьма быстро деградируют при хранении в отличие от биоразлагаемых полимерных частиц [63–65].

Кроме того, получение липосом является более дорогостоящим, чем изготовление частиц [66]. Однако, есть ряд недостатков полимерных частиц, с которыми столкнулись специалисты в данной области техники при внедрении полимерных частиц в медицинскую практику, а именно: наличие остаточных органических растворителей, неполное высвобождение антигена, сложная стерилизация конечного продукта и широкий разброс по размеру и форме частиц между партиями [67–69].

Благодаря составу полимерные микро- и наночастицы обладают коротким периодом полужизни, ограниченной биологической доступностью, неспособностью проникать через биологические барьеры. Для продления периода полужизни необходимо, чтобы частицы были защищены от преждевременного разрушения ферментами (такими, как эстеразы), от контакта с неблагоприятной биологической средой и высвобождения во

внутри- или внеклеточные компартменты, сопровождаемое эрозией матрицы частиц [70,71], так как при быстрой деградации и элиминации полимерных частиц возникает необходимость в повторных инъекциях для достижения необходимого терапевтического эффекта [72,73]. Кроме того, основой для способности вызывать иммунные реакции является поддержание целостности и активности захваченных антигенов, т.е. их биодоступности [74]. Помимо этого, полимерные частицы способны доставлять одновременно антигены и специфические адъюванты, например, толл-подобные рецепторы, что является важным фактором для стимуляции иммунной системы. Свойства частиц обеспечивают непрерывную, длительную и устойчивую доставку антигена в течение длительного периода к АПК, что позволяет избежать повторных введений антигена и, как следствие, избежать риска развития толерантности [75]. Целенаправленная доставка содержимого полимерных частиц позволяет использовать низкие дозы антигена, сводя к минимуму риск того, что непрерывная стимуляция эффекторных Т-клеток может привести к их истощению и, следовательно, к анергии Т-клеток [76,77].

1.7 Иммуногенность антигенов, адсорбированных на носителях разных размеров

Важным свойством, влияющим на поглощение и интернализацию носителей антигенов (полимерных микро- и наночастиц) антигенпрезентирующими клетками, является размер этих частиц. Распознавание иммунной системой антигенов, конъюгированных с микро- и наночастицами, по сравнению с растворимыми антигенами, позволяет направленно представлять антигены фагоцитирующим клеткам [78,79]. Однако же остается нерешенным вопрос о наиболее подходящем размере частиц для их поглощения АПК [80–82].

Дендритные клетки и макрофаги относятся к группе моноклеарных фагоцитирующих клеток. Исследования показали, что наиболее

оптимальным размером частиц для поглощения макрофагами является диапазон от 0,5 до 5 мкм в длину. Дендритные клетки в основном поглощают объекты с размером от 20 до 200 нм [83].

Также было установлено, что частицы с размером до 200 нм проникают в клетку актин-независимым путём [84–86], а более крупные частицы – актин-зависимым путём (фагоцитоз), тем самым стимулируется устойчивый иммунитет по сравнению с обычными препаратами [87–89]. Конъюгаты частиц с антигеном способны выступать в качестве внутреннего сигнала для активации адаптивных иммунных реакций и для созревания дендритных клеток. Размер полимерных частиц может определять доставку антигена к резидентным дендритным клеткам лимфатического узла, что обеспечивает более мощную иммуностимуляцию развивающихся лимфоцитов [90]. Совпадающие с размерами вируса наночастицы способны транспортироваться в дендритные клетки кожи (клетки Лангерганса) и за 24 часа достигать лимфоидных органов, к тому же они способны проникать в лимфоидные органы в течение нескольких часов после введения, проходя через лимфодренаж [91,92]. Кроме того, благодаря небольшому размеру микро- и наночастицы способны эффективно преодолевать физиологические барьеры, такие как плотные эпителиальные соединения кожи, кишечного тракта, барьеры легочной системы [93,94].

Как уже упоминалось, носители антигенов, а точнее микро- и наночастицы, способны вызывать адаптивные иммунные реакции и созревание ДК. Варьируя размер частиц, можно повлиять на эффективность достижения носителями антигенов специфических клеток и участков тела, стимулируя более устойчивый иммунитет по сравнению с обычными вакцинами [95,96].

Помимо размера микро- и наночастиц важен ещё их заряд. По-видимому, катионные частицы склонны к более высокой степени интернализации, в отличие от нейтрально или же отрицательно заряженных

частиц. Это может быть связано с ионными взаимодействиями, установленными между отрицательно заряженными клеточными мембранами и положительно заряженными полимерами [97–99]. Было установлено, что катионные микро- и наночастицы способны к агрегации с сывороточными белками крови, что является важным свойством при прогнозировании токсичности частиц в случае внутривенного введения. Причиной этого может быть активация системы комплемента и последующая реакция гиперчувствительности. Агрегация микро- и наночастиц может оказывать влияние на скорость их поглощения [100,101].

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что при планировании оценки взаимодействия и последующего поглощения частиц целевыми клетками следует учитывать не только размер частиц, но и их заряд. Однако такие неионные гидрофильные соединения как полиэтиленгликоль (ПЭГ) способны сделать так, что клетки системы тканевых макрофагов перестают распознавать в микро- и наночастицах чужеродного агента. Продолжительность жизни микро- и наночастиц *in vivo* растет благодаря пегилированию [102–104]. В работах [105–107] для нацеливания полимерных частиц на определенные органы или субклеточные органеллы использовались пегилированные микро- и наночастицы, к которым были присоединены различные иммуномодуляторы, эндоцитозные лиганды и антитела. Было обнаружено, что в результате действия подобных молекулярных конъюгатов, захваченные молекулы могут доставляться сайт-специфично и накапливаться в сайтах-мишенях с желаемой скоростью высвобождения активного агента. Такие свойства полимерных частиц, как их размер, форма, поверхностный заряд, гидрофобность, кинетика деградации и механические свойства могут быть точно подобраны для оптимального нацеливания частиц на клеточные мембраны АПК, которые являются мишенями [108]. Следовательно, доставка и обработка захваченных АГ будет происходить более эффективно, что является важным фактором,

способствующим индукции мощных иммунных ответов по сравнению с растворимыми молекулами [109,110].

1.8 Микрогранулы на основе полимолочной кислоты. Преимущества и недостатки

Лекарственные системы пролонгированного действия представляют большой интерес для современной медицины, поскольку позволяют осуществлять контроль высвобождения и доставки активного вещества. Поддержание постоянной концентрации лекарственного вещества в организме позволяет эффективно осуществлять терапию, попутно устраняя раздражающее действие лекарства на желудочно-кишечный тракт и другие побочные эффекты. В настоящее время уже разработаны, промышленно производятся и применяются различные лекарственные препараты пролонгированного действия на основе ПМК и полигликолевой кислот, а также сополимера молочной и гликолевой кислот [111–113]. В зависимости от молекулярной массы, степени кристаллизации и других факторов время действия препаратов на основе таких полимеров может составлять от нескольких недель до нескольких лет.

Основными компонентами лекарственных систем пролонгированного действия обычно являются собственно активное (лекарственное) вещество и полимер, выбор которого определяет основные закономерности высвобождения активного вещества и, следовательно, действие системы на организм.

Биологически совместимыми являются те полимеры, применение которых не оказывает вредного воздействия на людей или животных вследствие их низкой токсичности, полного выведения, постепенного растворения или деструкции в организме. Напротив, биологически несовместимые полимеры или их компоненты вызывают поражения тканей организма и не могут быть использованы в качестве носителей лекарственных веществ. По понятным причинам для создания

пролонгированных систем можно использовать только полимеры первого рода. Биологически совместимые полимеры выводятся из организма различными путями.

Считается, что деструкция полимеров *in vivo* происходит быстрее, чем *in vitro*, благодаря влиянию биологических веществ, ферментов, а также из-за формирования иммунного ответа.

Разрушение же полимерных объектов является следствием двух физических процессов: растворения и диффузии. В связи с этим различают два основных механизма биоразрушения полимерных частиц: поверхностный (гетерогенный) и объемный (гомогенный). При поверхностном разрушении гидролиз полимера происходит, в основном, на его границе со средой. Продукты гидролиза растворяются в среде и, таким образом, удаляются из зоны реакции. Кинетика высвобождения активного вещества при поверхностном разрушении описывается уравнением нулевого порядка, т.е. высвобождение поддерживается на постоянном уровне, а его скорость обычно прямо пропорциональна содержанию лекарства.

Наиболее часто для создания систем доставки лекарств пролонгированного действия используют сложные полиэфиры. Они легко подвергаются деструкции вследствие гидролиза сложноэфирной связи, продукты гидролиза выводятся, включаясь в метаболизм, а скорость гидролиза можно регулировать за счет изменения химического состава и структуры (со)полимера [114,115]. В свою очередь, наибольшее внимание среди сложных полиэфиров привлекают сложные алифатические полиэфиры: полимолочная и полигликолевая кислоты, а также сополимеры молочной и гликолевой кислот, обладающие хорошей биодеструктируемостью и биосовместимостью [116,117].

Полимолочная кислота – коммерчески доступное недорогое соединение, обладающее уникальными свойствами биоразлагаемости, биологической совместимости и абсорбируемости *in vivo* [118,119],

благодаря чему оно широко применяется в современной медицине [120,121]. ПМК представляет собой термопластичный сложный полиэфир (рисунок 2):

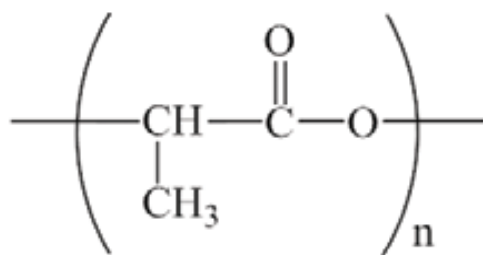


Рисунок 2. Полимолочная (полиоксипропионовая) кислота

Полимолочная кислота является одним из самых широко применяемых полимеров для создания микро- и наноносителей лекарственных средств. Низкая токсичность, превосходная биологическая совместимость и отсутствие воспалений при контакте с живыми организмами, а также хорошие механические свойства делают полимолочную кислоту привлекательной для фармацевтической промышленности, в том числе для создания пролонгированных систем доставки лекарственных веществ.

Основным мономером для синтеза полимолочной кислоты является молочная или (2-гидроксипропионовая) кислота, существующая в двух оптически активных конфигурациях. L(+)-изомер вырабатывается человеком и организмами других млекопитающих. Бактерии (например, *Lactobacilli*) способны вырабатывать как D(-), так и L(+)-энантиомеры. Синтез полимера ведут, как правило, либо из L(+)-молочной кислоты, либо из рацемической смеси D(-) и L(+) изомеров [122].

Основным продуктом биодеструкции ПМК является молочная кислота – естественный продукт обмена веществ живых организмов. Известно, что конечными продуктами превращения молочной кислоты в организме являются углекислый газ и вода, которые удаляются дыхательной и выделительными системами организма. В работах [123,124] была показана биологическая совместимость полимера на основе ПМК с тканями и

клетками, а также его низкая токсичность и иммуногенность. В то же время ПМК способна биологически разлагаться как *in vitro*, так и *in vivo* на продукты, которые являются нормальными метаболитами организма, или же на продукты, которые могут быть полностью выведены из организма с дальнейшим метаболизмом или без него [125,126]. *In vivo* ПМК гидролизуется до молочной кислоты, которая является продуктом различных метаболических путей в организме при нормальных физиологических условиях и легко метаболизируется в организме через цикл Кребса (часть кислоты), таким образом, физиологически устраняясь [127].

Полимерные микрочастицы на основе ПМК способны стимулировать устойчивое и целевое высвобождение различных бактериальных и вирусных антигенов *in vivo* с последующим запуском иммунного ответа против введенных патогенов [128].

Микро- и наночастицы на основе ПМК при нанесении на слизистые оболочки способны индуцировать местный иммунный ответ, что является их важной особенностью. Благодаря этому, возможно применение данных типов частиц для предотвращения тех инфекций, чей механизм инвазии включает слизистую оболочку [129]. Кроме того, микро- и наночастицы на основе ПМК способны индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы [130]. Также они являются эффективным лекарственным средством для назального, перорального и легочного применения (частицы, содержащие лекарство или антигены).

Для создания микро- и наночастиц на основе ПМК используются различные методы, такие как метод эмульсии [131], наноосаждения [132], сушка распылением [133,134]. Сушка распылением является одним из самых эффективных методов изготовления мелкодисперсных порошков из растворов. Растворенный материал разбрызгивается распылителем, образуя туман. Далее под действием газа капли высыхают, и сыпучий материал отделяется при помощи сепаратора.

Однако существует ряд проблем и особенностей, связанных с применением микро- и наночастиц на основе ПМК, таких как сложность получения частиц определённого размера и определение количества целевого продукта, который частица способна донести до своей мишени.

Как обсуждалось ранее, частицы на основе ПМК способны включать в матрицу биологически активные молекулы, например, белки, пептиды или олигонуклеотиды, благодаря чему возможно предотвращение преждевременного высвобождения этих биологически активных молекул. Существенной проблемой является то, что большинство методов получения частиц из ПМК в промышленном применении оказались недостаточно надёжными, так как при их использовании наблюдалась изменчивость физико-химических свойств полимерных микро- и наночастиц, таких как, в первую очередь, размер частиц. Для того чтобы сопоставить свойства полимерных частиц с их биологическим эффектом, необходимо изучение и последующий контроль параметров производства для снижения их воздействия на физико-химические особенности микро- и наночастиц. Другим немаловажным аспектом промышленного производства частиц на основе ПМК является разработка подходящей методологии для стерилизации конечного продукта, ведь обработка паром, теплом, этиленоксидом или радиацией может разрушать матрицу ПМК [173-175]. Современный способ изготовления основан на асептическом приготовлении микро- и наночастиц на основе ПМК в условиях, которые требует GMP (Надлежащая производственная практика; от англ. Good manufacturing practice) [135,136].

Из всего вышеописанного можно сделать вывод, что для разработки идеального метода изготовления конъюгатов микро- и наночастиц на основе ПМК с лекарственными веществами необходимо учитывать множество аспектов, таких как природа антигенов, адъювантов, а также способ введения частиц в организм. Полимерные частицы хорошо зарекомендовали себя как профилактические вакцины [137–139]. Известно, что частицы на основе

ПМК, конъюгированные с дифтерийным анатоксином, способны индуцировать усиленный и устойчивый иммунный ответ после однократного введения препарата морским свинкам [140]. Также был изучен усиленный и устойчивый антительный ответ после однократного введения микрочастиц на основе ПМК, конъюгированных со столбнячным анатоксином или антигенами дифтерийного анатоксина [141,142].

Частицы на основе ПМК, конъюгированные с антигенами, после интернализации дендритными клетками способны вызывать клеточные, гуморальные и слизистые системные иммунные ответы *in vivo*, индуцируя высокие титры антител и цитокинов (например, ИЛ-2 и IFN- γ) [143,144]. На основе всех полученных данных можно сделать вывод о том, что сорбированные на частицах антигены способны вызывать более сильный иммунный ответ, чем свободные антигены в растворе.

Вакцины, созданные на основе частиц из ПМК, широко используются для профилактики таких вирусных инфекций, как гепатит В [145,146], ВИЧ [147–150] и вирус папилломы человека [151]. Для этого полимерные частицы связывают с рекомбинантными или синтетическими белками или пептидами вирусных патогенов. Вакцины, состоящие из микро- и наночастиц конъюгированных с антигенами и/или адьювантами, обладают способностью индуцировать *in vivo* и *ex vivo* мощные гуморальные и клеточные иммунные ответы как локально, так и в отдаленных местах. Более того, адьюванты, присутствующие в составе частиц, способны усиливать общие иммунные ответы. Стоит отметить, вакцины на основе ПМК не вызывают воспаления, в отличие от квасцов.

Профилактика инфекционных заболеваний является не единственным способом применения микро- и наночастиц на основе ПМК. Настоящие частицы также могут оказаться перспективным подходом для лечения злокачественных опухолей, в котором будет использоваться иммунная система организма для специфического уничтожения злокачественных

клеток, что позволит избежать повреждения здоровых клеток, которое происходит при лечении традиционной противоопухолевой терапией [152–155].

В итоге можно сказать, что наиболее перспективным материалом для создания частиц является полимолочная кислота, а также её сополимер с полиэтиленгликолем. ПЭГ может препятствовать агрегированию частиц, повышать эффективность образования частиц, снижать температуру формирования частиц.

В нашей работе было необходимо установить влияние состава и размера полимерных частиц на гуморальный и клеточный иммунные ответы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Синтез, выделение и очистка рекомбинантных белков на примере химерного белка β 2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком

Белок β 2M-sfGFP получали из клеток *E.coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой, содержащей ген слитого белка β 2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком. Культивирование проводили в условиях аэрации при 37°C до достижения оптической плотности $A_{600} = 0.6-1$. Синтез β 2M-sfGFP индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 250 мкМ, и культивирование продолжали в течение ночи при 37°C в условиях аэрации. Бактериальные клетки отделяли от среды культивирования центрифугированием в течение 15 мин при 10000 g и однократно отмывали физиологическим раствором с последующим осаждением при 10000 g. К отмытому клеточному осадку добавляли раствор PBS, содержащий 10мМ имидазола. Клетки разрушали ультразвуком (частотой 3 кГц 3 интервала по 30 сек.) на холоде. После разрушения бактериальных клеток суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 30000 g. Профильтрованный супернатант подвергали хроматографической очистке на металл-хелатном никелевом сорбенте (Invitrogen). Концентрацию полученного белка определяли по поглощению при длине волны 490 нм. Чистоту полученных белковых препаратов оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия или без денатурации.

2.2 Получение частиц на основе полимолочной кислоты и сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем диаметром 100 нм

Получение частиц осуществляли в Институте Химии Санкт-Петербургского государственного университета. Формирование полимерных частиц на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем с молекулярной массой 5000 (ПМК-б-ПЭГ-5000) с диаметром 100 нм

осуществляли методом наноосаждения. По данным гель проникающей хроматографии среднечисловая молекулярная масса сополимера поли-(D, L-молочной кислоты) с полиэтиленгликолем (ПЭГ-5000) составила 96000 Да, среднемассовая молекулярная масса образца полимера – 133000 Да, а индекс полидисперсности – 1,4. Анализ был выполнен на установке Shimadzu LC-20 Prominence с рефрактометрическим детектором RID 10-A (Япония). Калибровка была получена с использованием полистирольных стандартов. Для получения частиц методом наноосаждения концентрация сополимера в органической фазе составляла 5 мг/мл. Органическую фазу, состоящую из 100 мг сополимера ПМК-б-ПЭГ-5000 и 20 мл ацетонитрила, вводили со скоростью 2 мл/минута в 100 мл воды при перемешивании 900 об/мин. Соотношение органической фазы к водной составляло 1/5. Для удаления органического растворителя систему оставляли перемешиваться на 24 часа при 25 °С. Затем отбирали часть частиц для определения выхода и анализа их размера. Выход полимерных частиц составил 93%. Средний размер частиц и индекс полидисперсности оценивали методом динамического рассеивания света. Были получены полимерные частицы диаметром 96 ± 4.1 нм и индексом полидисперсности 0,087. Частицы хранили при температуре 4 °С. Частицы на основе ПМК с диаметром 100 нм были получены аналогично, распределение по размерам составило 90 ± 3.1 нм.

2.3 Получение частиц на основе полимолочной кислоты диаметром 1400 нм

Для формирования полимерных микрочастиц на основе биodeградируемого полимера поли-(D, L-молочной кислоты) с среднемассовой молекулярной массой 24,000 использовали метод одинарной эмульсии. Органическая фаза содержала: 300 мг поли-(D, L-молочной кислоты) и 6 мл дихлорметана. Первая водная фаза состояла из раствора 1% натрий лаурилсульфата и 5% лутрола Ф 68 (объем 60 мл), вторая водная фаза -180 мл 1% поливинилового спирта. Для получения эмульсии использовали

ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS HD 2070 (Bandelin, Германия). Скорость введения органической фазы в первую водную - 2 мл/мин, диспергирование в системе осуществляли при мощности гомогенизатора 13% в течение 3 минут, затем 30 секунд при мощности 24% и перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 800 об/мин. После завершения введения эмульсии во вторую водную фазу систему диспергировали при мощности 24% в течение 1 минуты. Для получения суспензии частиц проводили удаление дихлорметана с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML / G3B (Германия)) при 200 мбар в течение 60 минут, затем постепенно повышали давление в системе с интервалом 20 мбар, а при достижении 100 мбар система находилась 40 минут. После завершения процесса формирования суспензии, частицы осаждали с использованием центрифуги в течение 10 минут при 10,000 g и 4° C, отбирали надосадочную жидкость, промывали дистиллированной водой, редиспергировали в течение 5 секунд при мощности 15, процедуру повторяли дважды для удаления поверхностно-активных веществ. С целью выделения фракций крупных и мелких частиц проводили фракционирование (3 мин, 2000 g). С использованием метода динамического рассеяния света (на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) установлено, что средний размер частиц из крупной фракции составляет 1400 нм., а из мелкой 300 нм. Определяли выход полимерных частиц, который составил 80%, из них доля крупной фракции – 0.6, а мелкой – 0.4. Фракцию крупных частиц далее использовали для проведения связывания с модельным белком и с клеточным рецептором CD81. Распределение по размерам составило 1400±210 нм. Частицы на основе ПМК-б-ПЭГ-5000 (с среднемассовой молекулярной массой 55,000) получали аналогичным образом. Распределение по размерам составило 1400±280 нм.

2.4 Ковалентное связывание белка с частицами

На первом этапе производили активацию частиц. Генерировали карбоксильные группы на поверхности частиц путем обработки их 0,1 М раствором NaOH. После этого частицы промывали 4-5 раз водой. Следующим этапом связывания являлась активация карбоксильных групп на поверхности частиц с помощью N-гидроксибензотриазола (HOBT) и гидрохлорида (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (CDI). Реакцию проводили в 0,05 М буферном растворе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) pH 5,6. После промывки частиц осуществляли связывание с их поверхностью флуоресцентного белка в 0,1 М боратном буферном растворе, pH 8.4. Препараты конъюгированных частиц с белком хранили при 4°C. При хранении частицы имели склонность к образованию агрегатов, поэтому перед проведением следующих экспериментов проводили диспергирование частиц.

2.5 Исследование полученного конъюгата частиц и рекомбинантного модельного белка β 2M-sfGFP при помощи конфокальной микроскопии

Конфокальные изображения получали с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 Meta» (Zeiss, Германия), с иммерсионным объективом C-Apochromat 40×/1.2 W Corr UV-VIS-IR M27. Флуоресценцию β 2M-sfGFP детектировали с использованием оптического фильтра 505 нм при возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны 488 нм. В проходящем свете изображения получали при помощи метода дифференциально-интерференционного контраста. Обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения «LSM 510».

2.6 Измерение концентрации белка

Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000. Измерение производили непосредственно в капле (2 мкл) жидкости. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм.

2.7 Иммунизация и получение сыворотки крови мышей

В работе были использованы самки-гибриды F1 (CBA x C57BL) массой в среднем 20-25 г (возраст 4-6 месяцев). Мышей содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 часов, с предоставлением корма и воды *ad libitum*. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ препараты мышам вводили внутрибрюшинно. Количество частиц для одной иммунизации во всех опытах составляло 0,1 мг на 1 мышь, количество β 2M-sfGFP – 1 мкг на 1 мышь. Препараты вводились в объеме 0,4 мл на животное. Вся работа выполнялась в соответствии с международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Иммунизировали мышей 4 раза с интервалом по 2 недели. Клетки выделяли из селезенок спустя 2 недели после последней четвертой иммунизации [8].

2.8 Иммуноферментный анализ

В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл 0,05 % раствора глутарового альдегида в PBS. Инкубацию проводили при 37°C в течение 1 часа. Удаляли из лунок глутаровый альдегид, и в лунки одной половины планшета вносили по 100 мкл раствора sfGFP в PBS с концентрацией 5 мкг/мл, а в лунки другой половины – PBS. Инкубировали при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов (Biosan, Латвия) в течение 1 часа. В лунки планшета вносили по 200 мкл 3 % раствора обезжиренного молока (Fluka, США) в PBS с добавлением 0,5 % Tween 20 (PBST) для блокирования неспецифического связывания. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании в течение 1 часа. В лунки планшета вносили сыворотки крови мышей в 3% растворе

молока в PBST в различных разведениях. Каждую сыворотку вносили в трех или двух разведениях (1:2000, 1:1000 и 1:500 или 1:1000 и 1:500) в двух повторностях на каждую половину планшета в объеме 100 мкл/лунка. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании в течение 1 часа. Лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST. В лунки планшета вносили специфические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat anti Mouse-HRP, absam, Великобритания), в разведении 1:50000 в 3 % растворе молока в PBST в количестве 100 мкл/лунка. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании в течение 1 часа. Лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST. В лунки планшета вносили по 100 мкл проявителя, приготовленного следующим образом: 5 мг ТМБ растворяли в 1 мл ацетонитрила. Далее доводили объем до 11 мл 0,1 М цитрат-фосфатным буфером, pH 4,0. Непосредственно перед внесением в планшет в раствор проявителя добавляли 1 мкл 30 % H₂O₂ с конечной концентрацией 0,0027%. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании в течение 10 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄ и встряхивали в течение 1 мин. Для определения оптической плотности поглощение в лунках планшета измеряли при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

2.9 Выделение и криоконсервация спленоцитов мыши

Спленоциты выделяли из селезенки мышей спустя 2 недели после последней четвёртой иммунизации. Навески селезенки помещали в 1 мл стерильной питательной среды DMEM (Gibco, 41965-039) с антибиотиком/антимикотиком (Gibco, 15240-062) и гомогенизировали. Клеточную суспензию отмывали 10 мл стерильного PBS в течение 10 мин (200g при 10 C). Клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл буфера и после лизиса эритроцитов ядродержащие клетки отмывали избытком стерильного PBS (10 мин при 200g, 10°C). Полученный осадок клеток

ресуспендировали в 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, SH30071.02), а затем на холоде при постоянном перемешивании добавляли 1 мл двукратной криосреды (эмбриональная телячья сыворотка с 20% ДМСО). Разливали по 1 мл суспензии в криопробирки и оставляли на хранение при -70°C с переносом на следующие сутки в жидкий азот.

2.10 Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов

Спленоциты были охарактеризованы при помощи антител к CD3, меченных APC (клон 17A2, BioLegend, 100236), антител к CD4, меченных PE (клон GK1.5, BioLegend, 100408), антител к CD8a, меченных PC7 (клон 53-6.7, BioLegend, 100722), антител к IFN γ , меченных FITC (клон XMG1.2, BioLegend, 505806). Для выявления специфичных к антигену Т-клеток использовали общепринятый метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) [156]. Клетки (10^6 /лунка) культивировали в круглодонных 96-луночных планшетах в 200 мкл полной культуральной среды, приготовленной на основе RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, R8758-100ML) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, водного раствора Хепес (Biolot, 1.2.6.), антибиотиков/антимикотиков (Gibco, 15240-062), 2-меркаптоэтанола (Amresco 0482-0.1), ронколейкина 106 U/ml (НПК Биотех, СПб). Инкубацию клеток проводили в CO $_2$ -инкубаторе при 37 $^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов с антигеном, за пять часов до завершения эксперимента добавляли 1х раствор BD GolgiPlug (BD Bioscience, 555028), блокирующие экскрецию цитокинов из клетки. Для определения спонтанной продукции IFN γ вместо стимулятора к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640. При анализе эти данные (отрицательный контроль) вычитались из показателей, полученных для антиген-стимулированных клеток. Проточную цитометрию проводили на Beckman Coulter Navios.

2.11 Статистическая обработка данных

Для попарного сравнения групп использовали критерий Ньюмена-Кейлса. Проверку на нормальность осуществляли при помощи критерия

Шапиро-Уилка. Все статистические расчеты и построение графиков были выполнены в программе Rstudio 1.1.453. Все графики «box plot» представлены в виде медиан с доверительными интервалами.

