

**ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ ФИБРИЛЛОГЕННОГО БЕЛКА
β2-МИКРОГЛОБУЛИНА, КОНЪЮГИРОВАННОГО С РАЗЛИЧНЫМИ
ТИПАМИ ПОЛИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ**

© 2023 г. Р. Г. Сахабеев^{1, 2, *}, Д. С. Поляков², Е. С. Синицына³,
Е. Г. Коржикова-Влах³, В. А. Коржиков-Влах^{3, 4}, М. М. Шавловский²

¹Санкт-Петербургский технологический институт (Технический университет),
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: helm505@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2023 г.

После доработки 08.02.2023 г.

Принята к публикации 10.02.2023 г.

В работе изучали влияние состава и размера полимерных частиц на иммуногенность фибриллогенного белка β2-микроглобулина, иммобилизованного на их поверхности. С этой целью использовали наночастицы (НЧ) на основе сополимера L-глутаминовой кислоты и L-фенилаланина (П(Глу-со-Фен)) и блок-сополимера поли(этиленгликоля) с поли(молочной кислотой) (ПЭГ-б-ПМК), а также микрочастицы (МЧ) на основе поли(молочной кислоты) (ПМК). НЧ на основе сополимера α-L-аминокислот получали методом градиентной инверсии фаз, а НЧ на основе ПЭГ-б-ПМК – методом наноосаждения. Для формирования полимерных МЧ на основе ПМК использовали метод двойной эмульсии. Рекомбинантный химерный модельный белок бета-2-микроглобулин-зеленый флуоресцентный белок (β2M-sfGFP) использовали для ковалентной модификации всех типов полимерных частиц с последующей иммунизацией четырех равных по численности групп лабораторных животных. Для оценки гуморального иммунного ответа использовали метод иммуноферментного анализа. В трех экспериментальных группах проводили иммунизацию мышей с использованием НЧ на основе полиаминокислот (НЧ-ПАК) и ПЭГ-б-ПМК (НЧ-ПМК), а также МЧ ПМК, содержащих на поверхности иммобилизованный β2M-sfGFP. Иммунизацию контрольной группы проводили с использованием физической смеси НЧ ПЭГ-б-ПМК и свободного β2M-sfGFP. Наибольший уровень антител к sfGFP в сыворотке крови содержался в случае иммунизации мышей смесью белка и НЧ. При иммунизации мышей НЧ, модифицированными β2M-sfGFP, количество антител к sfGFP было значимо ниже ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой. Однако между собой группы, иммунизированные НЧ схожего размера, но разного состава, конъюгированные с модельными белком, достоверно не отличались. Также установлено, что размер частиц влияет на иммуногенность связанного с ними белка. Аналогичная картина относительного содержания антител в сыворотках крови мышей сохранялась на всех этапах иммунизации.

Ключевые слова: иммунизация, иммунный ответ, белковый антиген, полимерные микро- и наночастицы, комплексные антигены

DOI: 10.31857/S0869813923030093, EDN: FSXLJI

В настоящее время микро- и наночастицы (МЧ и НЧ) на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров представляют значительный интерес в качестве систем адресной доставки лекарств [1, 2], создания ловушек для снижения вирусной нагрузки [3], а также создания вакцин нового поколения [4]. Во всех перечисленных случаях МЧ и НЧ являются носителями, на поверхности которых иммобилизуется соответствующий белок, играющий роль векторного лиганда, рецептора или антигена в зависимости от поставленной задачи. В всех случаях реализуется принцип молекулярного распознавания, основанный на взаимодействии белка, иммобилизованного на поверхности МЧ или НЧ, со специфической биологической мишенью *in vivo*.

В идеальном случае используемые полимерные частицы-носители должны быть нетоксичными, биоразлагаемыми, биосовместимыми и физико-химически стабильными *in vitro* и *in vivo* [5]. Ожидается, что физико-химические свойства полимерных частиц, такие как размер (гидродинамический диаметр, D_H), поверхностный заряд (ζ -потенциал) и химическая природа НЧ может оказывать влияние на ее поведение *in vivo*, и, прежде всего, на взаимодействие с белками плазмы крови и различными клетками организма.