2.12 Создание экспрессионной генетической конструкции белка слияния CD81 со стрептавидином для синтеза в E.coli

Была создана генетическая конструкция, экспрессирующая нуклеотидную последовательность стрептавидина с CD81. Генетическая конструкция, кодирующая стрептавидин с CD81, была трансформирована в штамм E.coli BL21(DE3), который затем использовался для культивирования при различных условиях выращивания. Полученную биомассу клеток в дальнейшем использовали для выделения и очистки целевого белка на никель-агарозе.

2.12.1 Подготовка исходной конструкции к клонированию

Для наработки исходного вектора рЕТ SAA 2-7 использовали штамм E.coli DH5(α). Концентрацию плазмиды определяли по интенсивности флуоресценции бромистого этидия после электрофоретического разделения в 0.8% агарозном геле в присутствии маркера известной концентрации.

Для вставки нуклеотидных последовательностей использовались «липкие концы», получаемые за счет обработки вектора эндонуклеазой рестрикции NdeI.

После процедуры гидролиза получившийся линейный вектор подвергали электрофоретическому разделению в 0.8% агарозном геле. Очистку плазмиды из агарозного геля проводили с использованием набора фирмы Promega. Размер очищенной плазмиды, названной нами рЕТ SAA 2-7/NdeI, контролировали с помощью электрофоретического разделения в 0.8% агарозном геле. В качестве маркеров использовали коммерческие ДНК маркеры 250-10000 п.н. («Медиген»).

Исходный вектор использовался для получения генетической конструкции, кодирующей стрептавидин с CD81.

2.12.2 Получение нуклеотидной последовательности CD81

Для наработки необходимого количества нуклеотидной последовательности CD81 проводилась ПЦР с использованием специально подобранных олигонуклеотидов. Сайты рестрикции эндонуклеазы NdeI были использованы для получения «липких концов».

В ходе работы использовалась векторная конструкция pETSAA 2-7, содержащая последовательность стрептавидина. В составе вектора содержался сайт рестрикции NdeI, необходимый нам для вставки целевой конструкции CD81. Также в плазмиде имелась олигогистидиновая последовательность.

Для получения продуктов амплификации были подобраны следующие олигонуклеотиды:

1. f-CD81Nde: 5'- ctgCATATGGAATTCgttaacaagaac – олигонуклеотид с сайтом рестрикции для NdeI и последовательностью комплементарной части гена CD81.

2. r-CD81Nde: 5'- ctgCATATGCCATGGtttaccagagaacagg– олигонуклеотид с сайтом рестрикции для NdeI и последовательностью комплементарной части гена CD81.

Данные олигонуклеотиды использовались для получения продуктов амплификации целевой конструкции CD81.

В качестве матрицы для наработки нуклеотидной последовательности CD81 использовалась плаزمид, содержащая ген CD81. ПЦР-продукты были обработаны эндонуклеазами рестрикции NdeI. После гидролиза проводили очистку из 0.8% агарозного геля с помощью набора фирмы Promega. Выделенные фрагменты нуклеотидной последовательности были названы CD81/NdeI.

2.12.3 Встраивание нуклеотидной последовательности CD81 в плазмиду pET SAA 2-7

Была подготовлена плазида pET SAA 2-7/NdeI и продукты амплификации нуклеотидной последовательности CD81/NdeI, имеющие идентичные «липкие концы». После этого было проведено лигирование нуклеотидных последовательностей по данным «липким концам», в результате чего была получена генетическая конструкция, названная нами pET SAA 2-7 – CD81.

2.12.4 Отбор колоний, содержащих плазмиды со вставкой гена CD81

Полученной лигазной смесью были трансформированы компетентные клетки штамма DH5(α) E.coli. Трансформанты были высеяны на чашку Петри с агаризованной культуральной средой, в состав которой входил антибиотик ампициллин. Таким образом, на селективной среде выросли клетки, резистентные к ампициллину, содержащие плазмиды - продукты лигирования. Из нескольких выросших колоний была выделена плазмидная ДНК. Для поиска колоний, содержащих плазмиду со вставкой нуклеотидной последовательности CD81, проводили рестрикционный анализ и ПЦР.

2.12.5 Секвенирование pET SAA 2-7-CD81

Для получения достаточного количества продукта ПЦР использовали стандартные олигонуклеотиды T7 promoter и олигонуклеотиды T7 terminator. При анализе результатов секвенирования были получены следующие результаты: pET – SAA 2-7 – CD81 имеют олигогистидиновую последовательность.

2.12.6 Получение штамма E.coli BL21(DE3)/pET SAA 2-7-CD81

Полученной конструкцией pET SAA 2-7-CD81 были трансформированы клетки E.coli BL21(DE3). К 100 мкл компетентных клеток E.coli BL21(DE3) добавили от 100 до 300 нг плазмидной ДНК pET SAA 2-7-CD81 и инкубировали во льду 15 минут. Для осуществления теплового шока суспензию клеток инкубировали в течение 5 минут при 42°C на водяной

бане, с последующей инкубацией во льду 2 минуты. После этого в пробирку добавляли 900 мкл среды LB и инкубировали 1 час при 37°C. Клетки высевали на чашки, содержащие агаризованную культуральную среду с ампициллином (100 мкг/мл). Трансформированные клетки обладают устойчивостью к данным антибиотикам и сохраняют свою жизнеспособность, в то время как исходные клетки погибают.

2.12.7 Культивирование штамма *E.coli* BL21(DE3)/pET SAA 2-7-CD81

Полученные трансформанты были названы *E.coli* BL21(DE3)/pET SAA 2-7-CD81. Их засеивали в 10 мл культуральной среды с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и оставляли расти на ночь при 37°C. С утра инокулят переливали в 500 мл культуральной среды. Для селекции трансформированных плазмидой клеток производилось добавление антибиотика ампициллина (в расчете 100 мкг на 1 мл среды). Клетки выращивали при 37°C в условиях аэрации до плотности $A_{600}=0,6-1$. Затем синтез белка индуцировали добавлением IPTG (60 мг на 500 мл среды), культивирование продолжали в течение ночи при 37°C. Полученную биомассу клеток затем использовали для выделения белка из различных клеточных фракций.

2.12.8 Выделение белка слияния CD81-SAA из растворимой клеточной фракции *E.coli* BL21(DE3)/pET SAA 2-7-CD81

Бактериальные клетки отделяли от среды культивирования путем центрифугирования в течение 30 мин при 3500 мин⁻¹ на центрифуге К-23. Осажденные клетки ресуспендировали в PBS и откручивали на центрифуге К-23 со скоростью 4000 об/мин в течение 15-ти минут и затем разрушали ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора в условиях охлаждения с добавлением стеклянных шариков (GlassBeads, 500 microns, Sigma). Затем супернатант и клеточную массу разделяли, предварительно убрав стеклянные шарики, на центрифуге К-24 со скоростью 13500 об/мин в течение 15-ти минут.

Профильированный через бумажный фильтр супернатант подвергали хроматографической очистке на металл-хелатном никелевом сорбенте (Invitrogen) (объем колонки 1.5 мл), согласно стандартному протоколу производителя.

2.12.9 Выделение белка слияния CD81-SAA из телец включения *E.coli* BL21(DE3)/pET SAA 2-7

Осадок разрушенных клеток, оставшийся после выделения из растворимой клеточной фракции, отмывали PBS, растворяли в растворе I с 8 М мочевиной и оставляли на 1 ч. Затем осадок центрифугировали на центрифуге K-24 со скоростью 12000 об/мин в течение 15-ти минут. Профильированный через бумажный фильтр супернатант подвергали хроматографической очистке на металл-хелатном никелевом сорбенте (Invitrogen) (объем колонки 1.5 мл), согласно стандартному протоколу производителя.

2.13 MALDI-TOF масс-спектрометрия

Исследуемые образцы смешивали с матрицей HCCA (Bruker, Германия), наносили на мишень GroundSteel (Bruker, Германия) и анализировали на масс-спектрометре MALDI-TOF / TOF ultrafleXtreme (Bruker, Германия) в режиме обнаружения положительных ионов. Для каждого спектра было суммировано 5000 лазерных импульсов. Идентификация белков проводилась с использованием MASCOT (matrixscience.com) для доступа к базе данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, www.ncbi.nlm.nih.gov), в параметрах в качестве переменных модификаций было указано окисление метионинов. Ошибка определения массы была ограничена до 50 ppm.

2.14 Триптический гидролиз в геле

Ферментативный гидролиз белков в геле трипсином осуществляли без восстановления дисульфидных связей и модификации йодацетамидом. Вырезанные фрагменты геля дважды промывали в течение 15 мин раствором

для удаления красителя (30 мМ NH₄HCO₃ в 40% ацетонитриле) и дегидратировали 100% ацетонитрилом. После полного испарения ацетонитрила к фрагментам геля добавляли 20 мкг / мл трипсина свиньи (Promega, США) в 50 мМ NH₄HCO₃. Ферментативный гидролиз проводили в течение 8 ч при 37°C. Реакцию останавливали раствором 0,5% трифторуксусной кислоты с 10% ацетонитрилом.

2.15 Получение белка слияния оболочечного белка E2 core вируса гепатита С с зелёным флуоресцентным белком sfGFP

Для получения целевого белка методами генной инженерии была создана экспрессионная генетическая конструкция, включающая в себя в одной рамке считывания ген E2 и ген sfGFP. Получена кДНК E2 core при помощи ПЦР с использованием следующих искусственно синтезированных олигонуклеотидов: fE2-EcoSF 5' - ctggaattcCAGCTGATCAACACC - 3' и rE2-KpnSF 5' - ctggtaccAGACTGGAAGTACAGGTTTTTCGTTGCAAGCAGCTTC - 3' (подчеркнуты сайты рестрикции).

В качестве матрицы для ПЦР была использована одна из плазмид, полученная в нашей лаборатории ранее, содержащая кДНК E2. В ходе проведения ПЦР получился продукт размером 738 п.н., который после обработки эндонуклеазами рестрикции EcoRI и KpnI был вставлен в плазмиду pTRC99a - sfGFP, обработанную этими же эндонуклеазами рестрикции. В результате была получена генетическая конструкция pTRC99a - sfGFP-E2 (core). Полученной конструкцией были трансформированы клетки E.coli BL21(DE3). Белок выделялся из нерастворимой и растворимой клеточных фракций.

2.16 Создание ловушек для вирусов на основе полимерных частиц

Для создания ловушек вируса гепатита С методом одинарной эмульсии получали частицы на основе поли(молочной кислоты). Данный полимер был выбран, поскольку он является нетоксичным, биосовместимым и одобрен для применения в медицине. Получение поли-(D,L-молочной кислоты)

осуществляли методом полимеризации с раскрытием цикла. В качестве катализатора использовали октоат олова. Мольное соотношение мономер/катализатор составляло 200. Полимеризацию проводили по ионно-координационному механизму в расплаве при температуре 125 °С в течение 60 минут. Выход полимера составил 87%. Определение среднечисловой и среднемассовой молекулярной массы и константы полидисперсности ПМК проводились методом гель проникающей хроматографии. Анализ был проведен на установке Shimadzu LC-20 Prominence с рефрактометрическим детектором RID 10-A (Япония). Калибровка была получена с использованием полистирольных стандартов, которые охватывали диапазон молекулярной массы от 2000 до 144 000. Расчеты проводились с помощью программного обеспечения GPC LC Solutions (Shimadzu, Япония). Характеристики полученного полимера ПМК составили M_w – 24 000, M_n – 17 000, индекс полидисперсности - 1,4.

Для формирования полимерных микрочастиц на основе биodeградируемого полимера поли-(D, L-молочной кислоты) с молекулярной массой 24,000 использовали метод одинарной эмульсии. Органическая фаза содержала: 300 мг поли-(D, L-молочной кислоты) и 6 мл дихлорметана. Первая водная фаза: 60 мл раствора 1% натрий лаурилсульфата и 5% лутрола Ф 68 (объем 60 мл), вторая водная фаза - 180 мл 1% поливинилового спирта. Для получения эмульсии использовали ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS HD 2070 (Bandelin, Германия). Скорость введения органической фазы в водную 2 мл/мин. Для получения суспензии частиц проводили удаление дихлорметана с помощью роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML / G3B (Германия)) при 200 мбар в течение 60 минут, затем при 100 мбар в течение 90 минут. После завершения процесса формирования суспензии, частицы осаждали с использованием центрифуги в течение 10 минут при 10,000 g и 4° С, отбирали надосадочную жидкость, промывали дистиллированной водой, редиспергировали в течение 5 секунд при

мощности 15, процедуру повторяли дважды для удаления поверхностно-активных веществ. С целью выделения фракций крупных и мелких частиц проводили фракционирование (3 мин, 2000 g). С использованием метода динамического рассеяния света Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) установлено, что средний размер частиц из крупной фракции составляет 800 нм., а из мелкой 300 нм. Определяли выход полимерных частиц, который составил 80%, из них доля крупной фракции – 0.6, а мелкой – 0.4. Фракцию крупных частиц далее использовали для проведения связывания с фрагментом рецептора CD81.

На поверхности сформированных частиц за счет реакции активированных карбоксильных групп полимера и аминок групп белка проводили ковалентную иммобилизацию рекомбинантного CD81. В качестве контроля использовали частицы, несущие на своей поверхности модельный белок, не имеющий сродства к E2, а именно соевый ингибитор трипсина (СИТР). С целью упрощения процедуры детектирования были получены конъюгаты: CD81-Су3 и СИТР-Су3. Мольное соотношение флуоресцентная метка/белок составляло 3:1. Реакцию конъюгирования проводили в течение 1 часа. Степень модификации для СИТР-Су3 составляла 77%, а для CD81-Су3 – 60%. Модификация поверхности полимерных частиц была осуществлена с использованием N-гидроксисукцинимидов, что позволило получить на поверхности группы с активированными эфирами. 150 мг полимерных частиц обрабатывали в 1,5 мл 0,1 М NaOH в течение 30 мин при 22 °С для генерирования карбоксильных групп. Для активации карбоксильных групп частицы помещали в раствор, содержащий: 3 мг N-гидроксисукцинимидов в 3 мл 0,05 М 2-(N-морфолино)-этансульфоновой кислоты (МЭС) (концентрация 1 мг/мл) с pH 5,4. Процесс проводили при 4 °С в течение 10 мин, затем добавляли 1,5 мг в (N-3-диметиламинопропил)N-этилкарбодиимида гидрохлорида (EDC) в 0,5 мл МЭС и проводили реакцию в течение 30 мин при перемешивании. Для ковалентного взаимодействия частицы поместили в

раствор 0.0125 М боратного буфера с рН 8,4, редиспергировали в течение 10 секунд при мощности 15 на ультразвуковом гомогенизаторе и добавляли растворы CD81-Су3 или СИТР-Су3. Время реакции связывания 1 час. Затем отделили непрореагировавший конъюгаты и определили емкость полимерных частиц. Определение количества связавшегося CD81-Су3 или СИТР-Су3 проводили с использованием спектрофотометрического детектирования на длине волны 550 нанометров. Для полимерных частиц ПМК_CD81-Су3 было установлено, что иммобилизационная емкость составляет 3.0 мкг/мг, а для частиц, которые будут использованы в качестве контроля - ПМК_СИТР-Су3 – 2.0 мкг/мг. Образцы частиц были исследованы методом динамического светорассеивания, показано, что размер частиц ПМК_CD81-Су3 составляет 850 нм, а ПМК_СИТР-Су3 - 830 нм, ζ-потенциал для первой системы – -68 мВ, а для второй -74 мВ. Немодифицированные частицы ПМК имели ζ-потенциал -34 мВ. Таким образом, модификация поверхности частиц и ковалентное связывание конъюгатов позволяет получить более стабильные системы.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выбор модельного белка

С целью изучения способности частиц связывать различные белки были использованы рекомбинантный зеленый флуоресцентный белок (sfGFP), рекомбинантные слитые белки бета2-микроглобулин человека с зеленым флуоресцентным белком Superfolder (β 2M-sfGFP) и транстиретин человека с зеленым флуоресцентным белком Superfolder (TTR-sfGFP). Наличие в белках слияния sfGFP существенно облегчает детекцию степени модификации полимерных частиц.

Оказалось, что sfGFP недостаточно эффективно модифицирует частицы, что может объясняться сравнительно плотной упаковкой полипептидной цепи белка, которая представляет собой бета-бочонок. Низкое содержание доступных аминокрупп, по-видимому, препятствует связыванию белка с активными группировками на поверхности частиц.

Для получения белков слияния, более эффективно взаимодействующих с частицами полимолочной кислоты, был проведен поиск среди белков, имеющих менее жесткую упаковку полипептидной цепи.

В качестве таких белков были выбраны β 2-микроглобулин (β 2M) и транстиретин человека (TTR). В результате были получены и очищены рекомбинантные белки слияния β 2M-sfGFP и TTR-sfGFP.

Анализ стехиометрии взаимодействия белков с полимерными частицами из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля показал, что эффективность связывания sfGFP с частицами весьма низкая. При сравнении эффективности связывания с частицами двух полученных белков слияния было установлено, что на 1 мг частиц количество связавшегося β 2M-sfGFP было выше, чем количество TTR-sfGFP. Кроме того, частицы после связывания с TTR-sfGFP имели выраженную тенденцию к агрегации. В связи с этим, для дальнейшей работы были использованы конъюгаты частиц и β 2M-sfGFP.

Таким образом, эти эксперименты показали, что для эффективного связывания целевых белков с частицами полимолочной кислоты необходимы спейсерные группы с неупорядоченной вторичной и третичной структурами.

3.2 Связывание микро- и наночастиц с выбранным модельным белком β 2M-sfGFP

В работе были созданы частицы двух диаметров 100 и 1400 нм. Такой выбор обуславливался тем, что размер частиц может влиять на поглощения их иммунными клетками. Установлено, что дендритные клетки в основном поглощают объекты с размером от 20 до 200 нм, в то время как, наиболее оптимальным размером частиц для поглощения макрофагами является диапазон от 0,5 до 5 мкм в длину [83]. В наших предварительных опытах, мы увидели снижение гуморального ответа от конъюгата частиц с диаметром 1400 нм с модельным белком по сравнению со смесью таких же частиц с несвязанным белком [157,158]. Далее мы решили, во-первых, перепроверить эти результаты, а во-вторых, выяснить влияние размера и состава частиц на гуморальный и клеточный ответы. Нижняя граница размера частиц (100 нм) определялась нами исходя из соображений разрешающей способности конфокального флуоресцентного микроскопа и методики создания наночастиц.

Частицы с диаметром 100 нм разных составов (ПМК, ПМК-ПЭГ) формировали методом наноосаждения. Этот метод не требует применения стабилизаторов (ПАВ) и УЗ обработки, дополнительное преимущество заключается в том, что частицы получают с узким распределением по размерам. Частицы на основе ПМК имели распределение по размерам 90 ± 3.1 нм, частицы на основе сополимера ПМК-ПЭГ – 96 ± 4.1 . Частицы с диаметром 1400 нм разных составов (ПМК, ПМК-ПЭГ) получали методом одинарной эмульсии. Для выделения частиц крупной фракции использовали центрифугирование при разных величинах центробежной силы. Частицы на

основе ПМК имели распределение по размерам 1400 ± 210 нм, частицы на основе сополимера ПМК-ПЭГ – 1400 ± 280 .

Процесс связывания белков с полученными частицами состоял из нескольких этапов:

1. Активация поверхности частиц (модификация карбоксильных групп).
2. Ковалентное связывание белка с группами на поверхности частиц.
3. Очистка полученного надмолекулярного объекта.
4. Оценка количества связавшегося белка методом спектрофотометрии.

В результате были получены конъюгаты частиц ПМК размерами 100 и 1400 нм с модельным белком $\beta 2M$ -sfGFP и конъюгаты частиц из сополимера ПМК-ПЭГ таких же размеров с тем же модельным белком.

Характеристики полученных частиц представлены ниже.

1. Связывающая способность $\beta 2M$ -sfGFP с частицами на основе ПМК диаметром 100 нм составляла 9.40 мкг белка на 1 мг частиц.
2. Связывающая способность $\beta 2M$ -sfGFP с частицами на основе ПМК диаметром 1400 нм составляла 2,32 мкг белка на 1 мг частиц.
3. Связывающая способность $\beta 2M$ -sfGFP с частицами на основе ПМК-ПЭГ диаметром 100 нм составляла 10,00 мкг белка на 1 мг частиц.
4. Связывающая способность $\beta 2M$ -sfGFP с частицами ПМК-ПЭГ диаметром 1400 нм составляла 1.94 мкг белка на 1 мг частиц.

3.3 Микроскопия частиц, имеющих на своей поверхности $\beta 2M$ -sfGFP

Для подтверждения связывания частиц с $\beta 2M$ -sfGFP была использована лазерная сканирующая микроскопия (рисунок 3). На рисунке 3-А представлен конъюгат частиц с $\beta 2M$ -sfGFP, обладающий флуоресценцией, характерной для sfGFP, что свидетельствует об успешном связывании модельного белка с частицами. Также стоит отметить, что $\beta 2M$ -sfGFP не теряет способности к флуоресценции при связывании с частицами. В то же время частицы, не имеющие на своей поверхности модельного белка, флуоресценцией не обладают (рисунок 3-Г).

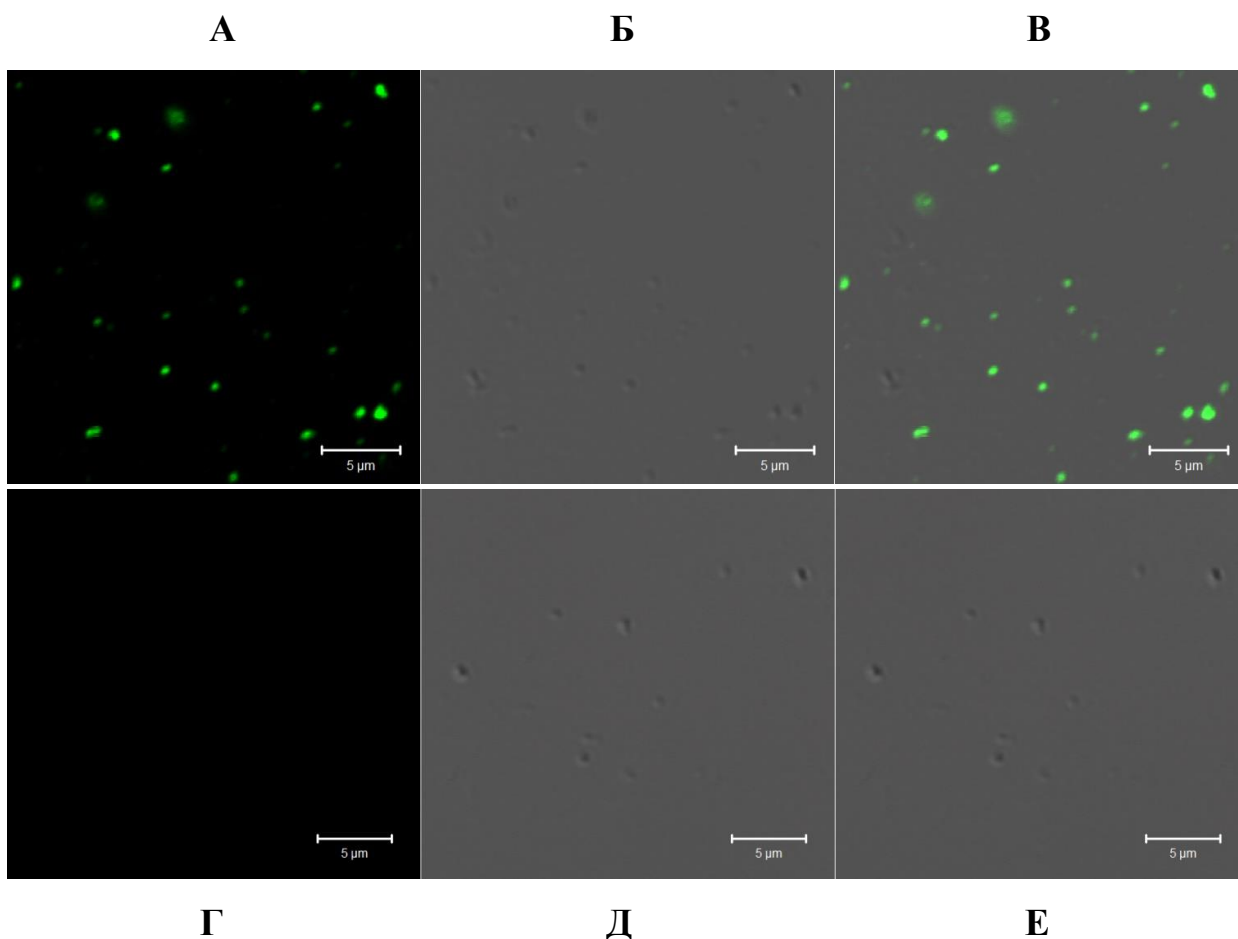


Рисунок 3. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии частиц на основе полимолочной кислоты с диаметром 100 нм: А, Г - флуоресценция при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм, Б, Д - дифференциально-интерференционный контраст, В, Е - совмещенное изображение (А и Б; Г и Д, соответственно)

Аналогичным образом было подтверждено связывание всех типов частиц с $\beta 2M$ -sfGFP. На рисунке 4 представлены частицы на основе ПМК с диаметром 1400 нм, на рисунке 5 – частицы на основе ПМК-ПЭГ с диаметром 100 нм, на рисунке 6 – частицы на основе ПМК-ПЭГ с диаметром 1400 нм.

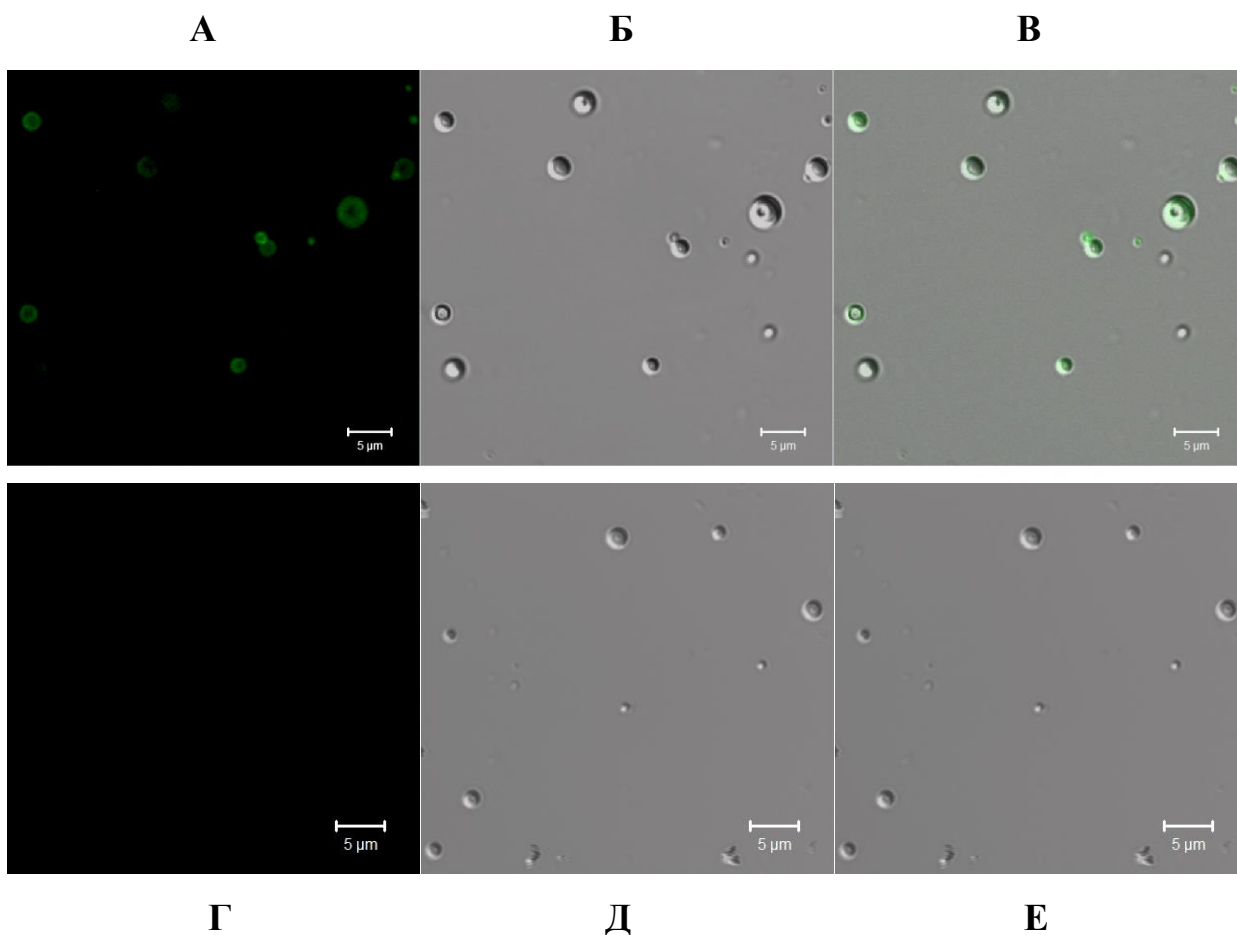


Рисунок 4. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии частиц на основе полимолочной кислоты с диаметром 1400 нм: А, Г - флуоресценция при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм, Б, Д - дифференциально-интерференционный контраст, В, Е - совмещенное изображение (А и Б; Г и Д, соответственно)

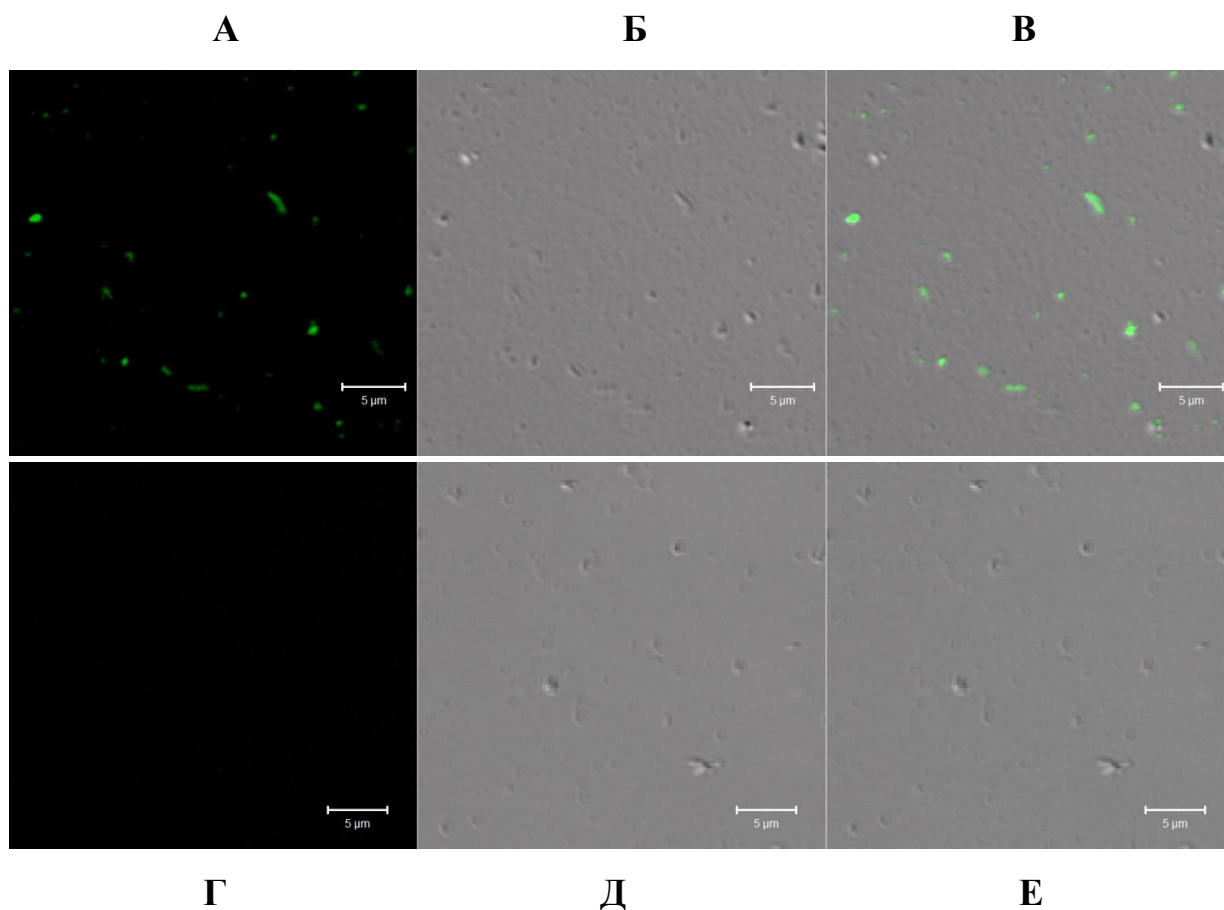


Рисунок 5. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии частиц на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем с диаметром 100 нм: А, Г - флуоресценция при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм, Б, Д - дифференциально-интерференционный контраст, В, Е - совмещенное изображение (А и Б; Г и Д, соответственно)

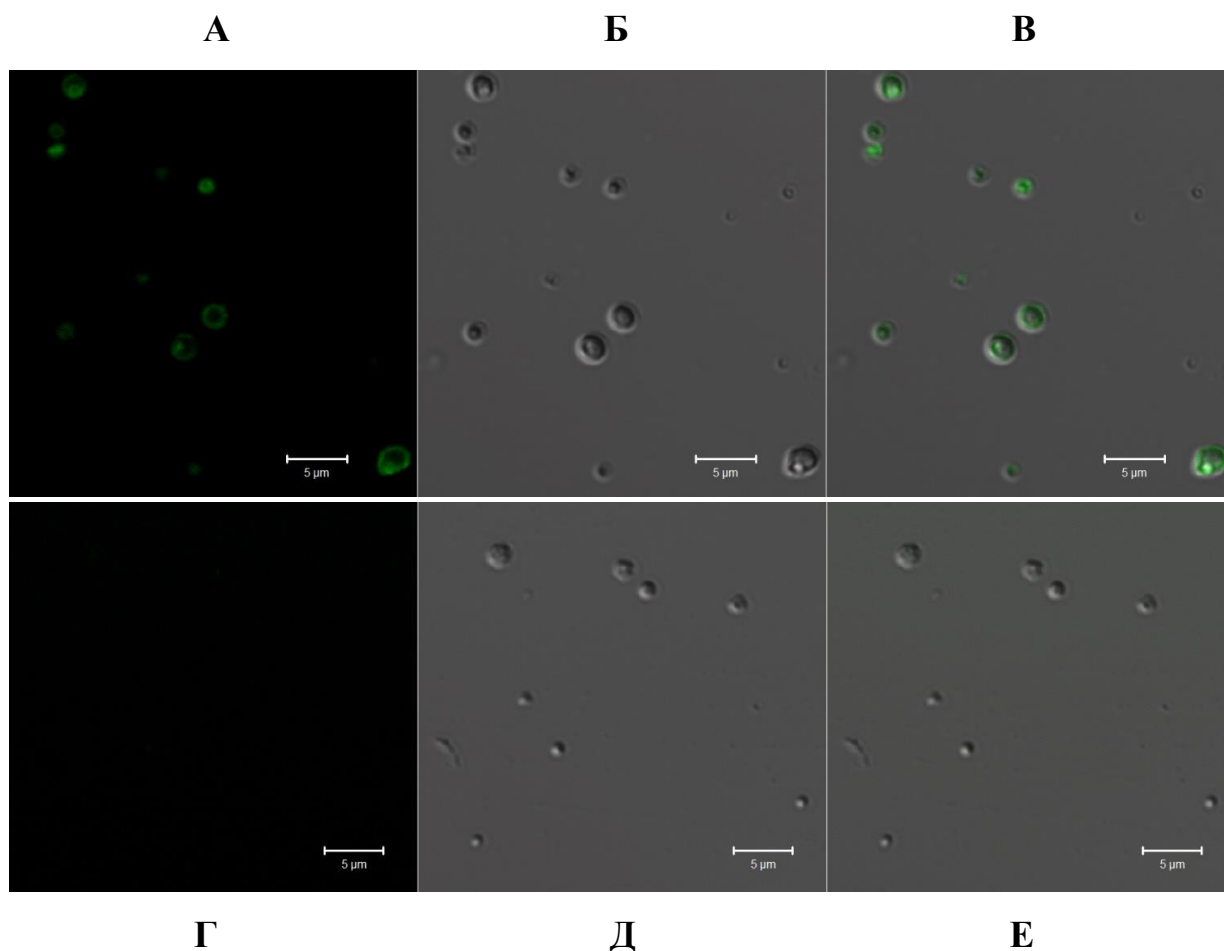


Рисунок 6. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии частиц на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем с диаметром 1400 нм: А, Г - флуоресценция при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм, Б, Д - дифференциально-интерференционный контраст, В, Е - совмещенное изображение (А и Б; Г и Д, соответственно)

Исследование при помощи конфокальной микроскопии подтвердило предположение о том, что используемые нами частицы модифицируются только на поверхности. Внутри частиц метка не проникает. Флуоресценция равномерно распределяется по поверхности частиц.

Полученные конъюгаты представляют собой удобную модель для изучения свойств модифицированных белками частиц.

3.4 Изучение иммуногенности белка β 2M-sfGFP, иммобилизованного на поверхности полимерных частиц

В связи с тем, что конечной целью наших исследований является создание инструмента для захвата вирусных частиц в крови с последующим их фагоцитированием и активацией иммунного ответа, было необходимо выяснить, насколько иммуногенными являются модифицированные белком частицы полимолочной кислоты. Для этих целей были использованы частицы, модифицированные белком слияния β 2M-sfGFP, который наиболее эффективно связывался с матрицей полимолочной кислоты.

В качестве модельного иммуногенного белка использован белок слияния β 2M-sfGFP, в качестве системы детекции иммунного ответа использован sfGFP и антитела к нему. Иммунизацию мышей осуществляли внутрибрюшинно, как описано в разделе М и М.

Для изучения влияния частиц на иммуногенность модельного белка были проиммунизированы 8 равных по численности групп мышей. Иммунизация мышей полученными конъюгатами проводилась по схеме, представленной на рисунке 7. Всего иммунизации были подвергнуты 320 мышей. Половина из них была иммунизирована частицами на основе ПМК двух диаметров – 100 и 1400 нм, связанными с модельным белком. Вторая половина была иммунизирована частицами на основе сополимера ПМК-ПЭГ двух аналогичных диаметров, так же связанных с модельным белком (опытные группы). Для каждой из этих 4 групп были созданы контроли, в которых частицы находились в несвязанном состоянии с модельным белком (контрольные группы).

Четыре иммунизации проводились последовательно с интервалами в две недели с забором крови у мышей спустя 13 дней после каждой иммунизации. После последней 4 иммунизации производился забор в том числе селезёнок.

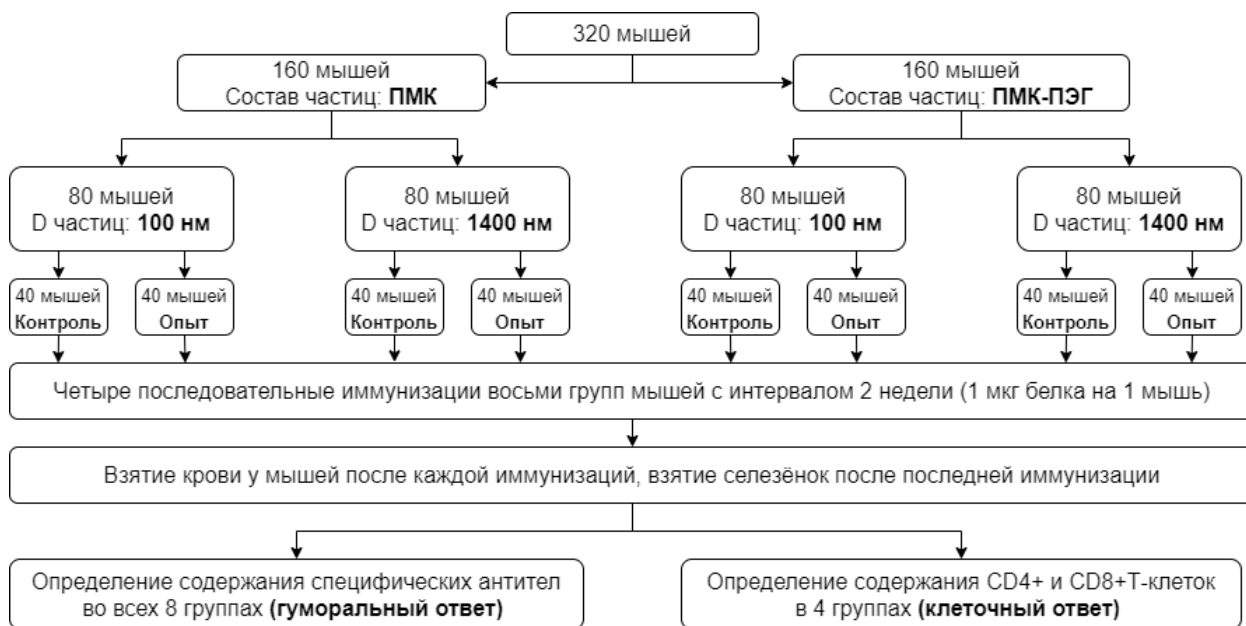


Рисунок 7. Схема эксперимента по изучению иммуногенности комплексов белка β 2M-sfGFP с частицами ПМК и ПМК-ПЭГ

Первая группа была проиммунизирована конъюгатом наночастиц из ПМК (диаметр 100 нм) с β 2M-sfGFP, вторая – смесью этих же немодифицированных частиц и свободного β 2M-sfGFP, таким образом, что количество вводимых частиц и β 2M-sfGFP было идентичным (таблица 1).

Аналогично третья группа была проиммунизирована конъюгатом микрочастиц из ПМК (диаметр 1400 нм) с β 2M-sfGFP, четвёртая – смесью этих же немодифицированных частиц и свободного β 2M-sfGFP.

Пятая группа была проиммунизирована конъюгатом наночастиц из сополимера ПМК-ПЭГ (диаметр 100 нм) с β 2M-sfGFP, шестая – смесью этих же немодифицированных частиц и свободного β 2M-sfGFP.

Седьмая группа была проиммунизирована конъюгатом микрочастиц из сополимера ПМК-ПЭГ (диаметр 1400 нм) с β 2M-sfGFP, восьмая – смесью этих же немодифицированных частиц и свободного β 2M-sfGFP.

Таблица 1. Состав антигена для иммунизаций

Название группы мышей	Состав частиц	Диаметр частиц, нм	Ковалентная связь с β 2М-sfGFP	Свободный белок (β 2М-sfGFP)
ПМК_100	ПМК	100	Да	Нет
ПМК_100_контроль	ПМК	100	Нет	Да
ПМК_1400	ПМК	1400	Да	Нет
ПМК_1400_контроль	ПМК	1400	Нет	Да
ПМК_ПЭГ_100	ПМК-ПЭГ	100	Да	Нет
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК-ПЭГ	100	Нет	Да
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК-ПЭГ	1400	Да	Нет
ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК-ПЭГ	1400	Нет	Да

3.5 Гуморальный иммунный ответ

В качестве системы детекции иммунного ответа использован sfGFP и антитела к нему. Это объясняется тем, что главным фрагментом модельного белка является именно sfGFP, а β 2М играет роль «мостика» между полимерными частицами и зеленым флуоресцентным белком. При этом добавление аминокислотной последовательности β 2М к последовательности sfGFP не нарушает его способности к флуоресценции, но существенно облегчает связывание с частицами.

Для оценки содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках восьми групп мышей был использован иммуноферментный анализ. При помощи критерия Шапиро-Уилка было установлено, что в каждой группе распределение не было нормальным ($p < 0,001$). Поэтому для попарного сравнения восьми групп использовали непараметрический статистический критерий Ньюмена-Кейлса.

3.5.1 Гуморальный иммунный ответ после первой иммунизации

На первом этапе статистической обработки было исследовано влияние частиц разного диаметра (100 и 1400 нм) из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка. Результаты попарного сравнения относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей спустя 2 недели после первой иммунизации приведены в таблице 2.

Было показано, что количество специфических антител к sfGFP в сыворотке крови выше в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц (контрольные группы, а именно «ПМК_100_контроль» и «ПМК_1400_контроль»). При иммунизации конъюгатом частиц и β 2M-sfGFP (группы «ПМК_100» и «ПМК_1400») количество антител к sfGFP было статистически значимо ниже ($p < 0,001$). Также было установлено, что диаметр частиц влияет на иммуногенность связанного с ними белка. Количество антител к sfGFP было статистически значимо выше в группе «ПМК_100» по сравнению с группой «ПМК_1400» (рисунок 8).

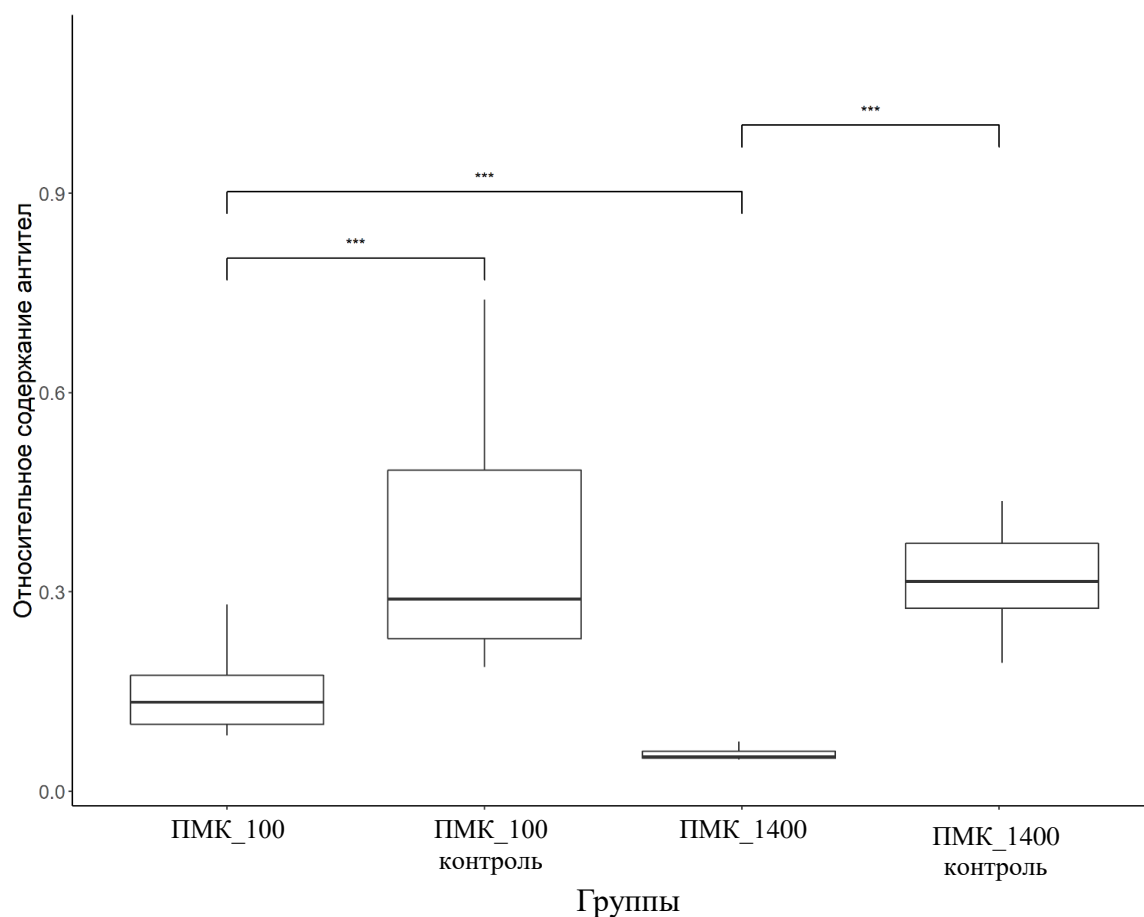


Рисунок 8. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе ПМК (1 иммунизация). *** – P-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 2. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, 1 иммунизация)

Сравниваемые группа		P-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100_контроль	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,9999
ПМК_1400_контроль	ПМК_1400	< 0,0001

На втором этапе статистической обработки было исследовано влияние частиц разного диаметра (100 и 1400 нм) из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля на иммуногенность связанного с ними белка. Результаты попарного сравнения приведены в таблице 3.

Было показано, что количество специфических антител к sfGFP в сыворотке крови было выше в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц (контрольные группы, а именно «ПМК_ПЭГ_100_контроль» и «ПМК_ПЭГ_1400_контроль»). При иммунизации конъюгатом частиц и β 2M-sfGFP (группы «ПМК_ПЭГ_100» и «ПМК_ПЭГ_1400») количество антител к sfGFP было статистически значимо ниже ($p < 0,001$). Было установлено, что диаметр частиц на основе ПМК-ПЭГ влияет на иммуногенность связанного с ними белка. Количество антител к sfGFP было статистически значимо выше в группе «ПМК_ПЭГ_100» по сравнению с группой «ПМК_ПЭГ_1400» (рисунок 9).

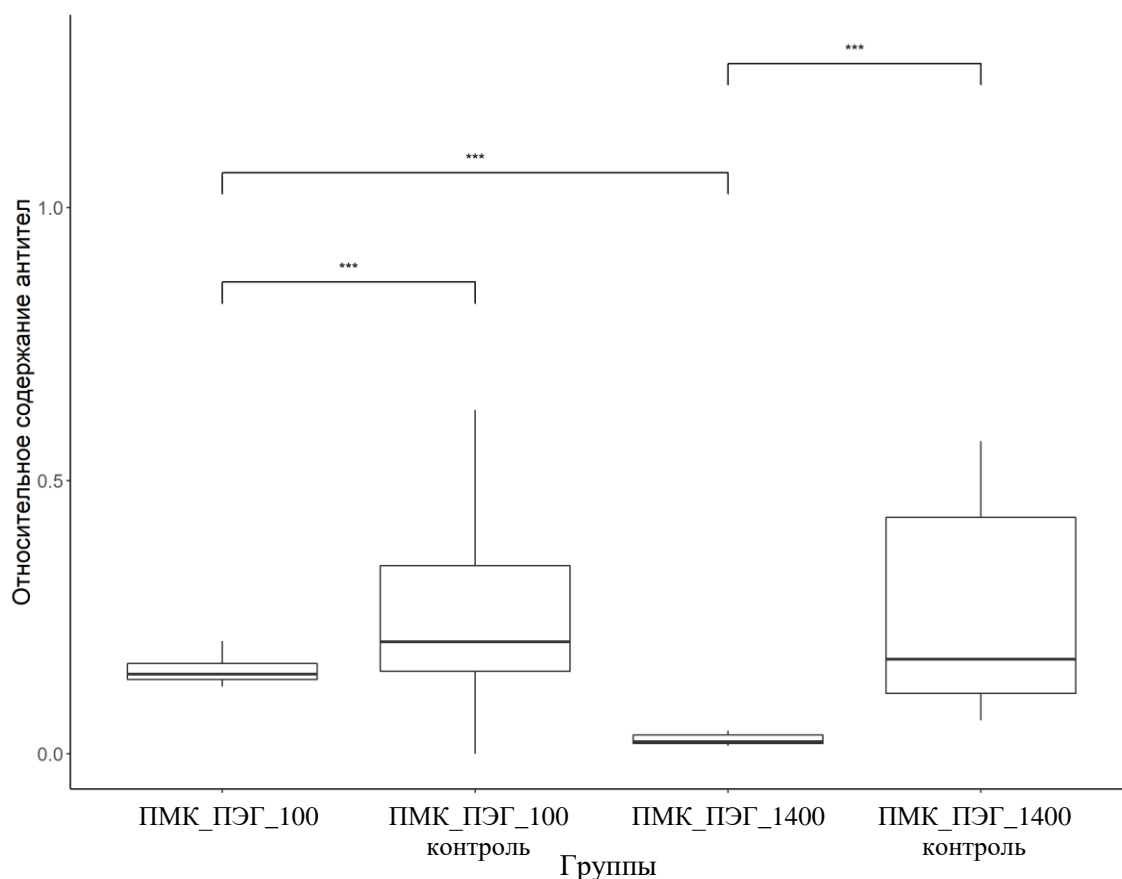


Рисунок 9. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе сополимера ПМК-ПЭГ (1 иммунизация). *** – P-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 3. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК-ПЭГ, 1 иммунизация)

Сравниваемые группа		P-уровень значимости
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0,3523
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	< 0,0001

На третьем этапе статистической обработки было исследовано влияние состава полимерных частиц разного диаметра (100 и 1400 нм) и состава (ПМК и ПМК-ПЭГ) на иммуногенность связанного с ними белка. Результаты попарного сравнения приведены в таблице 4.

Было показано, что количество специфических антител к sfGFP в сыворотке крови зависит только от размера частиц, а не от их состава (рисунок 10). Количество антител к sfGFP статистически не отличалось между группами, которые были иммунизированы частицами одного размера, но разных составов («ПМК_100» и «ПМК_ПЭГ_100»; «ПМК_1400» и «ПМК_ПЭГ_1400» соответственно).

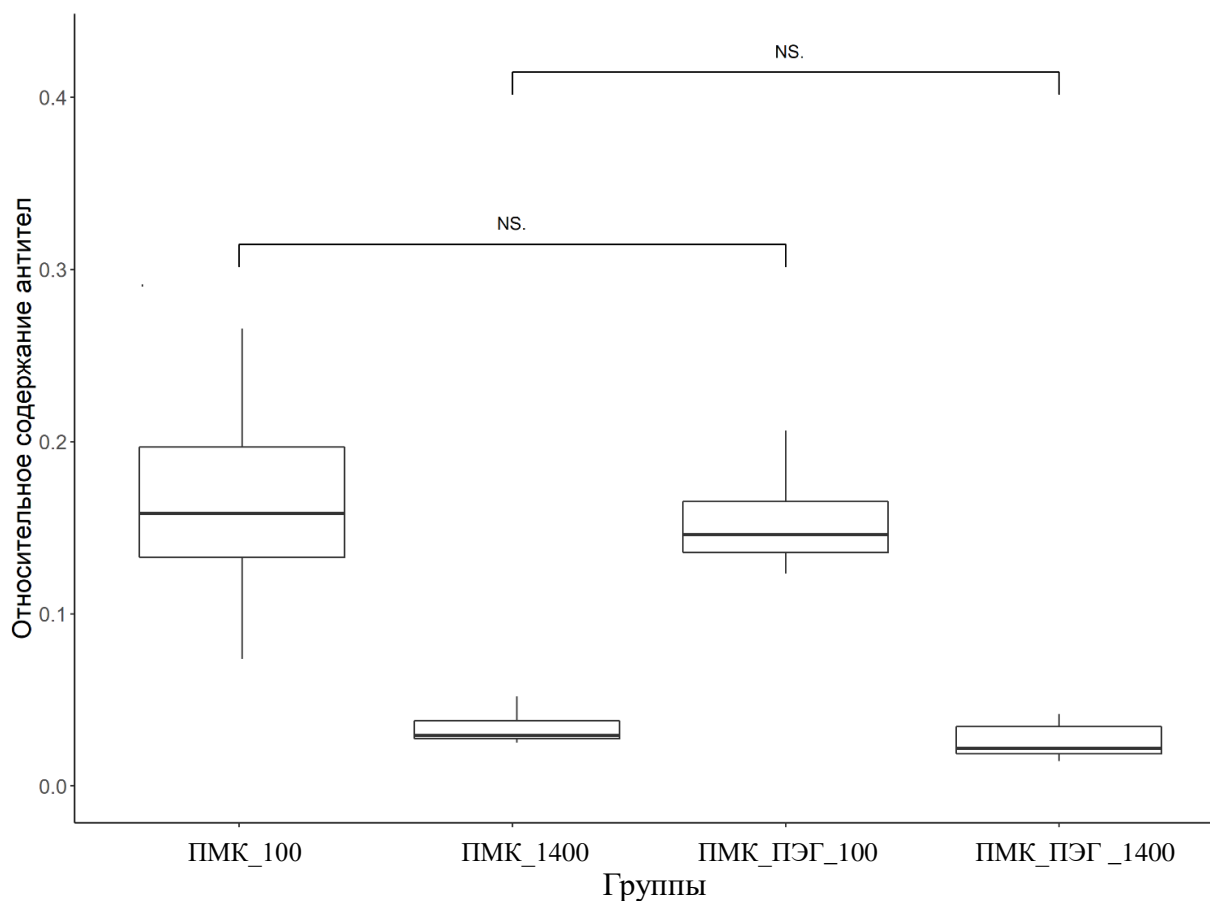


Рисунок 10. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе ПМК и сополимера ПМК-ПЭГ (1 иммунизация). NS - различия незначимы ($p > 0.001$)

Таблица 4. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, ПМК-ПЭГ, 1 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100	ПМК_1400	< 0,0001
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_100	0,0515
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_1400	0,0576
ПМК_ПЭГ_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001

Также было установлено, что все контрольные группы между собой статистически не отличаются (таблица 5).

Таблица 5. Результаты попарного сравнения контрольных групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (1 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,9999
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0,3697
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,0570
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,3964
ПМК_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,0522
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,4447

Аналогичным образом были произведены расчеты для второй (пункт 3.5.2), третьей (пункт 3.5.3) и четвёртой (пункт 3.5.4) иммунизаций. В контрольных группах наблюдается более высокое содержание антител к модельному белку на всех этапах иммунизации. В опытных группах частицы с диаметром 100 нм более иммуногенны по сравнению с частицами с

диаметром 1400 нм. Состав частиц (ПМК, ПМК-ПЭГ) на иммуногенность связанного с ними белка не влияет.

Графики и таблицы с результатами сравнения представлены ниже.

3.5.2 Гуморальный иммунный ответ после второй иммунизации

Результаты попарного сравнения относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей спустя 2 недели после второй иммунизации схожи с результатами, которые были получены после первой иммунизации. В контрольных группах наблюдается более высокое содержание антител к модельному белку. Количество антител к sfGFP в опытных группах было статистически значимо выше в группе «ПМК_100» по сравнению с группой «ПМК_1400» (рисунок 11). Результаты попарного сравнения приведены в таблице 6.

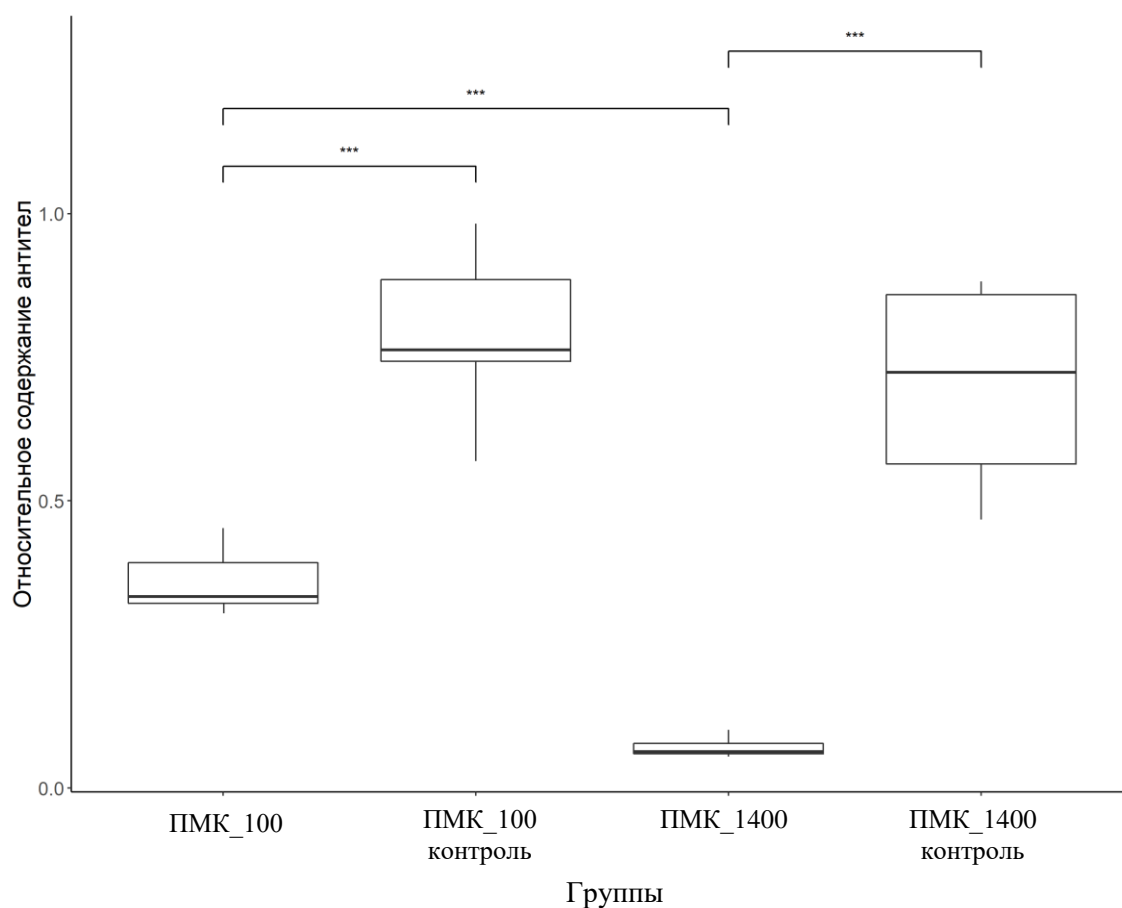


Рисунок 11. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе ПМК (2 иммунизация). *** – P-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 6. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, 2 иммунизация)

Сравниваемые группа		P-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100_контроль	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,9843
ПМК_1400_контроль	ПМК_1400	< 0,0001

Количество антител к sfGFP было статистически значимо выше в группе «ПМК_ПЭГ_100» по сравнению с группой «ПМК_ПЭГ_1400» (рисунок 12, таблица 7).

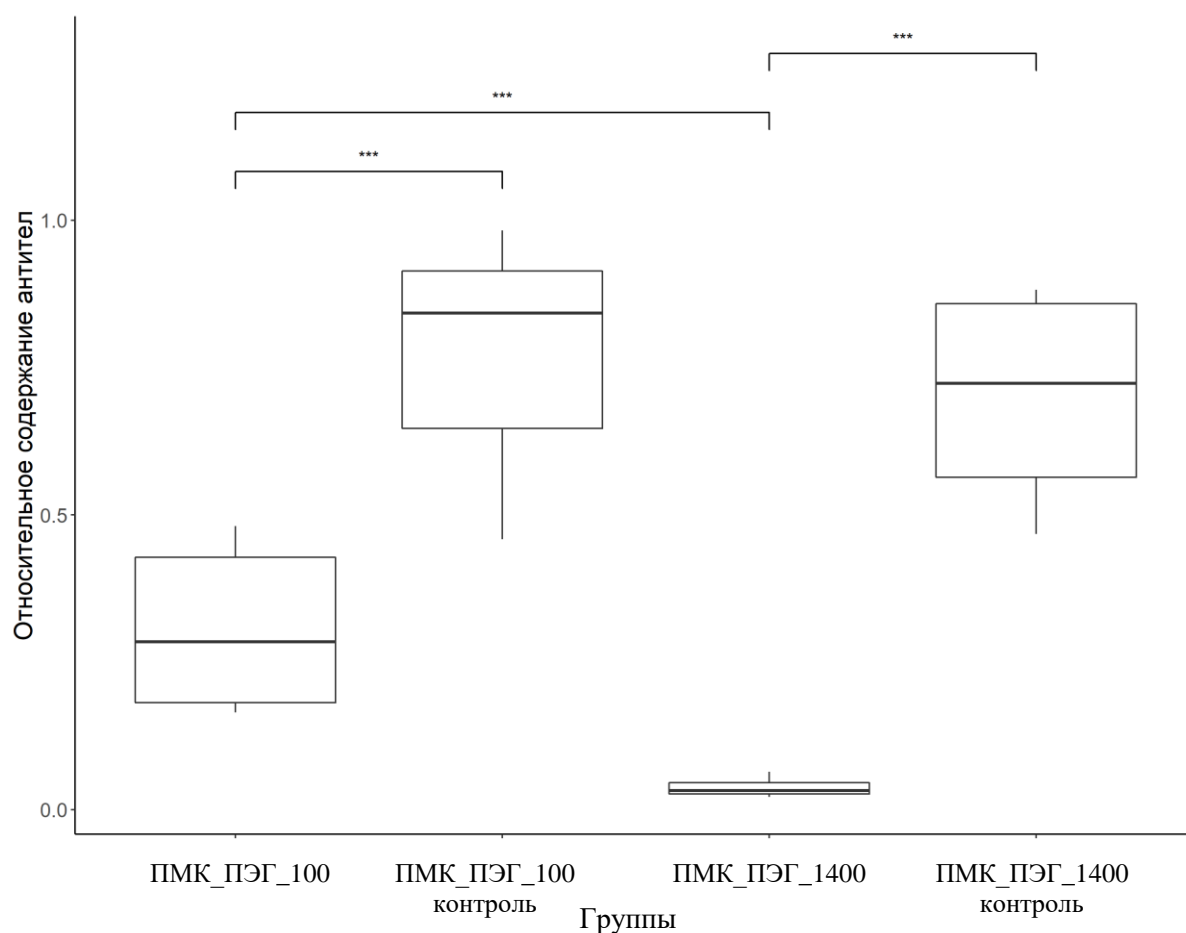


Рисунок 12. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе сополимера ПМК-ПЭГ (2 иммунизация). *** – Р-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 7. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК-ПЭГ, 2 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001

ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0.9566
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	< 0,0001

Аналогичным образом было исследовано влияние состава полимерных частиц разного диаметра (100 и 1400 нм) на иммуногенность связанного с ними белка. Результаты попарного сравнения приведены в таблице 8.

Было показано, что количество специфических антител к sfGFP в сыворотке крови зависит только от размера частиц, а не от их состава (рисунок 13). Количество антител к sfGFP статистически не отличалось между группами, которые были иммунизированы частицами одного размера, но разных составов («ПМК_100» и «ПМК_ПЭГ_100»; «ПМК_1400» и «ПМК_ПЭГ_1400» соответственно).

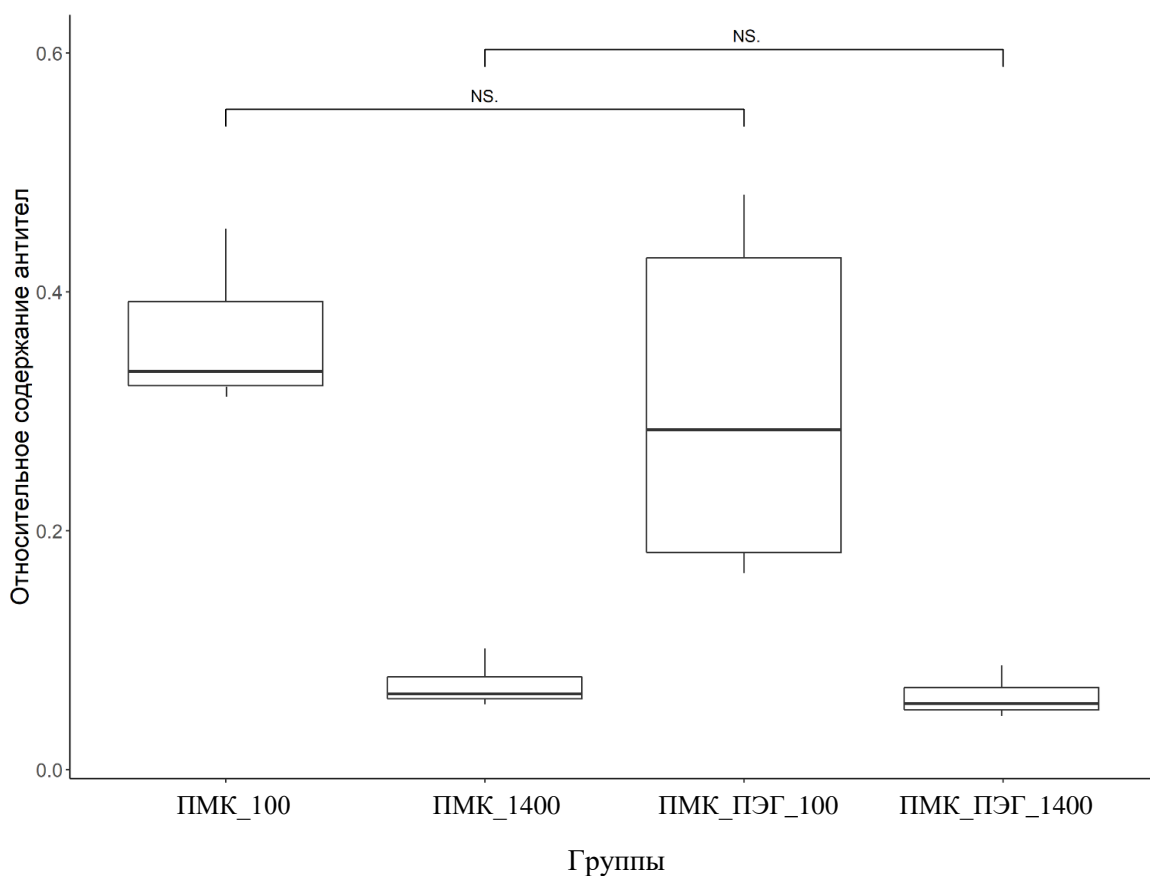


Рисунок 13. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе ПМК и сополимера ПМК-ПЭГ (2 иммунизация). NS - различия незначимы ($p > 0.001$)

Таблица 8. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, ПМК-ПЭГ, 2 иммунизация)

Сравниваемые группа		P-уровень значимости
ПМК_100	ПМК_1400	< 0,0001
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_100	0,9999
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_1400	0,0892
ПМК_ПЭГ_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001

Также было установлено, что все контрольные группы между собой статистически не отличаются (таблица 9).

Таблица 9. Результаты попарного сравнения контрольных групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (2 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,9064
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0,9950
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,9046
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,8751
ПМК_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	1,0000
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,8758

3.5.3 Гуморальный иммунный ответ после третьей иммунизации

Результаты попарного сравнения относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей спустя 2 недели после третьей иммунизации схожи с результатами, которые были получены после первой и второй иммунизаций. Количество антител к sfGFP было статистически значимо выше в группе «ПМК_100» по сравнению с группой «ПМК_1400» (рисунок 14). Результаты попарного сравнения приведены в таблице 10.

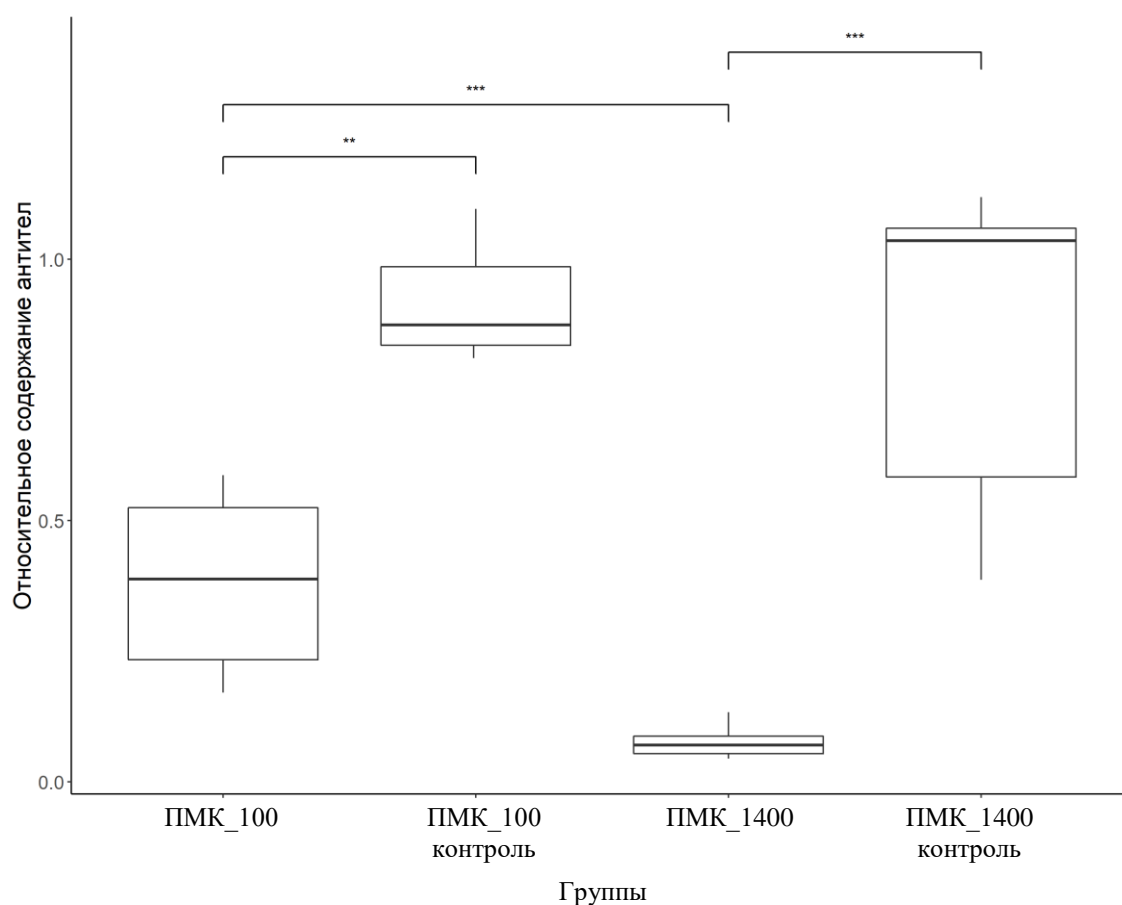


Рисунок 14. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе ПМК (3 иммунизация). *** – Р-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 10. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, 3 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100_контроль	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,9999
ПМК_1400_контроль	ПМК_1400	< 0,0001

Количество антител к sfGFP было статистически значимо выше в группе «ПМК_ПЭГ_100» по сравнению с группой «ПМК_ПЭГ_1400» (рисунок 15, таблица 11).

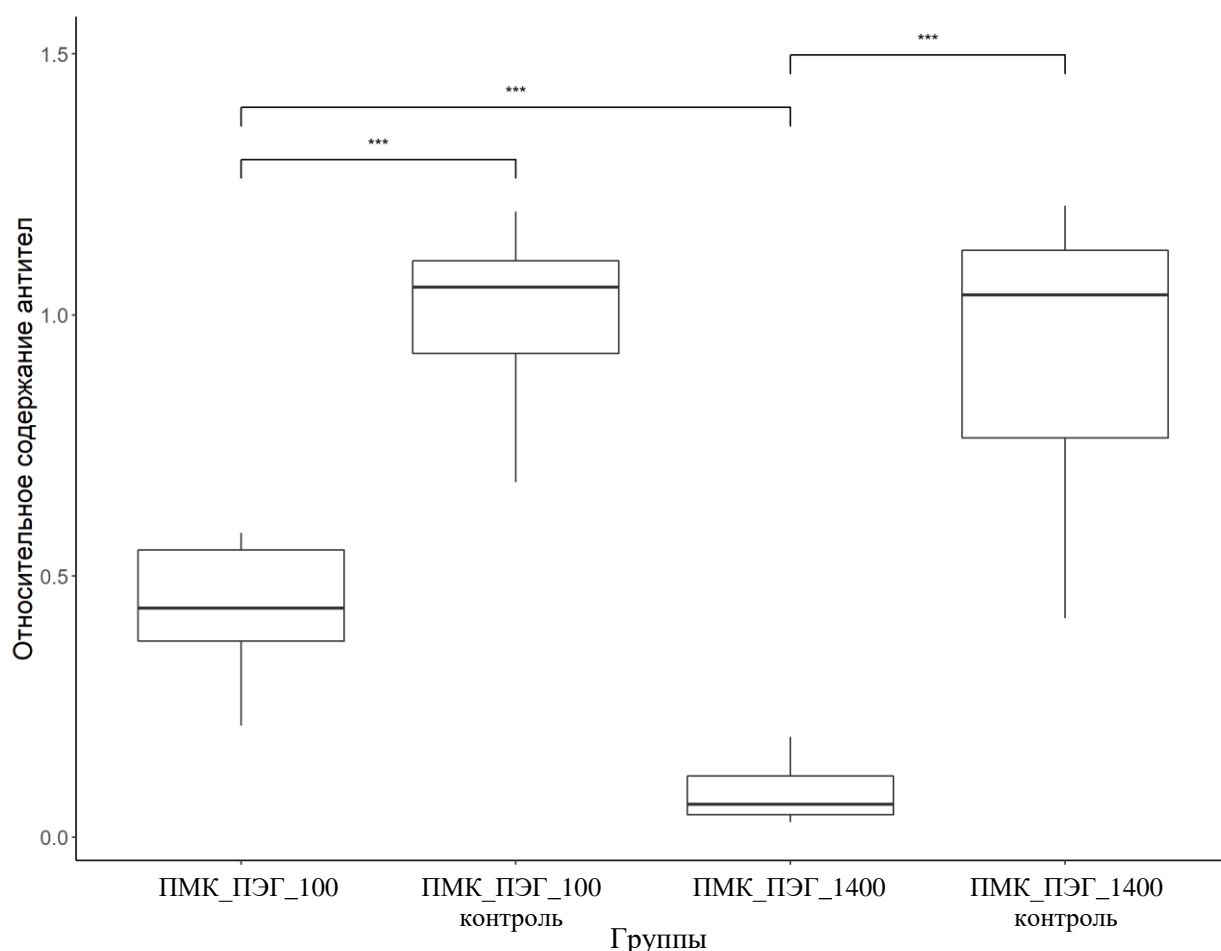


Рисунок 15. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе сополимера ПМК-ПЭГ (3 иммунизация). *** – P-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 11. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК-ПЭГ, 3 иммунизация)

Сравниваемые группа		P-уровень значимости
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001

ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0,9901
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	< 0,0001

Аналогичным образом было исследовано влияние состава полимерных частиц разного диаметра (100 и 1400 нм) на иммуногенность связанного с ними белка. Результаты попарного сравнения приведены в таблице 12.

Было показано, что количество специфических антител к sfGFP в сыворотке крови зависит только от размера частиц, а не от их состава (рисунок 16). Количество антител к sfGFP статистически не отличалось между группами, которые были иммунизированы частицами одного размера, но разных составов («ПМК_100» и «ПМК_ПЭГ_100»; «ПМК_1400» и «ПМК_ПЭГ_1400» соответственно).

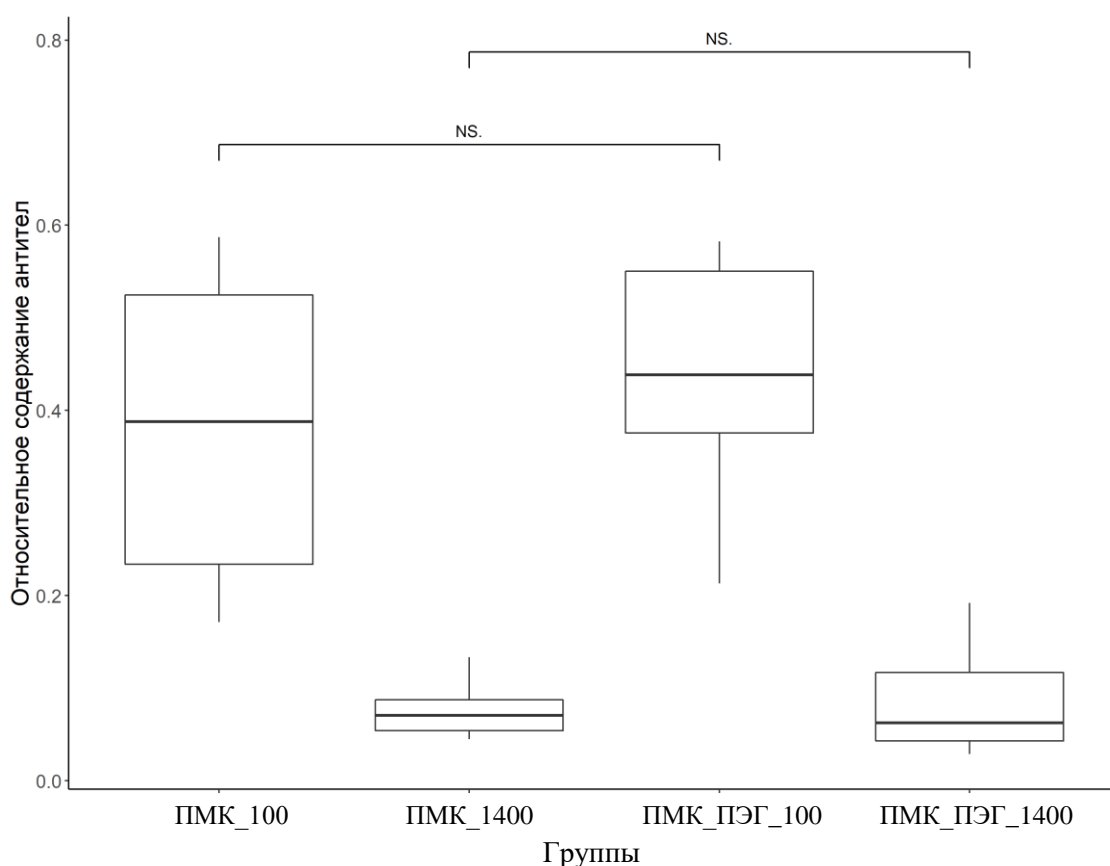


Рисунок 16. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных

частицами разного диаметра на основе ПМК и сополимера ПМК-ПЭГ (3 иммунизация). NS - различия незначимы ($p > 0.001$)

Таблица 12. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, ПМК-ПЭГ, 3 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100	ПМК_1400	< 0,0001
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_100	0,9938
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_1400	0,5726
ПМК_ПЭГ_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001

Также было установлено, что все контрольные группы между собой статистически не отличаются (таблица 13).

Таблица 13. Результаты попарного сравнения контрольных групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (3 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,9740
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0,5199
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,6462
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,8079
ПМК_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,9007
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,9772

3.5.4 Гуморальный иммунный ответ после четвёртой иммунизации

Результаты попарного сравнения относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей спустя 2 недели после четвёртой иммунизации схожи с результатами, которые были получены после первой, второй и третьей иммунизаций. В контрольных группах наблюдается более высокое содержание антител к модельному белку. В опытных группах частицы с меньшим размером более иммуногенны по сравнению с крупными частицами (рисунок 17). Результаты попарного сравнения приведены в таблице 14.

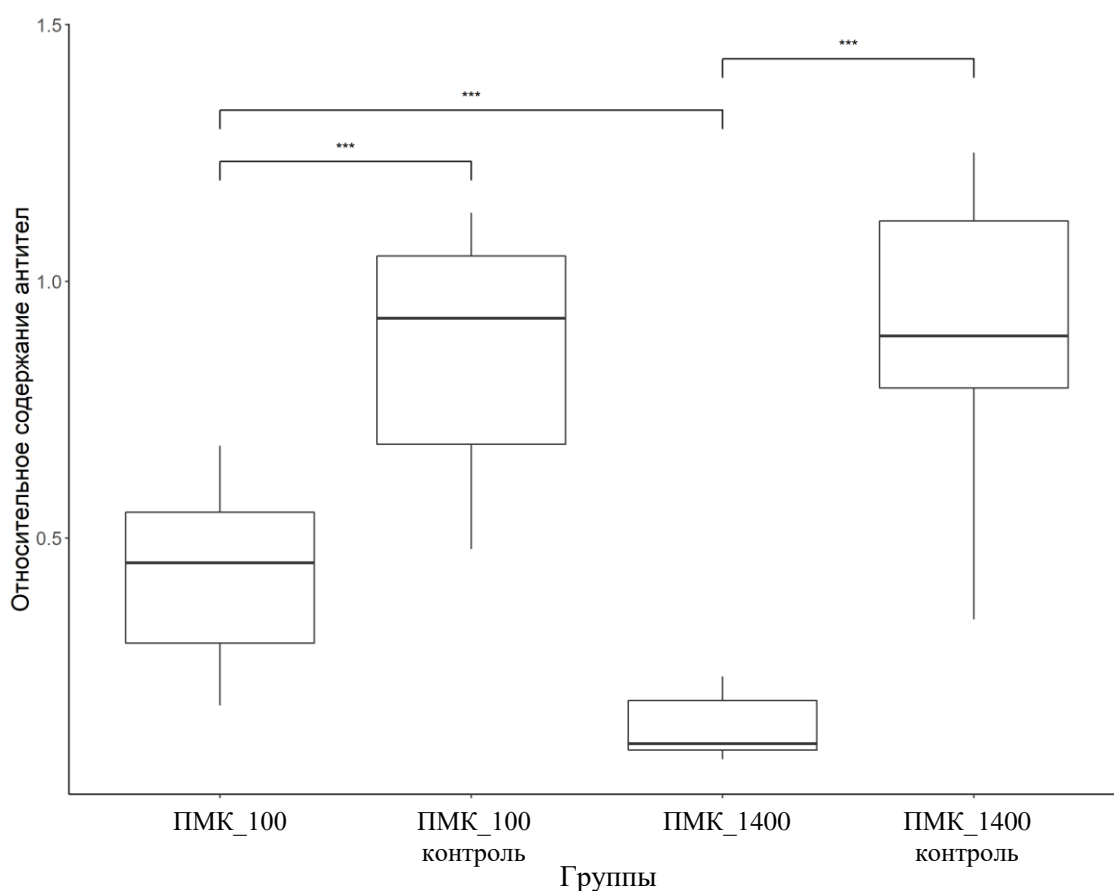


Рисунок 17. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе ПМК (4 иммунизация). *** – P-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 14. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, 4 иммунизация)

Сравниваемые группа		P-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_100_контроль	< 0,0001
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,9951
ПМК_1400_контроль	ПМК_1400	< 0,0001

Количество антител к sfGFP было статистически значимо выше в группе «ПМК_ПЭГ_100» по сравнению с группой «ПМК_ПЭГ_1400» (рисунок 18, таблица 15).

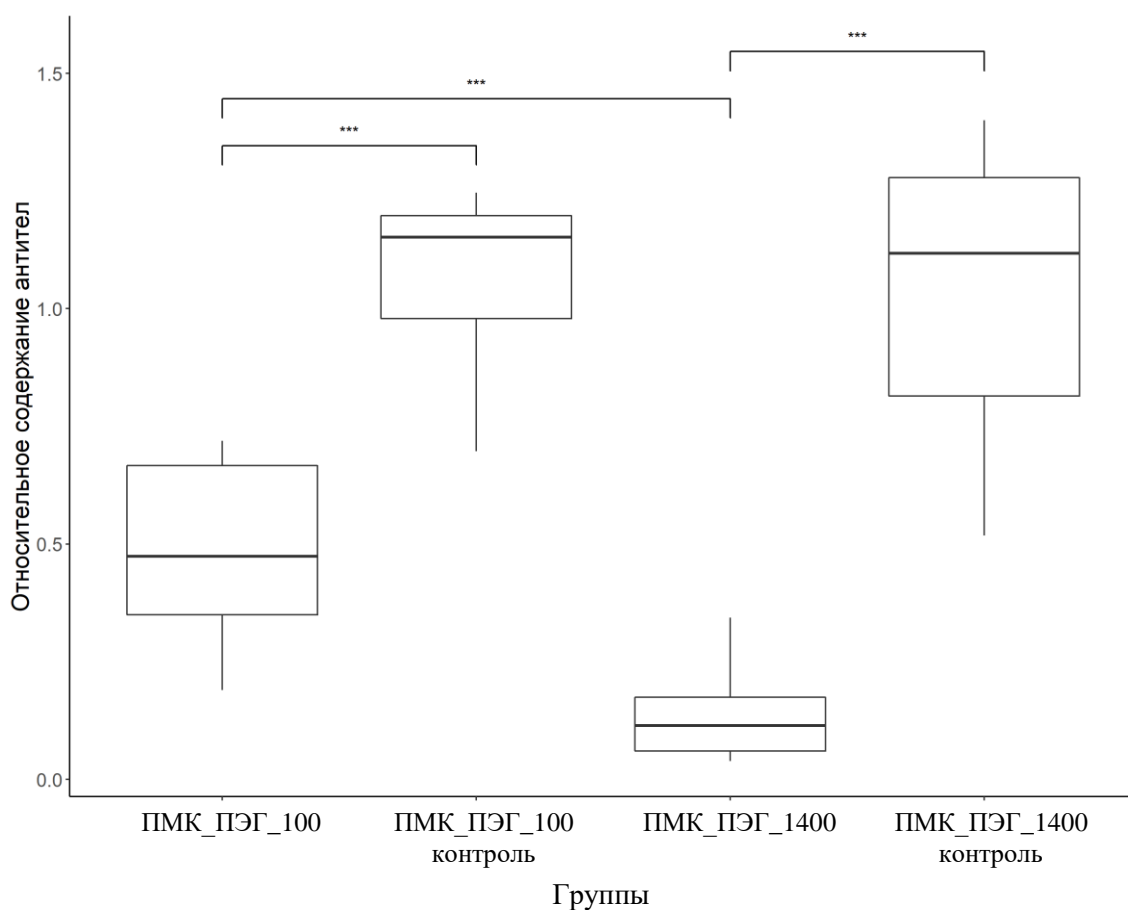


Рисунок 18. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе сополимера ПМК-ПЭГ (4 иммунизация). *** – Р-уровень значимости меньше 0,001

Таблица 15. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК-ПЭГ, 4 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль	< 0,0001
ПМК_ПЭГ_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0,9861

ПМК_ПЭГ_1400	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	< 0,0001
--------------	-----------------------	----------

Аналогичным образом было исследовано влияние состава полимерных частиц разного диаметра (100 и 1400 нм) на иммуногенность связанного с ними белка. Результаты попарного сравнения приведены в таблице 16.

Было показано, что количество специфических антител к sfGFP в сыворотке крови зависит только от размера частиц, а не от их состава (рисунок 19). Количество антител к sfGFP статистически не отличалось между группами, которые были иммунизированы частицами одного размера, но разных составов («ПМК_100» и «ПМК_ПЭГ_100»; «ПМК_1400» и «ПМК_ПЭГ_1400» соответственно).

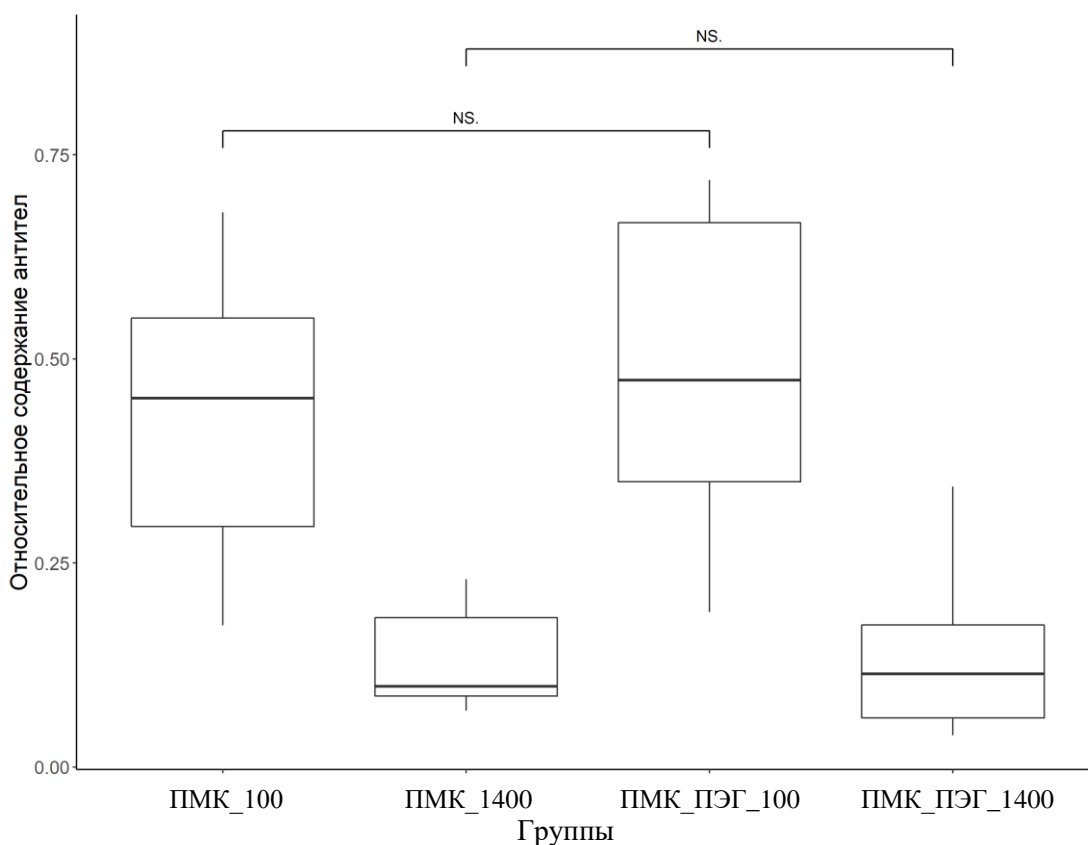


Рисунок 19. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках мышей, иммунизированных частицами разного диаметра на основе ПМК и сополимера ПМК-ПЭГ (4 иммунизация). NS - различия незначимы ($p > 0.001$)

Таблица 16. Результаты попарного сравнения групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (ПМК, ПМК-ПЭГ, 4 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100	ПМК_1400	< 0,0001
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_100	0,9769
ПМК_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_100	< 0,0001
ПМК_1400	ПМК_ПЭГ_1400	0,9333
ПМК_ПЭГ_100	ПМК_ПЭГ_1400	< 0,0001

Также было установлено, что все контрольные группы между собой статистически не отличаются (таблица 17).

Таблица 17. Результаты попарного сравнения контрольных групп при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса (4 иммунизация)

Сравниваемые группа		Р-уровень значимости
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,8556
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100_контроль	0,2492
ПМК_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,0983
ПМК_1400_контроль	ПМК_100_контроль	0,2185
ПМК_1400_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,1673
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_1400_контроль	0,9853

3.5.5 Оценка относительного содержания специфических антител после введения антигена, находящегося на поверхности микро- и наночастиц на основе ПМК и сополимера ПМК-ПЭГ во всех 4 иммунизациях

На рисунке 20 представлены суммарные результаты относительного содержания специфических антител к модельному белку во всех четырёх иммунизациях в группах мышей, которые были иммунизированы частицами на основе ПМК разных диаметров 100 и 1400 нм.

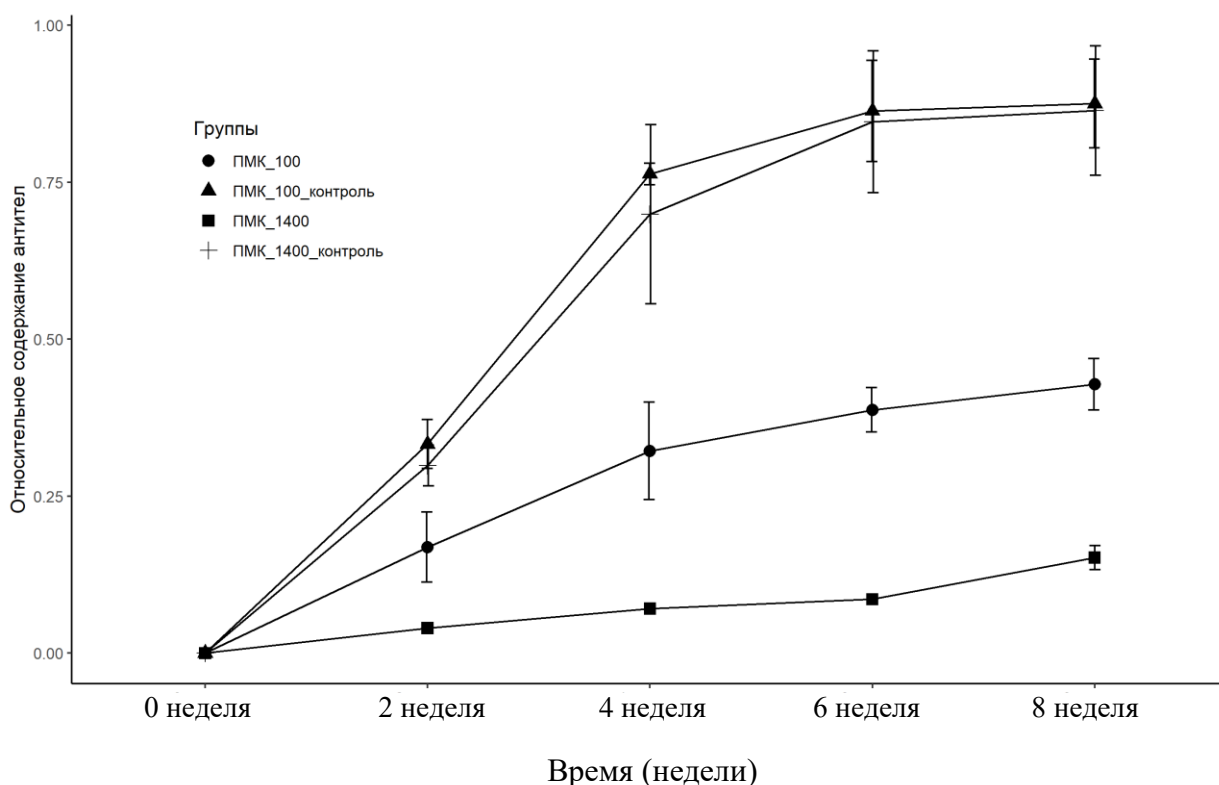


Рисунок 20. Оценка относительного содержания специфических антител после введения антигена, находящегося на поверхности микро- и наночастиц на основе полимолочной кислоты во всех четырёх иммунизациях. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами.

- - Конъюгат белка с частицами на основе ПМК с диаметром 100 нм;
- ▲ - Смесь белка с частицами на основе ПМК с диаметром 100 нм;
- - Конъюгат белка с частицами на основе ПМК с диаметром 1400 нм;
- + - Смесь белка с частицами на основе ПМК с диаметром 1400 нм

В контрольных группах наблюдается более высокое содержание антител к модельному белку. В опытных группах частицы с меньшим размером (100 нм) более иммуногенны по сравнению с крупными частицами (1400 нм).

При иммунизации мышей частицами на основе сополимера ПМК-ПЭГ картина распределения специфических антител была аналогичной (рисунок 21).

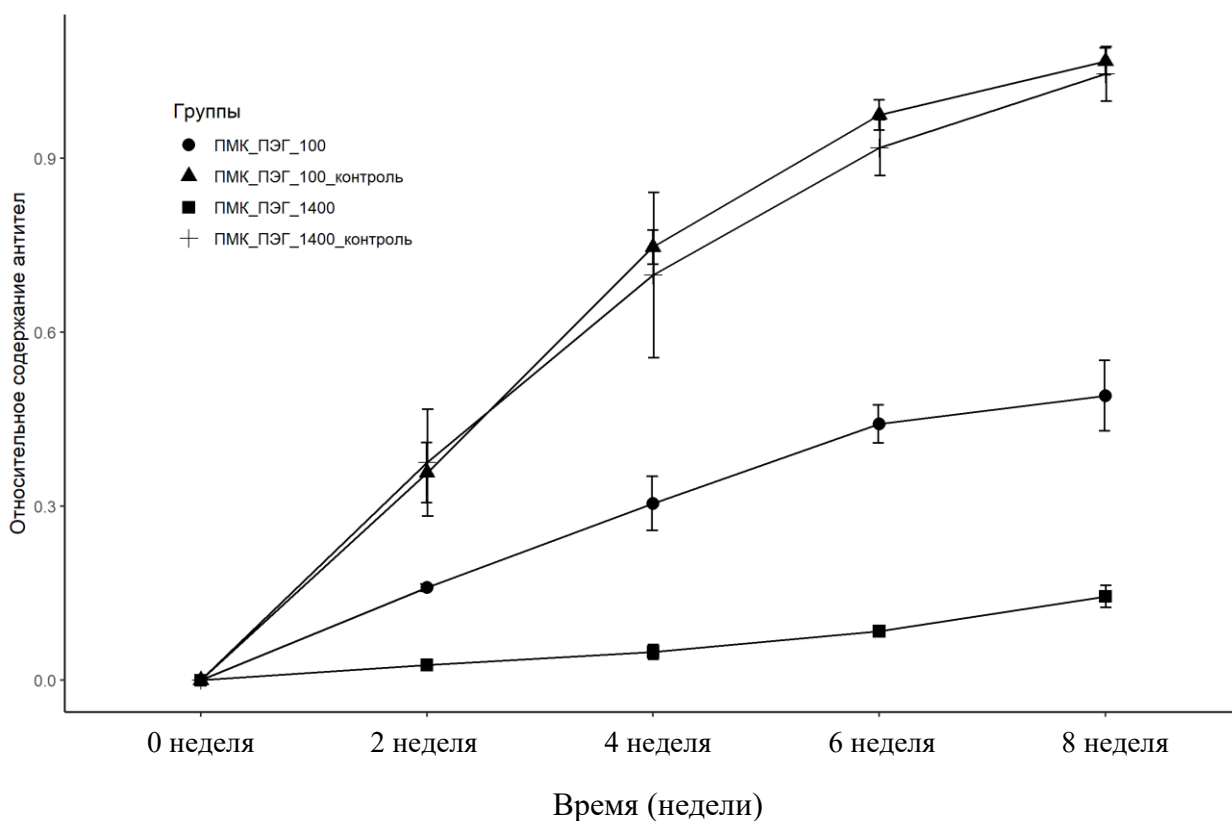


Рисунок 21. Оценка относительного содержания специфических антител после введения антигена, находящегося на поверхности микро- и наночастиц на основе сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля во всех четырёх иммунизациях. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами. ● - Конъюгат белка с частицами на основе сополимера ПМК-ПЭГ с диаметром 100 нм; ▲ - Смесь белка с частицами на основе сополимера ПМК-ПЭГ с диаметром 100 нм; ■ - Конъюгат белка с

частицами на основе сополимера ПМК-ПЭГ с диаметром 1400 нм; + - Смесь белка с частицами на основе сополимера ПМК-ПЭГ с диаметром 1400 нм

В контрольных группах наблюдается более высокое содержание специфических антител к sfGFP на всех этапах иммунизаций. В опытных группах частицы с размером 100 нм более иммуногенны по сравнению с частицами с размером 1400 нм.

3.6 Клеточный иммунный ответ

Для изучения влияния частиц на иммуногенность модельного белка были проиммунизированы 4 равные по численности группы мышей (по 15 мышей в каждой группе, всего 60). Первая группа была проиммунизирована смесью немодифицированных частиц из ПМК-ПЭГ (диаметр 100 нм) и свободного β 2M-sfGFP, вторая – конъюгатом этих же частиц с β 2M-sfGFP, таким образом, что количество вводимых частиц и β 2M-sfGFP было идентичным. Аналогично третья группа была проиммунизирована смесью частиц из ПМК (диаметр 1400 нм) и β 2M-sfGFP, четвертая – конъюгатом частиц такого типа с β 2M-sfGFP (таблица 18). Также была введена пятая группа интактных (наивных) мышей, которые не подвергались иммунизациям (15 мышей).

Таблица 18. Состав антигена для иммунизаций.

Название группы мышей	Состав частиц	Диаметр частиц, нм	Модификация частиц (ковалентная связь с β 2M-sfGFP)	Свободный белок (β 2M-sfGFP)
ПМК_ПЭГ_100	ПМК-ПЭГ	100	Да	Нет
ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК-ПЭГ	100	Нет	Да
ПМК_1400	ПМК	1400	Да	Нет

ПМК_1400_контроль	ПМК	1400	Нет	Да
Наивные мыши	-	-	-	-

Была проведена четырехкратная иммунизация мышей с интервалами в 2 недели. Забор образцов селезёнки осуществлялся через 13 дней после последней иммунизации. Клетки мышинных селезёнок были охарактеризованы при помощи антител к CD3, CD4, CD8 и антител к IFN γ . Для выявления специфических к антигену Т-клеток, продуцирующих интерферон, использовали общепринятый метод внутриклеточного окрашивания цитокинов. Для последующего анализа популяций Т-лимфоцитов был использован метод проточной цитофлуориметрии.

Относительное содержание специфических к белку sfGFP IFN γ ⁺-лимфоцитов определяли для следующих субпопуляций клеток: CD4⁺ Т-клетки (IFN γ ⁺CD3⁺CD4⁺) и CD8⁺ Т-клетки (IFN γ ⁺CD3⁺CD8⁺) (рисунок 22).

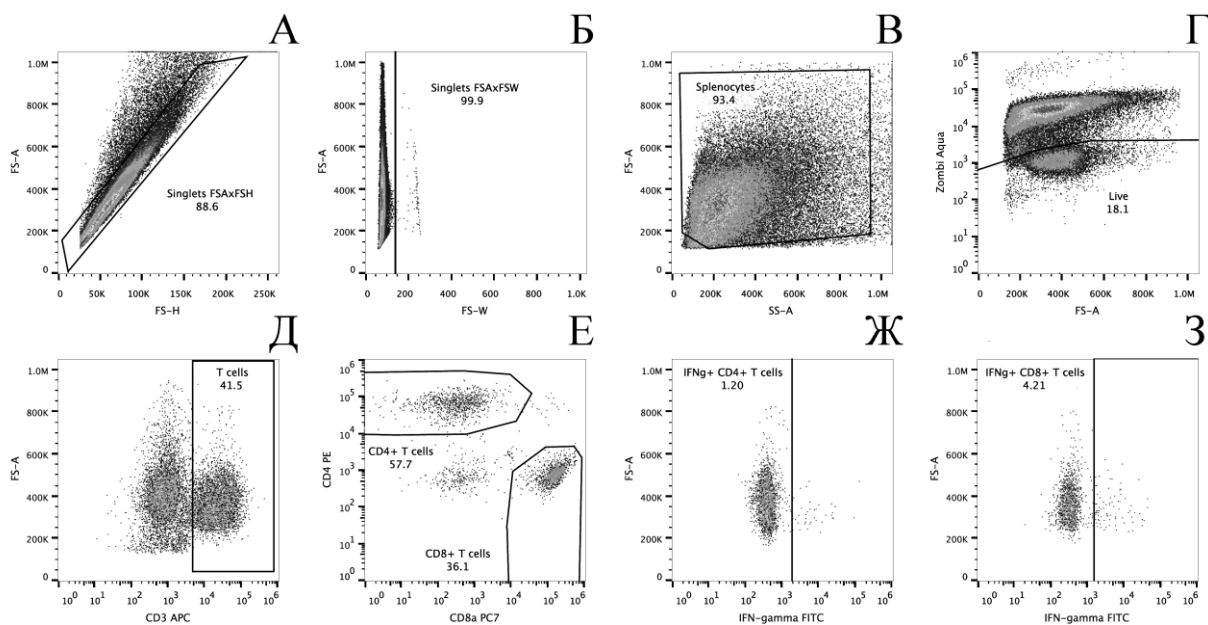


Рисунок 22. Выявление антиген-специфических Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов при помощи многоцветной проточной цитометрии. А – исключение из зоны анализа слипшихся клеток на основании пикового (ось x) и интегрального (ось y) сигналов прямого светорассеяния (одиночные клетки располагаются в области “Singlets

FSAxFSH”); Б – исключение из зоны анализа слипшихся клеток на основании ширины пика(ось x) и интегрального (ось y) сигналов прямого светорассеяния (одиночные клетки располагаются в области “Singlets FSAxFSW”); В – выявление спленоцитов на основании параметров бокового (ось y) и прямого (ось x) светорассеяния (в области “Splenocytes” располагаются одиночные спленоциты, которые анализируются на последующей гистограмме); Г – удаление из зоны анализа погибших клеток на основании включения красителя Zombie Aqua (область “Live” содержит живые одиночные спленоциты); Д – выявление Т-лимфоцитов на основании экспрессии CD3 (область “T cells” содержит Т-лимфоциты); Е – разделение Т-лимфоцитов на Т-хелперы (фенотип CD3+CD4+, область “CD4+ T cells”) и цитотоксические Т-лимфоциты (фенотип CD3+CD8+, область “CD8+ T cells”); гистограммы Ж и З – продукция IFN γ Т-хелперами и цитотоксическими Т-лимфоцитами в ответ на стимуляцию *in vitro*, соответственно (область “IFN γ + CD4+ T cells” на гистограмме Ж и область “IFN γ + CD8+ T cells” на гистограмме З, соответственно)

3.6.1 Оценка относительного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток в группах, которые были иммунизированы частицами ПМК-ПЭГ 100 нм

Для оценки клеточного ответа был использован метод проточной цитометрии. При помощи критерия Шапиро-Уилка было установлено, что в каждой группе распределение не было нормальным ($p < 0,001$). Поэтому для попарного сравнения четырёх групп использовали непараметрический статистический критерий Ньюмена-Кейлса. Результаты попарного сравнения приведены в таблице 19.

На рисунке 23 показано, что количество антигенспецифических Т-клеток иммунологической памяти фенотипа CD4+ (Т-хелперы) и количество антигенспецифических CD8+ Т-клеток (цитотоксические Т-лимфоциты), продуцирующих IFN γ , статистически значимо ($p < 0,001$) ниже в случае

иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц (контрольные группы, а именно «ПМК_ПЭГ_100_контроль») по сравнению с группами, которые были иммунизированы конъюгатом частиц и β 2M-sfGFP (группы «ПМК_ПЭГ_100»).

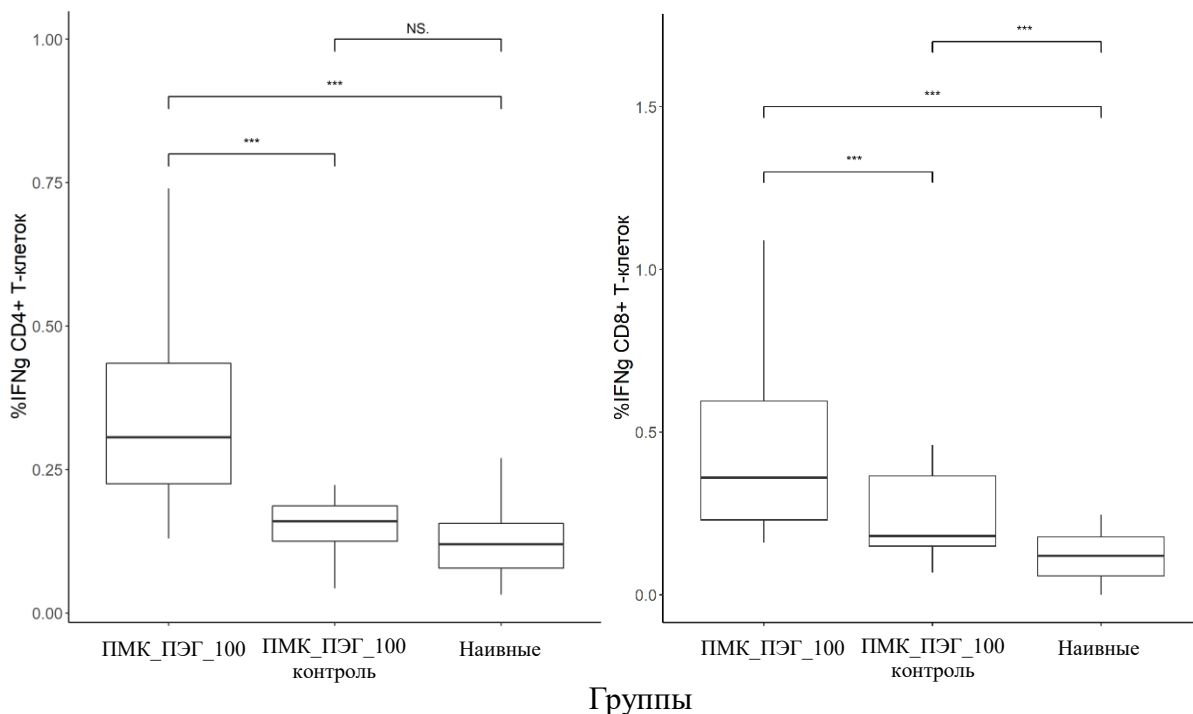


Рисунок 23. Оценка относительного содержания антигенспецифических CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток к модельному белку sfGFP у мышей. *** – Р-уровень значимости меньше 0,001. NS - различия незначимы ($p > 0.001$)

Таблица 19. Результаты статистического анализа CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса

Тип клеток	Сравниваемые группы		Р-уровень значимости
CD4+ Т-лимфоциты	ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,001
	ПМК_ПЭГ_100	Наивные	< 0,001
	ПМК_ПЭГ_100_контроль	Наивные	0,476
CD8+ Т-лимфоциты	ПМК_ПЭГ_100_контроль	ПМК_ПЭГ_100	< 0,001
	ПМК_ПЭГ_100	Наивные	< 0,001
	ПМК_ПЭГ_100_контроль	Наивные	< 0,001

3.6.2 Оценка относительного содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток в группах, которые были иммунизированы частицами ПМК 1400 нм

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния частиц из ПМК с диаметром 1400 нм на иммуногенность связанного с ними белка. Результаты попарного сравнения приведены в таблице 20.

На рисунке 24 показано, что количество антигенспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN γ , статистически значимо ($p < 0,001$) ниже в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц (контрольные группы, а именно «ПМК_1400_контроль») по сравнению с группами, которые были иммунизированы конъюгатом частиц и β 2M-sfGFP (группы «ПМК_1400»).

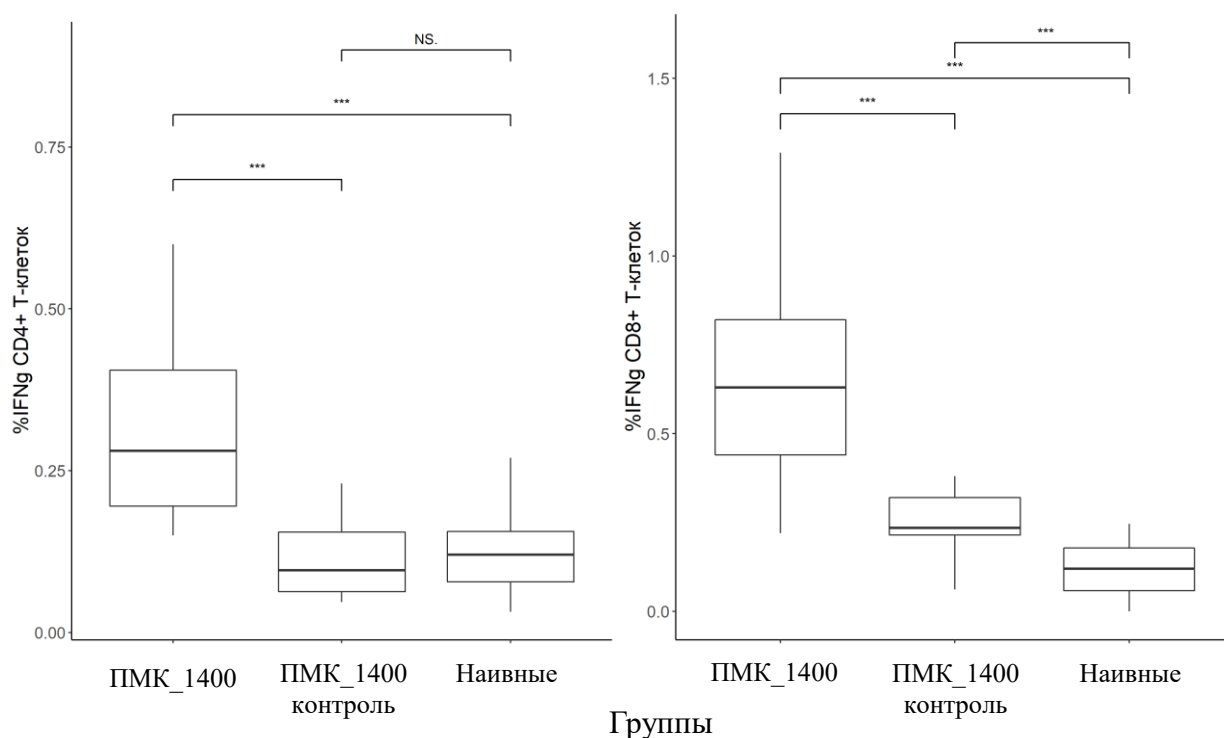


Рисунок 24. Оценка относительного содержания антигенспецифических CD8+ Т-клеток к модельному белку β 2M-sfGFP у мышей. *** – P-уровень значимости меньше 0,001. NS - различия незначимы ($p > 0.001$)

Таблица 20. Результаты статистического анализа CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при помощи непараметрического статистического критерия Ньюмена-Кейлса

Тип клеток	Сравниваемые группы		P-уровень значимости
CD4+ Т-лимфоциты	ПМК_1400_контроль	ПМК_1400	< 0,001
	ПМК_1400	Наивные	< 0,001
	ПМК_1400_контроль	Наивные	0,918
CD8+ Т-лимфоциты	ПМК_1400_контроль	ПМК_1400	< 0,001
	ПМК_1400	Наивные	< 0,001
	ПМК_1400_контроль	Наивные	< 0,001

3.7 Заключение по клеточному и гуморальному иммунному ответу

Полученные результаты по *гуморальному* иммунному ответу можно объяснить следующим образом: больше всего антител образуется в контрольных группах (когда иммунизация проводилась смесью частиц и антигена), так как, во-первых, растворимый антиген с током лимфы эффективнее проникает в региональные лимфоузлы, в которых вследствие процесса рециркуляции лимфоцитов растворимый антиген могут распознать своими иммуноглобулиновыми рецепторами В-лимфоциты, осуществить процессинг антигена и презентировать его Т-лимфоцитам-хелперам, распознающим своими Т-клеточными рецепторами этот же антиген. Для поляризации ответа по пути фолликулярных Т-хелперов также необходимо, чтобы этот же антиген распознала дендритная клетка (ДК), способная мигрировать в этот же самый лимфоузел после интернализации антигена в любых компартментах организма. В этом случае ДК, презентировав этот антиген Т-хелперу, дает сигналы активации (костимуляции) и вырабатывает цитокины (IL-21 и ряд других), способствующие дифференцировке наивного Т-хелпера в фолликулярный Т-хелпер. Далее происходит клональная

экспансия В-лимфоцитов, распознавших антиген, и фолликулярных Т-хелперов, также распознавших этот же антиген. В зародышевых центрах вокруг пролиферирующих В-лимфоцитов доминируют цитокины фолликулярных Т-хелперов (IL-21 и ряд других). По завершении клональной экспансии клон эффекторных фолликулярных Т-хелперов погибает с помощью механизма апоптоза, а остаются долгоживущие Т-хелперы памяти. В-лимфоциты после клональной экспансии превращаются, в основном, в короткоживущие плазматические клетки, синтезирующие антитела к данному антигену, а около 5% – в долгоживущие В-клетки памяти, в геноме которых произошло переключение изотипов иммуноглобулинов с IgM на IgG. При повторном входе антигена в организм пролиферировать начнут уже В-клетки памяти и фолликулярные Т-хелперы памяти, вторичный ответ будет существенно сильнее, основным изотипом будет IgG.

Во-вторых, различия в силе ответа в зависимости от размера частиц можно, по-видимому, объяснить большей концентрацией растворимых частиц, попадающих с током лимфы в лимфоузлы, их меньшим размером и, как следствие, более выраженными способностями В-лимфоцитов самостоятельно распознавать такие мелкие растворимые антигены. Более крупные частицы изначально должны быть обработаны другими профессиональными АПК – ДК или макрофагами, после чего уже мелкие частички такого деградированного антигена В-лимфоциты могут распознать, интернализировать, процессировать и предоставить в молекулах МНС II класса Т-лимфоцитам-хелперам. Далее процесс будет развиваться по тому же сценарию: с антигеном «работают» 3 типа клеток – дендритная клетка, как АПК для Т-хелперов (МНС II-презентация), В-лимфоцит, как АПК для Т-хелперов (также МНС II-презентация), ДК, которая поляризует своими цитокинами Т-хелпер в фолликулярный. Далее вследствие многочисленных костимулирующих взаимодействий между ДК и Т-хелперами, а также между

В-лимфоцитами и Т-хелперами в клональную экспансию отправляются В-лимфоциты и фолликулярные Т-хелперы.

Таким образом, преимущественно более сильный ответ в первом случае, по-видимому, можно объяснить большей доступностью антигена по сравнению со вторым случаем, поскольку для частиц большего размера требуется дополнительный этап деградации макрофагами или ДК. Лишь после этого В-лимфоциты способны осуществить рецепторно-опосредованную интернализацию растворимого антигена и принять участие в запуске гуморального ответа сначала в качестве АПК, а после клональной экспансии – в качестве эффекторов гуморального ответа.

В случае *клеточного* ответа ДК, приносящие чужеродные частицы в лимфоузлы, процессируют его и предоставляют в молекулах МНС I CD8+ Т-лимфоцитам, а в молекулах МНС II – CD4 + Т-лимфоцитам. В данном случае ДК вокруг Т-хелпера будут синтезировать цитокины IL-12, IL-18 и ряд других и поляризовать наивный Т-хелпер в Т-хелпер 1 типа, синтезирующий в больших количествах интерферон-гамма и другие цитокины. В клональную экспансию при таком типе ответа отправляются в результате костимуляции Т-хелперы 1 типа и CD8+ Т-лимфоциты. Клон Т-хелперов 1 типа своими цитокинами (в частности, IFN- γ) активирует CD8+ Т-клетки. После экспансии клоны эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов осуществляют киллинг мишеней в результате распознавания антигенных эпитопов, упакованных в МНС I и экспрессированных на поверхность мишеней. По завершении клеточного ответа остаются IFN- γ -продуцирующие Th1 памяти и CD8+ Т-клетки памяти.

Натуральные киллеры, а также сами активированные CD8+ Т-клетки способны вырабатывать интерферон-гамма, но основным источником этого цитокина, активирующего Т-киллеры, служат Т-хелперы 1 типа.

Известно, что Т-хелперы 1 типа также необходимы не только для формирования клона цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов, но и для

формирования полноценных CD8⁺ Т-клеток памяти [159–162]. Т-хелперы и Т-цитотоксические лимфоциты в данном случае распознают один и тот же антиген, вступают в процесс антигензависимой пролиферации, вследствие этого происходит увеличение количества обеих популяций клеток.

В итоге можно сказать, что для создания ловушек для вирусов больше всего подходят частицы диаметром 1400 нм, так как они способствуют активации клеточного иммунного ответа, что очень важно при борьбе с вирусами. Частицы с диаметром 100 нм не рекомендуется использовать из-за того, что они вызывают в основном сильный гуморальный иммунный ответ и выработку антигенспецифических иммуноглобулинов, которые эффективны при борьбе с вирусами лишь на этапе виремии, а после того, как вирус уже проникнет в клетку-мишень, эффективным механизмом противовирусной защиты является клеточный иммунный ответ. Антитела при противовирусном ответе нужны для снижения вирусной нагрузки и предотвращения процесса входа вируса в клетки организма-хозяина. После проникновения вируса в клетки организма-хозяина антитела бессильны, в этом случае иммунной системе приходится вводить в апоптоз собственные клетки, пораженные вирусом (это делают Т-киллеры CD8⁺), после чего апоптозные тельца вместе с вирусами поглощаются макрофагами, а эпителии репарируются уже без вируса.

3.8 Получение белка слияния CD81-SAA

Для создания вирусных ловушек было предложено установить взаимодействие рецептора CD81 человека, иммобилизованного на частицах, с белком E2 вируса гепатита С. Для проверки возможности связывания белков необходимо было получить в очищенном виде фрагмент рецептора CD81 человека и оболочечный белок E2 вируса гепатита С. Белок CD81 состоит из 236 аминокислот (25,8 кДа). N- и C-концевые участки локализируются в цитоплазме. Белок играет важную роль в прикреплении вируса гепатита С к клетке посредством взаимодействия большой

экстраклеточной петли белка с вирусным белком E2. Также было установлено, что минимальным необходимым фрагментом полноразмерного вирусного белка E2 для взаимодействия с CD81 является его укороченная форма E2 core, состоящая из 233 аминокислот. Для предотвращения протеолиза небольших целевых белков, в работе были созданы белки слияния. В случае E2 был использован зелёный флуоресцентный белок (sfGFP), в случае CD81 – мономер стрептавидина (SAA).

Для получения целевого белка CD81-SAA методами генной инженерии была создана экспрессионная генетическая конструкция, включающая в себя ген CD81 и SAA. Целевой белок слияния CD81-SAA был выделен из телец включения и растворимой клеточной фракции *E. coli*. Аминокислотная последовательность полученного белка представлена на рисунке 25.

MEFVNKDQIAKDVKQFYDQALQQAVVDDDANNAKAVVKTFFHETLDCCG
SSTLTALTTSVLKNNLCPSGSNIISNLFKEDCHQKIDDLFSGKPWH**MAEAGI**
TGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAP
ATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWL
LTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASННННННН

Рисунок 25. Аминокислотная последовательность рекомбинантного химерного белка CD81-SAA. Синим цветом обозначена аминокислотная последовательность белка CD81, красным – аминокислотная последовательность белка SAA

Наличие белка CD81-SAA, полученного из телец включения и растворимой клеточной фракции *E. Coli*, проверялось с помощью SDS-электрофореза. На рисунке 26 представлены результаты SDS-электрофореза белка CD81-SAA из телец включения.

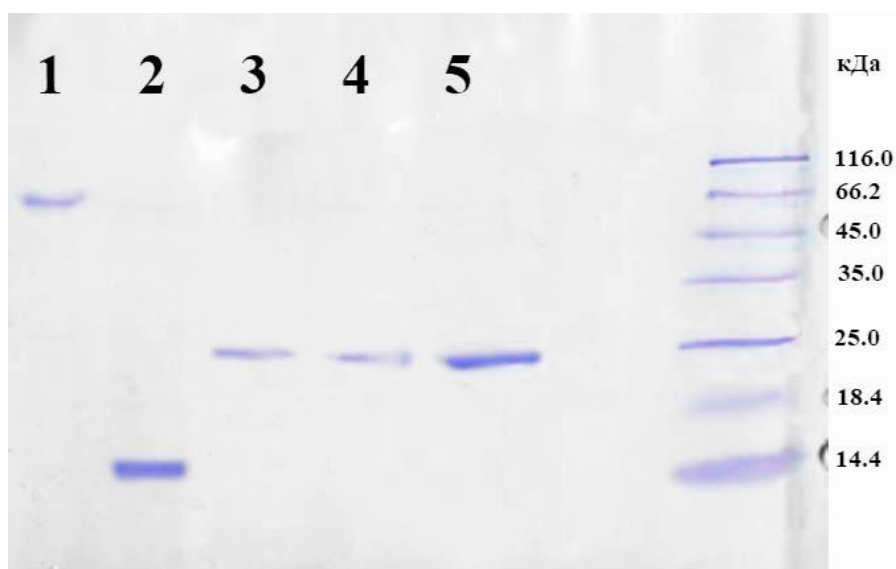


Рисунок 26. Результаты SDS-электрофореза белка CD81-SAA выделенного из телец включения пробы с предварительным кипячением при 100°C и без добавления 2-меркаптоэтанола (дорожка 3) и пробы предварительно денатурированной кипячением при 100°C и с добавлением 2-меркаптоэтанола (дорожка 4). Дорожка 1 соответствует стрептавидину с предварительным кипячением при 100°C и без добавления 2-меркаптоэтанола, дорожка 2 соответствует стрептавидину с предварительным кипячением при 100°C и с добавлением 2-меркаптоэтанола. Дорожка 5 соответствует белку слияния CD81-SAA, не прошедшему через фильтр 50 кДа. Окраска ПААГ Кумасси R-250.

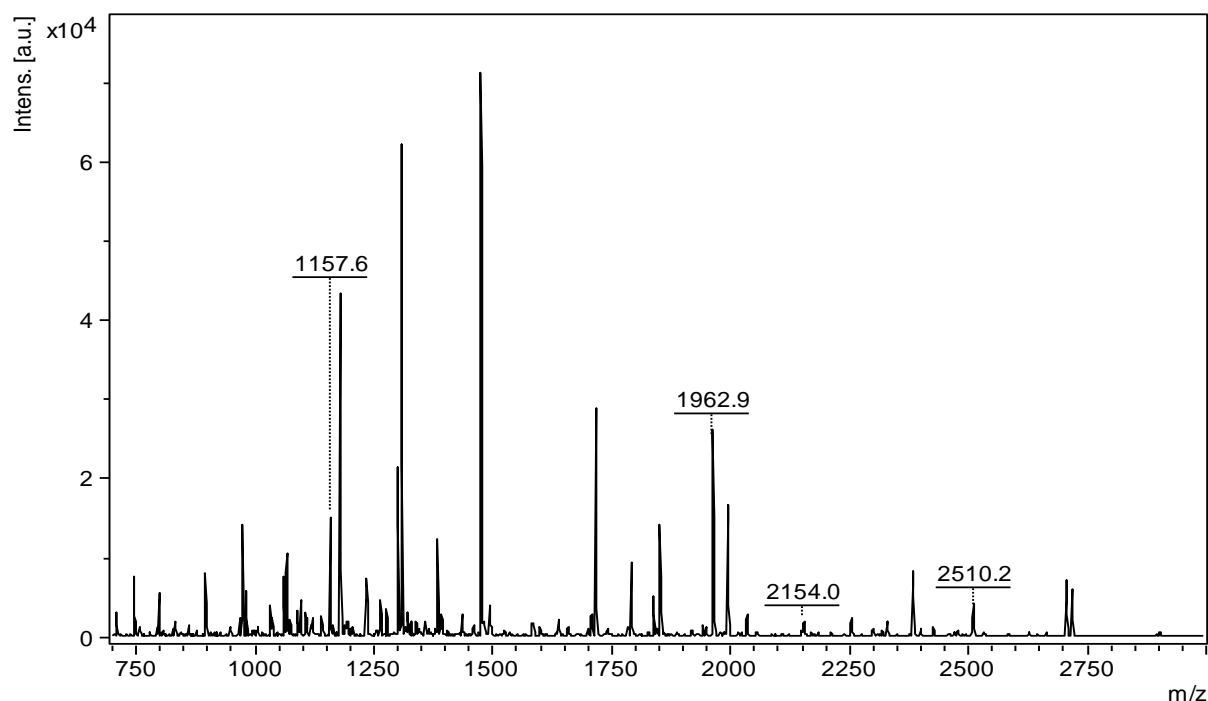
Из результатов SDS-электрофорезов (рисунок 26) следует, что полученный нами белок слияния CD81-SAA является мономерным, а не тетрамерным, как исходный стрептавидин (SAA). Белок CD81-SAA удалось выделить из телец включения. Данный белок имеет массу 25кДа и, следовательно, не имеет тетрамерную структуру.

В итоге можно сказать, что нами создана генетическая конструкция, кодирующая стрептавидин с CD81. При температуре индукции 37°C белок CD81-SAA локализуется, главным образом, в тельцах включения, и в

меньших количествах его можно обнаружить в растворимой клеточной фракции.

3.9 Результаты масс-спектрометрии CD81-SAA

Для того, чтобы убедиться, что полученный белок действительно является CD81-SAA, был осуществлен следующий эксперимент: очищенный на никель-агарозе химерный белок был подвергнут электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле. Гель был окрашен Кумасси R250. Бэнд, соответствующий по подвижности целевому белку CD81-SAA, был вырезан из геля и подвергнут трипсинолизу в течение 2 часов (рисунок 27) и в течение 24 часов (рисунок 28) с последующей масс-спектрометрией.



Красным цветом обозначены пептиды, обнаруженные в анализируемом кусочке полиакриламидного геля и являющиеся фрагментами целевого белка.

1	MRKIVVAAIA	VSLTTVSITA	SASADPSKDS	KAQVSAAEAG	ITGTWYNQLG
51	STFIVTAGAD	GALGTGYESA	VGNAESRYVL	TGR YDSAPAT	DGSGTALGWT
101	VAWKNNYRNA	HSATTWSGQY	VGGAEARINT	QWLLTSGTTE	ANAWKSTLVG
151	HDTFTKVKPS	AASIDAAKKA	GVNNGNPLDA	VQQ	

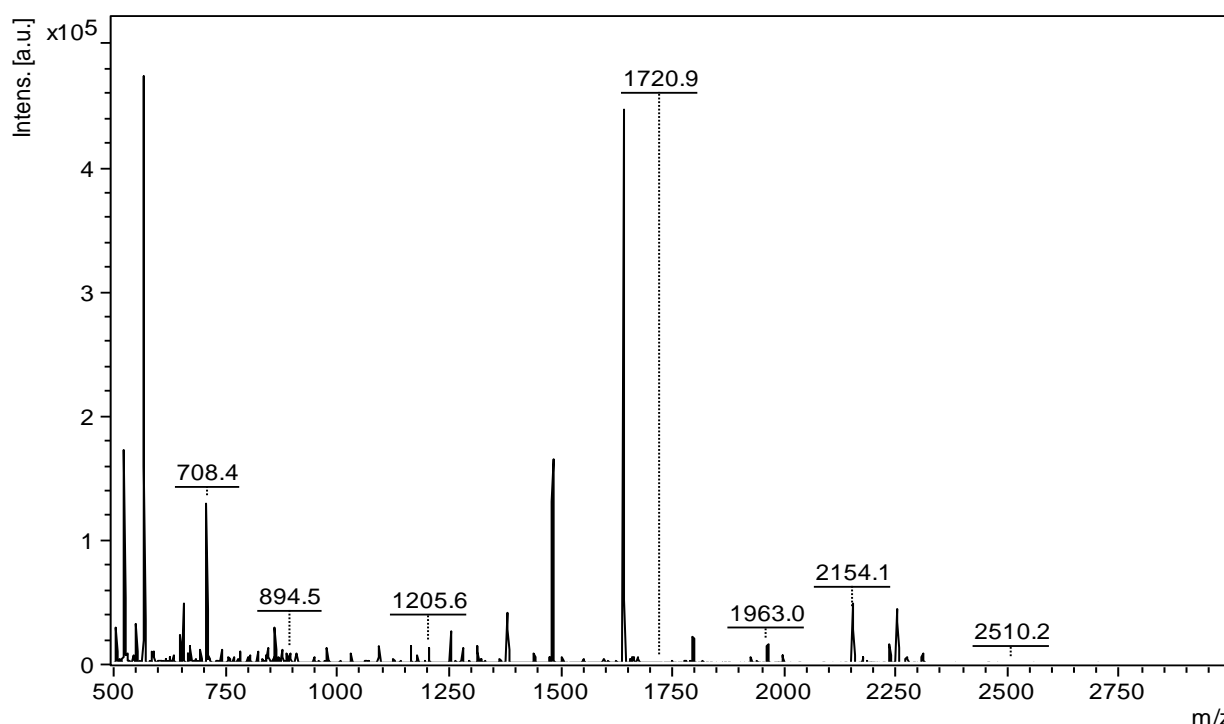
Номера аминокислот	Наблюдаемое значение M, Да	Ожидаемое значение M, Да	ppm	M	Последовательность пептида
84–104	2153,0038	2153,0066	-1,27	0	R.YDSAPATDGSGTALGWTVAWK.N
105–127	2509,2162	2509,1483	27,10	1	K.NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEAR.I

109–127	1961,8913	1961,8980	-3,42	0	R.NAHSATTWSGQYVGGAEAR.I
128–145	2032,9976	2033,0218	-11,90	0	R.INTQWLLTSGTTEANAWK.S
146–156	1204,6364	1204,6088	22,9	0	K.STLVGHDTFTK.V
157–168	1156,6198	1156,6452	-21,90	0	K.VKPSAASIDAAK.K
157–183	2662,3899	2662,4038	-5,24	2	K.VKPSAASIDAAKAGVNNGNPLDAVQQ.-

Рисунок 27. Результаты масс-спектрометрии фрагментов целевого химерного белка, полученных в результате триптического гидролиза в течение 2 часов кусочка полиакриламидного геля, содержащего CD81-SAA. Отмечены пептиды, идентифицированные в последовательности стрептавидина

При триптическом гидролизе пробы в течение 2 часов идентифицируется помимо кератина стрептавидин. Покрытие последовательности 54%. Идентифицирована вся С-концевая последовательность стрептавидина (84-183 а.к.).

Далее эксперимент был проведён при гидролизе в течение 24 часов (рисунок 28).



Красным цветом обозначены пептиды, обнаруженные в анализируемом кусочке полиакриламидного геля и являющиеся фрагментами целевого белка.

1 MGVEGCTKCI KYLLVFVNFV FWLAGGVILG VALWLRHDPQ TTNLLYLELG
51 DKPAPNTFYV GIYILIAVGA VMMFVGFLGC YGAIQESQCL LGTFFTCLVI

101 LFACEVAAGI WGFVNKDQIA KDVKQFYDQA LQQAVVDDDA NNAKAVVKTF
 151 HETLDCCGSS TLTALTTSVL KNNLCPSGSN IISNLFKEDC HQKIDDLFSG
 201 KLYLIGIAAI VVAVIMIFEM ILSMVLCCGI RNSSVY

Номера аминокислот	Наблюдаемое значение М, Да	Ожидаемое значение М, Да	ppm	М	Последовательность пептида
125–144	2252,0799	2252,0345	20,10	0	K.QFYDQALQQAVVDDDDANNAK.A
172–187	1719,8817	1719,8614	11,80	0	K.NNLCPSGSNIISNLFK.E
188–193	758,2990	758,3017	-3,59	0	K.EDCHQK.I
194–201	893,4493	893,4494	-0,17	0	K.IDDLFSGK.L

Рисунок 28. Результаты масс-спектрометрии фрагментов целевого химерного белка, полученных в результате триптического гидролиза в течение 24 часов кусочка полиакриламидного геля, содержащего CD81-SAA. Отмечены пептиды, идентифицированные в последовательности CD-81

При триптическом гидролизе пробы в течение 24 часов идентифицируется CD-81. Покрытие последовательности 21%. Идентифицирована С-концевая часть белка CD-81 (125-144 а.к. и 172-201 а.к.).

Результаты, полученные при анализе ещё одной аналогичной пробы (другой кусочек полиакриламидного геля) соответствуют результатам, полученным ранее.

Таким образом, показано, что синтезированный белок действительно является задуманным химерным рекомбинантным CD81-SAA.

3.10 Получение белка слияния оболочечного белка E2 core вируса гепатита С с зеленым флуоресцентным белком sfGFP

Для визуализации комплексов между химерным рекомбинантным белком CD81-SAA, конъюгированным с частицами полимолочной кислоты, и оболочечным белком E2 возникла необходимость «пометить» капсидный белок флуоресцентным маркером. С этой целью в структуру белка E2 была введена аминокислотная последовательность зеленого флуоресцентного

белка sfGFP. Также последовательность зеленого белка была введена для предотвращения протеолиза целевого фрагмента белка вируса E2.

На начальных этапах работы по созданию рекомбинантного E2 – белка капсида вируса гепатита С мы пытались синтезировать полноразмерный E2 (аминокислотную последовательность см. рисунок 29) в клетках E.coli.

ETHVTGGSAGHTVSGFVSLLAPGAKQNVQLINTNGSWHLNSTALNCNDSL
NTGWLAGLFYHHKFNSSGCPERLASCRPLTDFDQGWGPISYANGSGPDQR
PYCWHYPPKPCGIVPAKSVCGPVYCFTSPVVVGTDRSGAPTYSWGEND
TDVFLNNTTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGAGNNTLHCP
TDCFRKHPDATYSRCGSGPWITPRCLVDYPYRLWHYPCTINYTIFKIRMYV
GGVEHRLEAACNWTRGERCDLEDRDRSELSPLLLTTTQWQVLPCSFTTLP
ALSTGLIHLHQNIVDVQYLYGVGSSIASWAIKWEYVLLFLLADARVCSC
LWMMLLISQAEA

Рисунок 29. Аминокислотная последовательность белка E2 (генотип 1a, isolate 1, HCV). - 445 А.К.О. Подчеркнута последовательность 412-645 а.к.о (E2 core)

При выделении белка из E.coli образовывались две клеточные фракции: нерастворимая и растворимая. Нерастворимую клеточную фракцию, обычно содержащую тельца включения, растворяли в 8 М мочеvine. Обе фракции анализировали при помощи SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Кроме того, обе фракции от каждой из 8 колб наносили на никель-агарозу для аффинной хроматографии. Фракции, полученные в результате очистки белка на никель-агарозном сорбенте, также анализировались при помощи 5-12 % SDS-электрофореза. К сожалению, значимых количеств целевого белка E2 в растворимой клеточной фракции обнаружено не было (при всех концентрациях IPTG и разных температурах индукции). В тельцах включения, по данным электрофореза, наблюдалось следующее: при растворении телец включения в 8 М мочеvine, помимо примесных белков,

обнаруживался белок, соответствующий по электрофоретической подвижности димеру E2. При этом во фракциях после очистки на никель-агарозе и замены буфера на неденатурирующий (200 мМ имидазол) не обнаружены ни мономер, ни димер E2.

Последующий анализ показал, что денатурированный в мочеvine E2 при попытке ренатурации переходит в нерастворимое состояние, в том числе прямо на никель-агарозной колонке. Многочисленные опыты, целью которых было обнаружение протокола ренатурации E2, к сожалению, не увенчались успехом, и получить растворимый E2 из созданной экспрессионной генетической конструкции нам не удалось. По-видимому, это связано с большой гидрофобной частью, имеющейся в полноразмерном E2.

Дальнейшая работа была направлена на создание плазмиды для бактериального синтеза не целого белка E2, а его фрагмента (E2 core). E2 core несколько короче полноразмерного белка E2, и по данным литературы [163] это минимальный сайт, необходимый для взаимодействия с CD81. Рецептор CD81 расположен на поверхности человеческих клеток и считается основными «воротами», через которые вирион гепатита С проникает в клетки (при помощи своего капсидного белка E2).

В нашей лаборатории есть опыт создания рекомбинантных химерных белков на основе sfGFP [164]. «Зеленая» часть химерного белка, во-первых, значительно повышает удобство работы с белком за счет его визуализации как при наблюдении невооруженным глазом, так и при флуоресцентной конфокальной микроскопии. Во-вторых, sfGFP увеличивает растворимость связанного с ним белка. Во многих случаях это позволяет получить в E.coli растворимый целевой продукт, притом что продукт без sfGFP является агрегированным и зачастую непригодным для дальнейших экспериментов.

Основные сложности получения растворимого полноразмерного оболочечного белка E2 вируса гепатита С заключались в том, что синтезировался сразу нерастворимый агрегированный продукт, и

невозможно было добиться его последующей ренатурации. В настоящее время мы поняли причину этого явления, являющуюся, как нам кажется фундаментальным свойством E2, а именно его фибрилlogenность. Но одновременно с этим мы предприняли еще одну попытку получения растворимого E2, создав соответствующий рекомбинантный химерный белок на основе sfGFP. В рамках этой попытки нами была создана плаزمиды на основе pTRC99a, включающая в себя в одной рамке считывания ген E2 core и ген sfGFP (рисунок 30).

MLQINTNGSWHLNSTALNCNDSLNTGWLAGLFYHHKFNSSGCPERLASCR
PLTDFDQGWGPISYANGSGPDQRPYCWHYPPKPCGIVPAKSVCGPVYCFTP
SPVVVGTDDRSGAPTYSWGENDTDVFLNNTTRPPLGNWFGCTWMNSTGF
TKVCGAPPCVIGGAGNNTLHCPTDCFRKHPDATYSRCGSGPWITPRCLVD
YPYRLWHYPCTINYTIFKIRMYVGGVEHRLEAACNGSSRSKGEELFTGVVP
ILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTL
AYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGYKTRAEVK
FEGDTLVNRIVLKIDFKEDGNILGHKLEYNFNHNVYIMADKQKNGIKV
NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEK
RDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKVDNNNNNN

Рисунок 30. Аминокислотная последовательность рекомбинантного химерного белка E2-sfGFP. Зеленым цветом обозначен зеленый флуоресцентный белок

Нуклеотидная последовательность плазмиды была составлена таким образом, чтобы на с-конце синтезируемого в E.coli химерного белка E2-sfGFP имелась 6-гистидиновая последовательность для аффинной очистки (рисунок 30). Целевой белок был синтезирован в клетках E.coli и выделен на никель-агарозе. Для этого полученная плазмиды была просеквенирована и вставлена в клетки E.coli экспрессионного штамма BL (DE3). Один из выросших на селективной агаризованной LB среде (в чашке Петри) клонов

был помещен в 10 мл LB среды (с добавлением ампициллина 100 мкг/мл), после чего выращивался при 37⁰С в условиях аэрации с постоянным перемешиванием. Данный инокулят помещался в 1 литр свежей LB среды (с добавлением ампициллина), и клетки росли до ОД₆₀₀ = 1. Индукция синтеза рекомбинантного химерного белка осуществлялась добавлением IPTG (0,25 ммоль) и продолжалась 16 часов при температуре 37⁰С. После этого клетки центрифугировали, отмывали физраствором и разрушали при помощи соникации, а затем центрифугировали для разделения растворимой и нерастворимой клеточных фракций. Нерастворимую клеточную фракцию, обычно содержащую тельца включения, растворяли в 8 М мочеvine. Обе фракции наносили на никель-агарозный сорбент для аффинной хроматографии. Полученные фракции анализировали при помощи 5-12 % SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (рисунок 31-Б).

Целевой белок слияния оболочечного белка E2 core вируса гепатита С с зеленым флуоресцентным белком sfGFP (E2-sfGFP) обнаружен как в растворимой клеточной фракции (в небольших количествах: не более 100 мкг с литра культуральной среды), так и в тельцах включения (3-10 мг с литра культуральной среды). В обеих клеточных фракциях полученный E2-sfGFP был зеленого цвета и обладал зеленой флуоресценцией (рисунок 31-А).

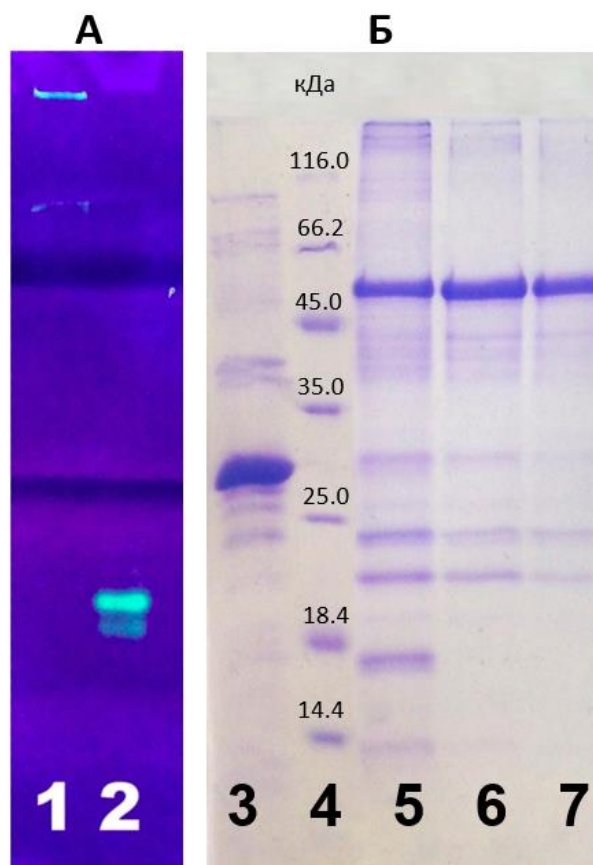


Рисунок 31. А - Электрофоретический анализ полученного белка слияния E2-sfGFP в ПААГ в неденатурирующих условиях. Дорожка 1 - E2-sfGFP, выделенный из телец включения с последующим диализом; дорожка 2 – sfGFP. Б - Электрофоретический анализ полученного белка E2-sfGFP в ПААГ в присутствии SDS. Дорожка 3 - sfGFP, дорожки 5,6,7 – E2-sfGFP, выделенный из телец включения с последующим диализом

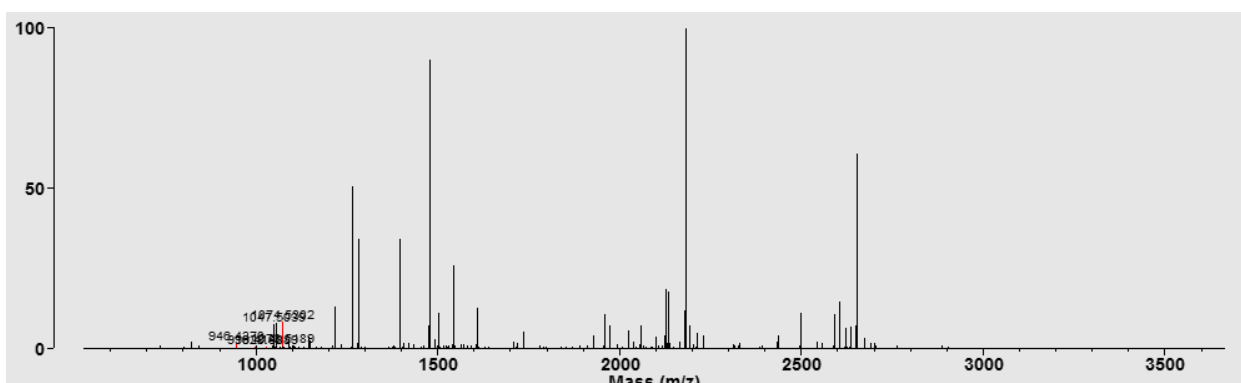
3.11 Результаты масс-спектрометрии E2-sfGFP

Для того, чтобы убедиться, что полученный зеленый белок действительно содержит E2 core, был осуществлен следующий эксперимент: очищенный на никель-агарозе (за счет включенной 6-гистидиновой последовательности) зеленый химерный белок был подвергнут электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле. Гель был окрашен Кумасси R250. Бэнд, соответствующий по подвижности целевому белку E2-sfGFP, был вырезан из геля и подвергнут трипсинолизу с последующей масс-спектрометрией (рисунок 32).

1 QLINTGNSWH LNSTALNCND SLNTGWLGL FYHHKFNSSG CPERLASC RP LTDFDQGWGP ISYANGSGPD QRPYCWYHPP
 81 KPCGIVPAKS VCGPVYCFPT SPVVVGTTR SGAPTYSWG E NDTDFVFLNN TRPPLGNWFG CTWMNSTGFT KVCGAPPCVI
 161 GGAGNNTLHC PTDCFRKHPD ATYSRCGSGP WITPRCLVDY PYRLWHYPCT INYTIFKIRM YVGGVEHRL E AACN

Покрывание последовательности составило 19%.

Наблюдаемое значение M, Да	Ожидаемое значение M, Да	ppm	Номера аминокислот		M	Последовательность пептида
946,4370	946,4377	-0,71	178	185	0	K.HP DATYSR.C
996,4190	996,4204	-1,38	36	44	0	K.FNSSG CPER.L
1028,4889	1028,4870	1,85	196	203	0	R.CLVDYPYR.L
1047,5039	1047,5040	-0,14	220	228	0	R.MYVGGVEHR.L
1073,5189	1073,5197	-0,72	186	195	0	R.CGSGPWITPR.C
1074,5302	1074,5327	-2,30	177	185	1	R.KHP DATYSR.C



Ниже приведены результаты совпадения для последовательности sfGFP:

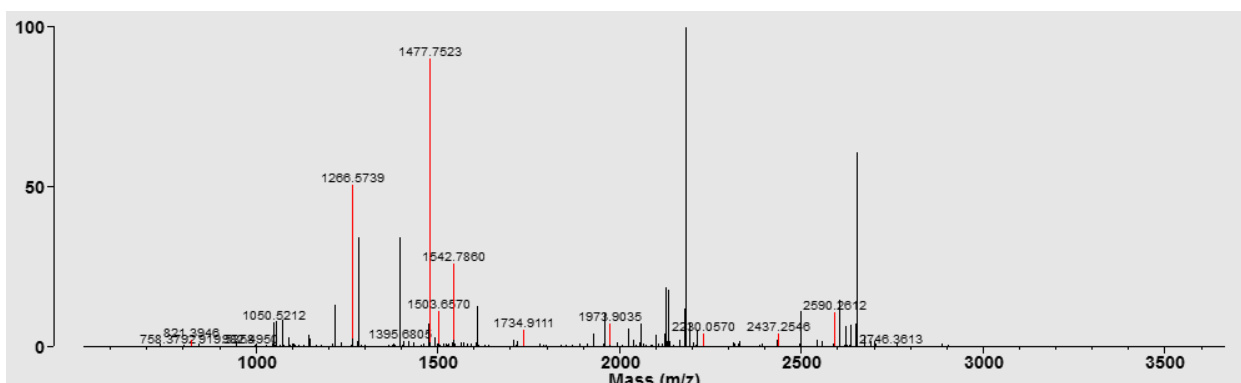


Рисунок 32. Результаты масс-спектрометрии фрагментов целевого химерного белка, полученных в результате трипсинолиза кусочка полиакриламидного геля, содержащего E2-sfGFP. Покрывание последовательности 19%. Красным цветом обозначены пептиды, обнаруженные в анализируемом кусочке полиакриламидного геля и являющиеся фрагментами целевого белка E2

Таким образом, показано, что синтезированный зеленый белок содержит E2 core и действительно является задуманным химерным рекомбинантным E2-sfGFP. Судя по подвижности в SDS-электрофорезе, после очистки целевой белок остается полноразмерным, то есть не

подвергается протеолизу. Это важно для дальнейших экспериментов по связыванию E2 с CD81 – его природным рецептором у человека.

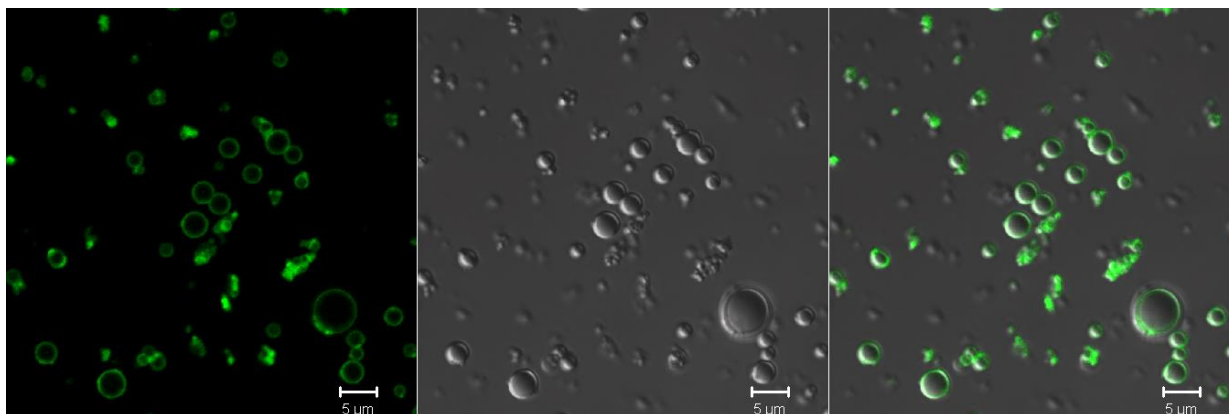
3.12 Связывание флуоресцентно меченного вирусного белка E2-sfGFP с рецептором CD81, конъюгированным на частицах

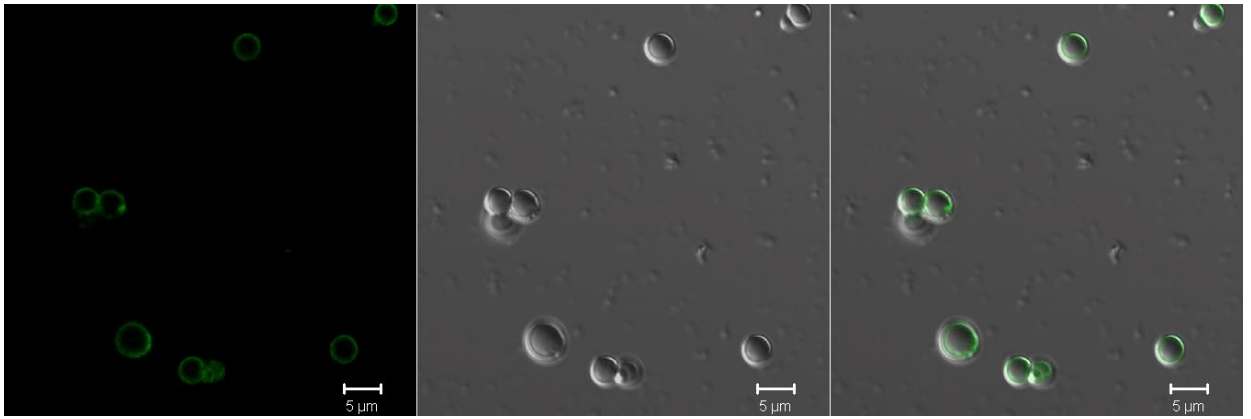
В настоящем разделе решалась задача оценки взаимодействия комплекса частиц полимолочной кислоты и большой экстраклеточной петли белка CD81 с белком слияния оболочечного белка E2 core вируса гепатита С и зеленого флуоресцентного белка sfGFP. Для этого были рассмотрены два белка: первый – E2-sfGFP и второй – контрольный белок sfGFP. Оба белка были проинкубированы с частицами полимолочной кислоты, на поверхности которых был фрагмент белка CD81 человека, после чего частицы были отмыты и подвергнуты флуоресцентной микроскопии.

На первом этапе были созданы микрочастицы из полимолочной кислоты (PLAMP) с иммобилизированной на поверхности большой экстраклеточной петлей CD81 человека (LELCD81). Для лучшей визуализации на конфокальном микроскопе было проведено фракционирование полученных частиц. Тщательно ресуспендированные в PBS частицы PLAMP-LELCD81 последовательно центрифугировались при 0,8 g в течение 3 минут и при 1,5 g в течение 3 минут. Осадки, содержащие крупные частицы (2-5 мкм и 0,8-2 мкм соответственно) отбирались для дальнейших экспериментов. Целью работы было установить, взаимодействуют ли частицы PLAMP-LELCD81 с флуоресцентно меченным фрагментом оболочечного белка E2 вируса гепатита С. Для этого мы взяли 2 белка: E2-sfGFP и контрольный белок sfGFP. Оба белка проинкубировали с частицами PLAMP-LELCD81, после чего частицы отмыли и подвергли конфокальной флуоресцентной микроскопии (рисунок 33). Оказалось, что поверхность частиц, проинкубированных с E2-sfGFP, обладает зеленой флуоресценцией при облучении синим лазером. При этом поверхность частиц, проинкубированных с контролем (sfGFP) при тех же условиях

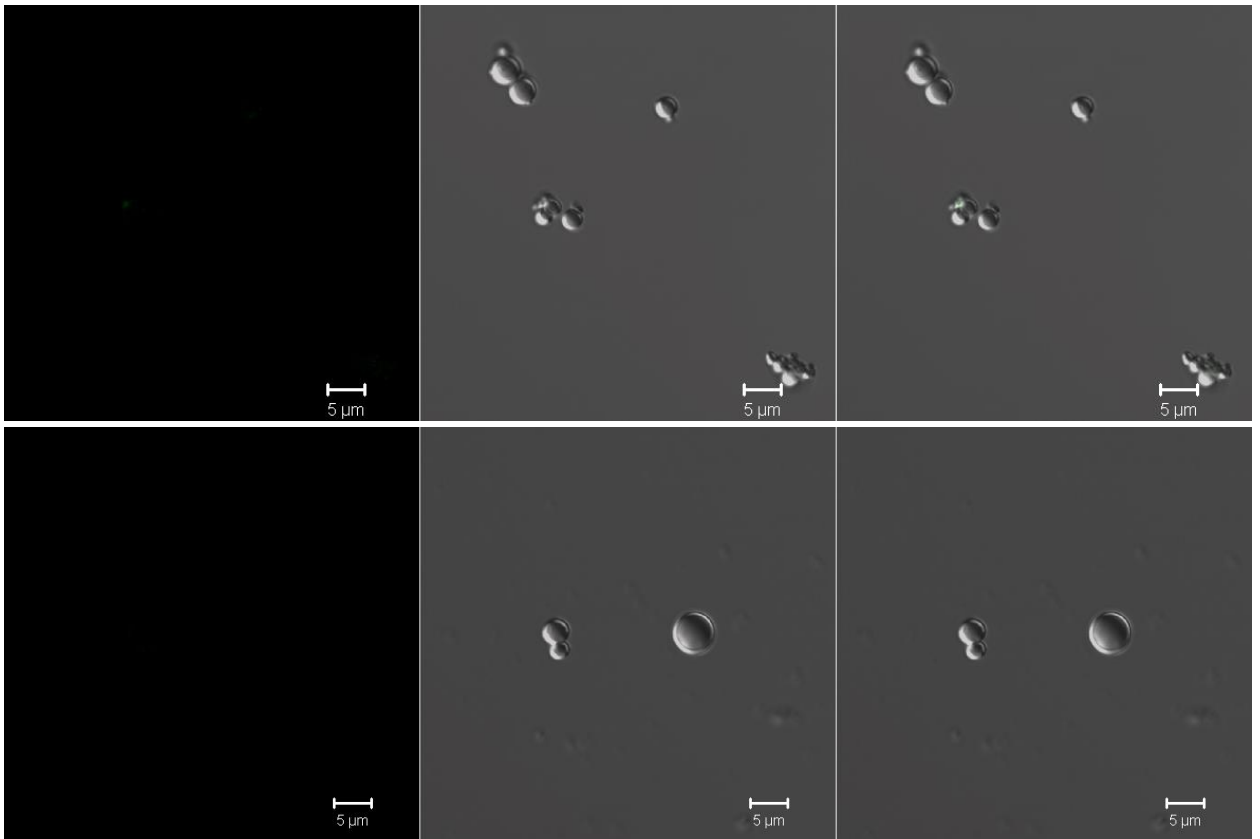
микроскопирования, флуоресценцией не обладает. Ниже приведен протокол данного опыта.

К суспензии, содержащей крупные частицы PLAMP-LELCD81 (в 500 мкл PBS), был добавлен зеленый белок E2-sfGFP до конечной концентрации 0,5 мг/мл. В контрольном эксперименте вместо E2-sfGFP было добавлено столько же молей sfGFP. Полученные смеси инкубировались 1 час при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После этого PLAMP были осаждены центрифугированием при 12000 g в течение 15 минут и затем отмыты (тщательно ресуспендированы в 500 мкл PBS и снова инкубированы 15 минут при комнатной температуре при постоянном перемешивании). После повторного осаждения PLAMP (12000 g в течение 15 минут) супернатант был слит, а осадок ресуспендирован в 50 мкл PBS. Полученная суспензия была проанализирована при помощи SDS-электрофореза и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (рисунок 33).





А. Два поля зрения микрочастиц на основе ПМК с иммобилизированной на поверхности большой экстраклеточной петлей CD81 человека (PLAMP-LELCD81) после инкубации с E2-sfGFP



Б. Два поля зрения микрочастиц на основе ПМК с иммобилизированной на поверхности большой экстраклеточной петлей CD81 человека (PLAMP - LELCD81) после инкубации с sfGFP

Рисунок 33. Слева: флуоресценция sfGFP при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм; по центру: дифференциально-интерференционный контраст (DIC); справа: совмещенное изображение

В результате PLAMP-LELCD81, проинкубированные с E2-sfGFP, обладают яркой зеленой флуоресценцией при облучении лазером с длиной волны 488 нм (рисунок 33-А). При этом контрольные PLAMP-LELCD81, проинкубированные с sfGFP, зеленой флуоресценцией не обладают (рисунок 33-Б). Фотографии сделаны одновременно при одинаковых настройках микроскопа. Конфокальные изображения получали с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 Meta» (Zeiss, Германия), с иммерсионным объективом C-Apochromat 40×/1.2 W Korr UV-VIS-IR M27. Флуоресценцию sfGFP детектировали с использованием оптического фильтра 505 нм при возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны 488 нм. В проходящем свете изображения получали при помощи метода дифференциально-интерференционного контраста. Обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения «LSM 510».

Таким образом, показано, что иммобилизованный на микрочастицах полимолочной кислоты химерный белок, состоящий из большой экстраклеточной петли CD81 человека и стрептавидина, эффективно связывает фрагмент капсидного белка E2 вируса гепатита С.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе было исследовано влияние полимерных частиц разных составов и размеров на гуморальный и клеточный иммунный ответ в отношении связанных с ними модельных белков. Наиболее иммуногенно перспективный тип частиц предполагается использовать в дальнейшем для создания «вирусных ловушек» с целью блокирования различных вирусов, в частности вируса гепатита С. Для этого планируется модифицировать полимерную матрицу частиц белками — хозяйскими рецепторами (или их фрагментами), которые обеспечивают проникновение вирионов в эукариотические клетки. Предполагается, что продукты связывания вируса с полимерными частицами могут обеспечивать эффективный клеточный ответ в результате их поглощения антиген-презентирующими клетками с последующим процессингом и представлением эффекторным клеткам иммунной системы. Также данная работа может помочь в разработке иных препаратов, позволяющих индуцировать иммунные ответы.

В ходе работы были созданы микрочастицы из полимолочной кислоты с иммобилизованным на поверхности фрагментом клеточного рецептора CD81. Наша задача заключалась в том, чтобы определить, взаимодействуют ли частицы полимолочной кислоты, связанные с большой экстраклеточной петлей CD81, с белком слияния оболочечного белка E2 core вируса гепатита С с зеленым флуоресцентным белком sfGFP (E2-sfGFP). Для этого были рассмотрены два белка: первый – E2-sfGFP и второй – контрольный белок sfGFP. Оба белка были проинкубированы с частицами из полимолочной кислоты, на поверхности которых был фрагмент белка CD81 человека, после чего частицы были отмыты и подвергнуты флуоресцентной микроскопии. Оказалось, что поверхность частиц, проинкубированных с E2-sfGFP, обладает зеленой флуоресценцией при облучении синим лазером с длиной волны 488 нм. При этом поверхность частиц, проинкубированных с

контрольным белком sfGFP при тех же условиях микроскопирования, флуоресценцией не обладает.

Таким образом показано, что иммобилизованный на микрочастицах из полимолочной кислоты химерный белок, состоящий из большой экстраклеточной петли CD81 человека и стрептавидина, легко связывает фрагмент оболочечного белка E2 вируса гепатита С.

Представляется, что такая конструкция может быть полезна для повышения чувствительности диагностических тестов при вирусном гепатите С. Предлагаемый подход может способствовать повышению концентрации вирусных частиц в образцах исследуемого биоматериала и позволит увеличить чувствительность обратной транскрипции (с последующей вирус-специфичной ПЦР). Возможность использования подобных конструкций в лечебных целях для снижения вирусной нагрузки при инфицировании гепатитом С требует дальнейшего изучения. Кроме того, разработанная методология может быть использована для создания конструкций, улавливающих другие вирусы, при использовании в качестве целевых белков элементов оболочки данных вирусов.

Также в ходе работы было установлено, что наиболее оптимальным типом частиц для создания ловушек для вирусов являются частицы на основе полимолочной кислоты или сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля с диаметром 1400 нм, так как они способствуют активации клеточного иммунного ответа. Частицы с меньшим диаметром вызывают сильную выработку антигенспецифических иммуноглобулинов, которые эффективны при борьбе с вирусами лишь на этапе виремии.

ВЫВОДЫ

1. Предложенный способ ренатурации фрагмента оболочечного рекомбинантного белка E2 вируса гепатита С при помощи ступенчатого диализа позволяет получать нативный продукт, связывающийся с фрагментом рецептора CD81.
2. Рекомбинантный фрагмент оболочечного белка E2 вируса гепатита С сорбируется на микрочастицах полимолочной кислоты с иммобилизованным на их поверхности фрагментом рецептора CD81. Установлено, что для эффективного связывания белков с частицами полимолочной кислоты необходимы спейсерные последовательности.
3. При внутрибрюшинном введении мышам модифицированные модельными белками частицы вызывают менее выраженный гуморальный иммунный ответ по сравнению со смесью частиц с белком. Гуморальный иммунный ответ зависит от размеров частиц. Частицы с диаметром 1400 нм менее эффективны в плане выработки специфических антител против модельного белка, чем частицы с диаметром 100 нм. Состав частиц (ПМК, ПМК-ПЭГ), в отличие от их размеров, не влияет на выраженность гуморального иммунного ответа.
4. При внутрибрюшинном введении мышам модифицированные модельными белками частицы вызывают более выраженный клеточный иммунный ответ по сравнению со смесью частиц с белком. Конъюгат частиц с белком значительно увеличивает число CD4-позитивных Т-хелперов 1 типа и число CD8-позитивных цитотоксических Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон.
5. Оптимальным типом частиц для создания вирусных ловушек являются частицы с диаметром 1400 нм, так как они способствуют активации клеточного иммунитета. Частицы с меньшим диаметром вызывают сильную выработку антигенспецифических иммуноглобулинов, которые эффективны при борьбе с вирусами лишь на этапе виремии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saini V. et al. Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres // *J. Drug Target*. 2010. Vol. 18, № 3. P. 212–222.
2. Ströh L.J., Nagarathinam K., Krey T. Conformational flexibility in the CD81-binding site of the hepatitis C virus glycoprotein E2 // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2018. Vol. 9, № JUN.
3. Myszka D.G. et al. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 16. P. 9026–9031.
4. Raux H., Flamand A., Blondel D. Interaction of the Rabies Virus P Protein with the LC8 Dynein Light Chain // *J. Virol*. American Society for Microbiology, 2000. Vol. 74, № 21. P. 10212–10216.
5. Lan J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor // *Nature*. Nature Research, 2020. Vol. 581, № 7807. P. 215–220.
6. Gurtsevitch V. et al. Epstein-Barr Virus in Patients with Classical Hodgkin's Lymphoma // *Clin. Oncohematology*. Practical Medicine Publishing House, 2018. Vol. 11, № 2. P. 160–166.
7. Li W. et al. Inhibition of herpes simplex virus by myricetin through targeting viral gD protein and cellular EGFR/PI3K/Akt pathway // *Antiviral Res.* Elsevier B.V., 2020. Vol. 177.
8. Rizzo S. et al. Selection and characterization of highly specific recombinant antibodies against West Nile Virus E protein // *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 2020. Vol. 311. P. 35–43.
9. Samreen B. et al. Hepatitis C virus entry: Role of host and viral factors // *Infect. Genet. Evol.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 12, № 8. P. 1699–1709.
10. Martin-Subero M., Diez-Quevedo C. Mental disorders in HIV/HCV coinfecting patients under antiviral treatment for hepatitis C // *Psychiatry Res.*

- Elsevier, 2016. Vol. 246, № July. P. 173–181.
11. Ho S.-H. et al. Recombinant Extracellular Domains of Tetraspanin Proteins Are Potent Inhibitors of the Infection of Macrophages by Human Immunodeficiency Virus Type 1 // *J. Virol.* 2006. Vol. 80, № 13. P. 6487–6496.
 12. Bartosch B., Dubuisson J. Recent advances in hepatitis C virus cell entry // *Viruses.* 2010. Vol. 2, № 3. P. 692–702.
 13. Rajesh S. et al. Structural Basis of Ligand Interactions of the Large Extracellular Domain of Tetraspanin CD81 // *J. Virol.* 2012. Vol. 86, № 18. P. 9606–9616.
 14. Zona L. et al. CD81-receptor associations - Impact for hepatitis C virus entry and antiviral therapies // *Viruses.* MDPI AG, 2014. Vol. 6, № 2. P. 875–892.
 15. Koutsoudakis G. et al. The Level of CD81 Cell Surface Expression Is a Key Determinant for Productive Entry of Hepatitis C Virus into Host Cells // *J. Virol.* American Society for Microbiology, 2007. Vol. 81, № 2. P. 588–598.
 16. Tong Y. et al. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. // *J. Virol.* 2011. Vol. 85, № 6. P. 2793–2802.
 17. Deest M. et al. Impact of single nucleotide polymorphisms in the essential HCV entry factor CD81 on HCV infectivity and neutralization // *Antiviral Res.* 2014. Vol. 101, № 1. P. 37–44.
 18. Flint M. et al. Diverse CD81 Proteins Support Hepatitis C Virus Infection // *J. Virol.* 2006. Vol. 80, № 22. P. 11331–11342.
 19. Ali I. et al. Progress in polymeric nano-medicines for theranostic cancer treatment // *Polymers.* MDPI AG, 2020. Vol. 12, № 3.
 20. De Temmerman M.L. et al. Particulate vaccines: On the quest for optimal delivery and immune response // *Drug Discovery Today.* 2011. Vol. 16, № 13–14. P. 569–582.
 21. Hayes C.E., Macphail S., Bach F.H. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. //

- Biomaterials. 1996. Vol. 17, № 2. P. 93–102.
22. Silva J.M. et al. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines // *Journal of Controlled Release*. 2013. Vol. 168, № 2. P. 179–199.
 23. Lamalle-Bernard D. et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity // *J. Control. Release*. 2006. Vol. 115, № 1. P. 57–67.
 24. Pavot V. et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties // *J. Control. Release*. 2013. Vol. 167, № 1. P. 60–67.
 25. Quintilio W. et al. Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsulated vaccine formulation without stabilizers. // *Curr. Drug Deliv*. 2009. Vol. 6, № 3. P. 297–04.
 26. Xu F.H., Zhang Q. Recent advances in the preparation progress of protein/peptide drug loaded PLA/PLGA microspheres // *Yaoxue Xuebao*. 2007. Vol. 42, № 1. P. 1–7.
 27. Aguado M.T., Lambert P.H. Controlled-Release Vaccines-Biodegradable Polylactide/Polyglycolide (PL/PG) Microspheres as Antigen Vehicles // *Immunobiology*. 1992. Vol. 184, № 2–3. P. 113–125.
 28. Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2012. Vol. 64, № SUPPL. P. 61–71.
 29. Cooper N.R., Nemerow G.R. The role of antibody and complement in the control of viral infections // *J. Invest. Dermatol*. 1984. Vol. 83, № 1 SUPPL. P. S121–S127.
 30. Newman K.D. et al. Uptake of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo // *J. Biomed. Mater. Res*. 2002. Vol. 60, № 3. P. 480–486.
 31. Chong C.S.W. et al. Enhancement of T helper type 1 immune responses

- against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery // *J. Control. Release*. 2005.
32. Guillon C. et al. Formulation of HIV-1 Tat and p24 antigens by PLA nanoparticles or MF59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits // *Vaccine*. 2007. Vol. 25, № 43. P. 7491–7501.
 33. Ataman-Önal Y. et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models // *J. Control. Release*. 2006. Vol. 112, № 2. P. 175–185.
 34. Tobío M. et al. Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system // *Vaccine*. 1999. Vol. 18, № 7–8. P. 618–622.
 35. Mohaghegh M., Tafaghodi M. Dextran microspheres could enhance immune responses against PLGA nanospheres encapsulated with tetanus toxoid and Quillaja saponins after nasal immunization in rabbit // *Pharm. Dev. Technol.* 2011. Vol. 16, № 1. P. 36–43.
 36. Korzhikov V. et al. Polyester-based microparticles of different hydrophobicity: the patterns of lipophilic drug entrapment and release // *J. Microencapsul.* 2016.
 37. Chang E.H. et al. Nanomedicine: Past, present and future - A global perspective // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier Ltd, 2015. Vol. 468, № 3. P. 511–517.
 38. Sainz V. et al. Regulatory aspects on nanomedicines. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Academic Press Inc., 2015. Vol. 468, № 3. P. 504–510.
 39. Hubbell J.A. Prescription for a pharmacy // *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science, 2015. Vol. 7, № 291.
 40. Freitas R.A. Pharmacytes: An ideal vehicle for targeted drug delivery // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2006. Vol. 6, № 9–10. P.

2769–2775.

41. Yoo J.W. et al. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011. Vol. 10, № 7. P. 521–535.
42. Bahmani B., Bacon D., Anvari B. Erythrocyte-derived photo-theranostic agents: Hybrid nano-vesicles containing indocyanine green for near infrared imaging and therapeutic applications // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3.
43. Choi M.R. et al. A cellular trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors // *Nano Lett.* 2007. Vol. 7, № 12. P. 3759–3765.
44. Alizadeh D. et al. Tumor-associated macrophages are predominant carriers of cyclodextrin-based nanoparticles into gliomas // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2010. Vol. 6, № 2. P. 382–390.
45. Ruiz-Hitzky E. et al. Advances in Biomimetic and Nanostructured Biohybrid Materials // *Adv. Mater.* John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 22, № 3. P. 323–336.
46. Lubitz P., Mayr U.B., Lubitz W. Applications of bacterial ghosts in biomedicine // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. Vol. 655. P. 159–170.
47. Wan Y., Li X., Wang S. Recent Advances in Biohybrid Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine // *J. Mol. Eng. Mater.* World Scientific Pub Co Pte Lt, 2016. Vol. 04, № 01. P. 1640001.
48. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges // *Nature Reviews Cancer*. 2005. Vol. 5, № 3. P. 161–171.
49. Toy R. et al. Targeted nanotechnology for cancer imaging // *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 2014. Vol. 76, № 1. P. 79–97.
50. Xu H., Li Z., Si J. Nanocarriers in gene therapy: A review // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. American Scientific Publishers, 2014. Vol. 10, № 12. P. 3483–3507.
51. Khang D. et al. Nanotechnology for regenerative medicine // *Biomedical Microdevices*. 2010. Vol. 12, № 4. P. 575–587.
52. Zhang X., Guo Q., Cui D. Recent advances in nanotechnology applied to

- biosensors // *Sensors*. 2009. Vol. 9, № 2. P. 1033–1053.
53. Lammers T. et al. Theranostic nanomedicine // *Acc. Chem. Res. American Chemical Society*, 2011. Vol. 44, № 10. P. 1029–1038.
 54. Farokhzad O.C., Langer R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities // *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, 2006. Vol. 58, № 14. P. 1456–1459.
 55. Pathak C., Vaidya F.U., Pandey S.M. Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System // *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*. Elsevier, 2019. P. 35–67.
 56. Wang X. et al. Comparative Study of Three Carbon Additives: Carbon Nanotubes, Graphene, and Fullerene-C60, for Synthesizing Enhanced Polymer Nanocomposites // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, № 5. P. 838.
 57. Литасова Е.В. и др. Биодegradация молекул фуллерена C 60 под действием миелопероксидазы // *Доклады Академии наук. Akademizdatcenter Nauka*, 2016. Т. 471, № 3. С. 362–365.
 58. Lee M.K. Liposomes for enhanced bioavailability of water-insoluble drugs: In vivo evidence and recent approaches // *Pharmaceutics*. MDPI AG, 2020. Vol. 12, № 3.
 59. Haider M. et al. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review // *Pharmaceutics*. MDPI AG, 2020. Vol. 12, № 3. P. 288.
 60. Khan A.A. et al. Recent strategies towards the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications // *3 Biotech*. Springer, 2020. Vol. 10, № 4.
 61. Kazzaz J. et al. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency // *J. Control. Release*. 2006. Vol. 110, № 3. P. 566–573.
 62. Raghuvanshi R.S. et al. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization

- protocol and adjuvants // *Int. J. Pharm.* Elsevier, 2002. Vol. 245, № 1–2. P. 109–121.
63. Rodríguez-Cruz I.M. et al. Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery systems // *Int. J. Pharm.* 2009. Vol. 371, № 1–2. P. 177–181.
64. Xie Z. et al. Immune Cell-Mediated Biodegradable Theranostic Nanoparticles for Melanoma Targeting and Drug Delivery // *Small*. Wiley-VCH Verlag, 2017. Vol. 13, № 10.
65. Noble G.T. et al. Ligand-targeted liposome design: Challenges and fundamental considerations // *Trends in Biotechnology*. 2014. Vol. 32, № 1. P. 32–45.
66. Bandekar A. et al. Antitumor efficacy following the intracellular and interstitial release of liposomal doxorubicin // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, № 17. P. 4345–4352.
67. Cun D., Wan F., Yang M. Formulation Strategies and Particle Engineering Technologies for Pulmonary Delivery of Biopharmaceuticals // *Curr. Pharm. Des.* Bentham Science Publishers Ltd., 2015. Vol. 21, № 19. P. 2599–2610.
68. Batchelor H.K. et al. Application of in vitro biopharmaceutical methods in development of immediate release oral dosage forms intended for paediatric patients // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 2013. Vol. 85, № 3 PART B. P. 833–842.
69. Wan F., Yang M. Design of PLGA-based depot delivery systems for biopharmaceuticals prepared by spray drying // *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 2016. Vol. 498, № 1–2. P. 82–95.
70. Sánchez-López E. et al. Dexibuprofen Biodegradable Nanoparticles: One Step Closer towards a Better Ocular Interaction Study // *Nanomaterials*. MDPI AG, 2020. Vol. 10, № 4. P. 720.
71. Bhattacharjee H., Balabathula P., Wood G.C. Targeted nanoparticulate drug-delivery systems for treatment of solid tumors: A review // *Therapeutic*

- Delivery. 2010. Vol. 1, № 5. P. 713–734.
72. Severino P. et al. Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting // *Curr. Pharm. Des.* Bentham Science Publishers Ltd., 2019. Vol. 25, № 11. P. 1312–1334.
 73. Vlieghe P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market // *Drug Discovery Today*. 2010. Vol. 15, № 1–2. P. 40–56.
 74. Shah R.R. et al. The impact of size on particulate vaccine adjuvants // *Nanomedicine*. Future Medicine Ltd., 2014. Vol. 9, № 17. P. 2671–2681.
 75. Lettiero B. et al. Complement system and the brain: Selected pathologies and avenues toward engineering of neurological nanomedicines // *Journal of Controlled Release*. 2012. Vol. 161, № 2. P. 283–289.
 76. Schwendeman S.P. et al. New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine // *J. Microencapsul.* Informa Healthcare, 1998. Vol. 15, № 3. P. 299–318.
 77. Jaganathan K.S. et al. Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: A comparative study of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres // *Int. J. Pharm.* Elsevier, 2005. Vol. 294, № 1–2. P. 23–32.
 78. Guermonprez P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells // *Annu. Rev. Immunol.* Annual Reviews, 2002. Vol. 20, № 1. P. 621–667.
 79. Heath W.R., Carbone F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance // *Nature Reviews Immunology*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, 2001. Vol. 1, № 2. P. 126–134.
 80. Oyewumi M.O., Kumar A., Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses // *Expert Review of Vaccines*. 2010. Vol. 9, № 9. P. 1095–1107.
 81. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response // *Vaccine*. 2010. Vol. 28, № SUPPL. 3.

82. Coffman R.L., Sher A., Seder R.A. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work // *Immunity*. 2010. Vol. 33, № 4. P. 492–503.
83. Tacke P.J., Figdor C.G. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: Steps towards cost effective vaccines // *Seminars in Immunology*. 2011. Vol. 23, № 1. P. 12–20.
84. Ehrlich M. et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits // *Cell*. 2004. Vol. 118, № 5. P. 591–605.
85. Kirchhausen T. et al. Single-molecule live-cell imaging of clathrin-based endocytosis // *Biochem. Soc. Symp.* Portland Press Ltd, 2005. Vol. 72. P. 71–76.
86. Sorkin A. Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: A team effort // *Current Opinion in Cell Biology*. 2004. Vol. 16, № 4. P. 392–399.
87. Leleux J., Roy K. Micro and Nanoparticle-Based Delivery Systems for Vaccine Immunotherapy: An Immunological and Materials Perspective // *Advanced Healthcare Materials*. Wiley-VCH Verlag, 2013. Vol. 2, № 1. P. 72–94.
88. Smith D.M., Simon J.K., Baker J.R. Applications of nanotechnology for immunology // *Nature Reviews Immunology*. 2013. Vol. 13, № 8. P. 592–605.
89. Duncanson W.J. et al. Targeted binding of PLA microparticles with lipid-PEG-tethered ligands // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28, № 33. P. 4991–4999.
90. Vremec D., Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. // *J. Immunol.* 1997. Vol. 159, № 2. P. 565–573.
91. Manolova V. et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size // *Eur. J. Immunol.* 2008. Vol. 38, № 5. P. 1404–1413.
92. Hardy C.L. et al. Differential Uptake of Nanoparticles and Microparticles by Pulmonary APC Subsets Induces Discrete Immunological Imprints // *J.*

- Immunol. The American Association of Immunologists, 2013. Vol. 191, № 10. P. 5278–5290.
93. Kayser O., Lemke A., Hernandez-Trejo N. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems // Curr. Pharm. Biotechnol. Bentham Science Publishers Ltd., 2016. Vol. 6, № 1. P. 3–5.
 94. Jain K.K. The role of nanobiotechnology in drug discovery // Drug Discovery Today. 2005. Vol. 10, № 21. P. 1435–1442.
 95. Liu J., Zhang R., Xu Z.P. Nanoparticle-Based Nanomedicines to Promote Cancer Immunotherapy: Recent Advances and Future Directions // Small. Wiley-VCH Verlag, 2019. Vol. 15, № 32.
 96. Newman K.D., McBurney M.W. Poly(D,L lactic-co-glycolic acid) microspheres as biodegradable microcarriers for pluripotent stem cells // Biomaterials. 2004. Vol. 25, № 26. P. 5763–5771.
 97. Foged C. et al. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model // International Journal of Pharmaceutics. 2005. Vol. 298, № 2. P. 315–322.
 98. Lerch S. et al. Polymeric nanoparticles of different sizes overcome the cell membrane barrier // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2013. Vol. 84, № 2. P. 265–274.
 99. Blank F. et al. Size-dependent uptake of particles by pulmonary antigen-presenting cell populations and trafficking to regional lymph nodes // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2013. Vol. 49, № 1. P. 67–77.
 100. Yazdimamaghani M. et al. Influence of Silica Nanoparticle Density and Flow Conditions on Sedimentation, Cell Uptake, and Cytotoxicity // Mol. Pharm. American Chemical Society, 2018. Vol. 15, № 6. P. 2372–2383.
 101. Cho E.C., Zhang Q., Xia Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles // Nat. Nanotechnol. Nature Publishing Group, 2011. Vol. 6, № 6. P. 385–391.

102. Chaw C.S. et al. Water-soluble betamethasone-loaded poly(lactide-co-glycolide) hollow microparticles as a sustained release dosage form // *J. Microencapsul.* 2003. Vol. 20, № 3. P. 349–359.
103. Dong Y., Feng S.S. Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26, № 30. P. 6068–6076.
104. Cruz L.J. et al. The influence of PEG chain length and targeting moiety on antibody-mediated delivery of nanoparticle vaccines to human dendritic cells // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, № 28. P. 6791–6803.
105. Yih T.C., Al-Fandi M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems // *Journal of Cellular Biochemistry.* 2006. Vol. 97, № 6. P. 1184–1190.
106. Cheon J., Lee J.H. Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology // *Acc. Chem. Res.* 2008. Vol. 41, № 12. P. 1630–1640.
107. Yoon T.J. et al. Specific targeting, cell sorting, and bioimaging with smart magnetic silica core-shell nanomaterials // *Small.* 2006. Vol. 2, № 2. P. 209–215.
108. Kiefer R. et al. Targeted delivery of functionalized PLGA nanoparticles to macrophages by complexation with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Biotechnol. Bioeng.* John Wiley and Sons Inc., 2020. Vol. 117, № 3. P. 776–788.
109. Bramwell V.W., Perrie Y. Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? // *J. Pharm. Pharmacol.* Wiley, 2006. Vol. 58, № 6. P. 717–728.
110. Storni T. et al. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems // *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier B.V., 2005. Vol. 57, № 3 SPEC. ISS. P. 333–355.
111. Ding D., Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the

- delivery of biomacromolecular therapeutics // *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 92. P. 1041–1060.
112. Mir M., Ahmed N., Rehman A. ur. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., 2017. Vol. 159. P. 217–231.
 113. Kapoor D.N. et al. PLGA: A unique polymer for drug delivery // *Therapeutic Delivery*. Future Science Ltd, 2015. Vol. 6, № 1. P. 41–58.
 114. Pang X. et al. Polylactic acid (PLA): Research, development and industrialization // *Biotechnology Journal*. 2010. Vol. 5, № 11. P. 1125–1136.
 115. Madhavan Nampoothiri K., Nair N.R., John R.P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, № 22. P. 8493–8501.
 116. Nofar M. et al. Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 2019. Vol. 125. P. 307–360.
 117. Lasprilla A.J.R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review // *Biotechnology Advances*. 2012. Vol. 30, № 1. P. 321–328.
 118. Singhvi M.S., Zinjarde S.S., Gokhale D. V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications // *Journal of Applied Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 2019. Vol. 127, № 6. P. 1612–1626.
 119. Lassalle V., Ferreira M.L. PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation // *Macromolecular Bioscience*. 2007. Vol. 7, № 6. P. 767–783.
 120. Nagarwal R.C. et al. Modified PLA nano in situ gel: A potential ophthalmic drug delivery system // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011. Vol. 86, № 1. P. 28–34.
 121. Mundargi R.C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular

- therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives // *Journal of Controlled Release*. 2008. Vol. 125, № 3. P. 193–209.
122. Thauvin C. et al. Functionalized PLA polymers to control loading and/or release properties of drug-loaded nanoparticles // *Int. J. Pharm. Elsevier B.V.*, 2018. Vol. 548, № 2. P. 771–777.
123. Qiao C. et al. Using poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres to encapsulate plasmid of bone morphogenetic protein 2/polyethylenimine nanoparticles to promote bone formation in vitro and in vivo // *Int. J. Nanomedicine*. 2013. Vol. 8. P. 2985–2995.
124. Shive, Anderson. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997. Vol. 28, № 1. P. 5–24.
125. Meunier M., Goupil A., Lienard P. Predicting drug loading in PLA-PEG nanoparticles // *Int. J. Pharm. Elsevier B.V.*, 2017. Vol. 526, № 1–2. P. 157–166.
126. Chen J. et al. The exploration of endocytic mechanisms of PLA-PEG nanoparticles prepared by coaxial tri-capillary electrospray-template removal method // *Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V.*, 2018. Vol. 161. P. 10–17.
127. Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers // *Biomaterials. Elsevier Science Ltd*, 1996. Vol. 17, № 2. P. 93–102.
128. Dixit S. et al. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles provide sustained delivery of a *Chlamydia trachomatis* recombinant MOMP peptide and potentiate systemic adaptive immune responses in mice // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2014. Vol. 10, № 6. P. 1311–1321.
129. Eyles J.E. et al. Intra nasal administration of poly-lactic acid microsphere co-encapsulated *Yersinia pestis* subunits confers protection from pneumonic

- plague in the mouse // *Vaccine*. 1998. Vol. 16, № 7. P. 698–707.
130. Liang B., Hyland L., Hou S. Nasal-Associated Lymphoid Tissue Is a Site of Long-Term Virus-Specific Antibody Production following Respiratory Virus Infection of Mice // *J. Virol. American Society for Microbiology*, 2001. Vol. 75, № 11. P. 5416–5420.
131. Gourdon B. et al. Double or Simple Emulsion Process to Encapsulate Hydrophilic Oxytocin Peptide in PLA-PEG Nanoparticles // *Pharm. Res. Springer New York LLC*, 2018. Vol. 35, № 4.
132. Wurm M.C. et al. In-vitro evaluation of Polylactic acid (PLA) manufactured by fused deposition modeling // *J. Biol. Eng. BioMed Central Ltd.*, 2017. Vol. 11, № 1.
133. Yin W., Yates M.Z. Encapsulation and sustained release from biodegradable microcapsules made by emulsification/freeze drying and spray/freeze drying // *J. Colloid Interface Sci.* 2009. Vol. 336, № 1. P. 155–161.
134. Yang Y. et al. Recent Advance in Polymer Based Microspheric Systems for Controlled Protein and Peptide Delivery // *Curr. Med. Chem. Bentham Science Publishers Ltd.*, 2019. Vol. 26, № 13. P. 2285–2296.
135. Savaris M., Santos V. dos, Brandalise R.N. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly(lactic acid) // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier Ltd*, 2016. Vol. 69. P. 661–667.
136. Zhao Y. et al. Effect of different sterilization methods on the properties of commercial biodegradable polyesters for single-use, disposable medical devices // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier Ltd*, 2019. Vol. 105.
137. Tzeng S.Y. et al. Thermostabilization of inactivated polio vaccine in PLGA-based microspheres for pulsatile release // *J. Control. Release. Elsevier B.V.*, 2016. Vol. 233. P. 101–113.
138. Gupta R.K., Chang A.C., Siber G.R. Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems. // *Developments in biological standardization*. 1998. Vol. 92. P. 63–78.

139. Lin C.Y. et al. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases // *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor and Francis Inc., 2015. Vol. 11, № 3. P. 650–656.
140. Johansen P. et al. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs // *Vaccine*. 1999. Vol. 18, № 3–4. P. 209–215.
141. Gupta R.K. et al. Soybean agglutinin coated PLA particles entrapping candidate vaccines induces enhanced primary and sustained secondary antibody response from single point immunization // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012. Vol. 45, № 3. P. 282–295.
142. Vila A. et al. PLA-PEG particles as nasal protein carriers: The influence of the particle size // *Int. J. Pharm.* Elsevier, 2005. Vol. 292, № 1–2. P. 43–52.
143. Wang Y. et al. Cutting Edge: Polyinosinic:Polycytidylic Acid Boosts the Generation of Memory CD8 T Cells through Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 Expressed in Stromal Cells // *J. Immunol.* The American Association of Immunologists, 2010. Vol. 184, № 6. P. 2751–2755.
144. McCartney S. et al. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells // *J. Exp. Med.* 2009. Vol. 206, № 13. P. 2967–2976.
145. Jaganathan K.S., Vyas S.P. Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally // *Vaccine*. 2006. Vol. 24, № 19. P. 4201–4211.
146. Saini V. et al. Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres // *J. Drug Target*. 2010. Vol. 18, № 3. P. 212–222.

147. O'Hagan D.T. et al. Microparticles in MF59, a potent adjuvant combination for a recombinant protein vaccine against HIV-1 // *Vaccine*. 2000. Vol. 18, № 17. P. 1793–1801.
148. McGuire E.P. et al. HIV-Exposed Infants Vaccinated with an MF59/Recombinant gp120 Vaccine Have Higher-Magnitude Anti-V1V2 IgG Responses than Adults Immunized with the Same Vaccine // *J. Virol.* American Society for Microbiology, 2017. Vol. 92, № 1.
149. Aline F. et al. Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination // *Vaccine*. 2009. Vol. 27, № 38. P. 5284–5291.
150. Pavot V. et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties // *J. Control. Release*. 2013. Vol. 167, № 1. P. 60–67.
151. Chen W.L. et al. Disintegration and cancer immunotherapy efficacy of a squalane-in-water delivery system emulsified by bioresorbable poly(ethylene glycol)-block-poly lactide // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, № 5. P. 1686–1695.
152. Kissick H.T., Sanda M.G. The role of active vaccination in cancer immunotherapy: Lessons from clinical trials // *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 35. P. 15–22.
153. Callahan M.K., Wolchok J.D. At the Bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy // *J. Leukoc. Biol.* Wiley, 2013. Vol. 94, № 1. P. 41–53.
154. Zöller M. Immunotherapy of cancer by active vaccination: Does allogeneic bone marrow transplantation after non-myeloablative conditioning provide a new option? // *Technology in Cancer Research and Treatment*. Adenine Press, 2003. Vol. 2, № 3. P. 237–260.
155. Daud A.I. Part I: Checkpoint inhibitors in cancer therapy // *Immunotherapy*. Future Medicine Ltd., 2016. Vol. 8, № 6. P. 675–676.

156. He X.-S. et al. Cellular Immune Responses in Children and Adults Receiving Inactivated or Live Attenuated Influenza Vaccines // *J. Virol.* 2006. Vol. 80, № 23. P. 11756–11766.
157. Сахабеев Р.Г. и др. Гуморальный иммунный ответ на антиген, иммобилизованный на наночастицах из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля // *Молекулярная медицина.* 2019. Т. 17, № 3. С. 32–36.
158. Поляков Д.С. и др. Влияние наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка // *Инфекция и иммунитет.* 2017. Т. 7, № 2. С. 123–129.
159. Shedlock D.J., Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory // *Science (80-.). Science,* 2003. Vol. 300, № 5617. P. 337–339.
160. Martin-Orozco N. et al. T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity // *Immunity.* Elsevier, 2009. Vol. 31, № 5. P. 787–798.
161. Ekkens M.J. et al. Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses // *Infect. Immun. American Society for Microbiology (ASM),* 2007. Vol. 75, № 5. P. 2291–2296.
162. Huang H. et al. CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes // *Immunology.* Wiley-Blackwell, 2007. Vol. 120, № 2. P. 148–159.
163. Kong L. et al. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure // *Science (80-.). Science,* 2013. Vol. 342, № 6162. P. 1090–1094.
164. Solovyov K. V. et al. Expression in e. coli and purification of the fibrillogenic fusion proteins TTR-sfGFP and β 2M-sfGFP // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2011. Vol. 41, № 4. P. 337–349.