Несмотря на то, что полимерные частицы представляют собой широко используемые платформы для доставки различных малых молекул и биологических субстанций и могут быть нацелены на клетки или органы с помощью функционализации поверхности частиц, вариации их размера, поверхностного заряда или природы полимера, до сих пор остается неясным, как полимерные частицы влияют на иммунный ответ. Например, имеются противоречивые сообщения о влиянии размера частиц на их адъювантность [6, 7]. Систематические и контролируемые исследования помогут выяснить роль различных свойств частиц с целью их последующей настройки для достижения желаемого терапевтического иммунного ответа.

В рамках данной работы изучено влияние физико-химических характеристик полимерных частиц на иммуногенность белка, иммобилизованного на их поверхности. С этой целью использовали НЧ на основе сополимера L-глутаминовой кислоты и L-фенилаланина (П(Глу-*co*-Фен)) и блок-сополимера поли(этиленгликоля) с поли(молочной кислотой) (ПЭГ-*b*-ПМК), а также МЧ на основе поли(молочной кислоты) (ПМК). ПМК и ПЭГ-*b*-ПМК являются хорошо известными и одобренными для медицинского использования полимерами [8, 9]. Ранее нами показано, что НЧ на основе сополимера поли(глутаминовой кислоты) с фенилаланином также являются биосовместимыми, нетоксичными и демонстрируют низкую скорость захвата макрофагами *in vitro* [10]. Данные частицы формируются благодаря самоорганизации П(Глу-*co*-Фен) в водной среде, вследствие чего остатки фенилаланина оказываются спрятанными внутри НЧ, тогда как на ее поверхности располагаются остатки глутаминовой кислоты. Известно, что поли(глутаминовая кислота) является биосовместимой и нетоксичной, в настоящее время применяется в косметологии и активно изучается для применения в составе лекарств [11–13]. В частности, на сегодняшний день данный полимер используется в качестве полимерного носителя в лекарственной форме Poliglumex[®], представляющей собой конъюгат поли(глутаминовой кислоты) с паклитакселом (Cell Therapeutics, Южная Корея) [14].

Все использованные в работе полимерные частицы имели отрицательный заряд поверхности. Из литературных данных известно, что в отличие от быстро опсонизирующихся катионных частиц, анионные и нейтральные системы демонстрируют сниженное внутриклеточное проникновение и захват макрофагами [15, 16]. Для изучения влияния природы и размера частицы на иммуногенные свойства белка, связанного с полимерным носителем, использовали модельный рекомбинантный фибриллогенный белок β 2M-sfGFP.

Целью работы являлось изучение влияния размера и состава полимерных микро- и наночастиц на иммуногенность модельного белка. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: получение в очищенном виде рекомбинантного модельного белка β 2M-sfGFP; осуществление конъюгации выбранного модельного белка с разными типами полимерных частиц; осуществление иммунизаций мышей полученными модифицированными наночастицами и контрольным свободным белком, получение сыворотки крови иммунизированных мышей; изучение гуморального иммунного ответа у мышей на иммобилизованный белок при внутрибрюшинном введении препаратов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение рекомбинантного модельного белка слияния β 2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком

Белок β 2M-sfGFP получали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой, содержащей ген слитого белка β 2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком. Подробная методика синтеза, выделения и очистки опубликована ранее в работе [17]. Для определения концентрации белка в растворе использовали спектрофотометр Thermo Scientific NanoDrop 2000. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм. Молекулярная масса белка составляла 40 кДа.

Получение наночастиц на основе П(Глу-со-Фен)

Сополимер глутаминовой кислоты и фенилаланина синтезировали методом полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксииангидридов α -L-аминокислот в точности как описано ранее [18]. Структуру сополимера, состав и среднечисловую молекулярную массу (M_n) определяли методом ^1H ЯМР-спектроскопии [18] с использованием ядерного магнитного резонанса спектрометра Bruker Avance III 500 MHz (Германия).

НЧ на основе сополимера α -L-аминокислот формировали методом градиентной инверсии фаз (диализ) с органической фазы (диметилформамид) на воду, с последующим лиофильным высушиванием и редиспергированием заданной навески НЧ в воде или 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7.4) при кратковременном (30 с) воздействии ультразвука [18].

Получение наночастиц на основе ПЭГ-б-ПМК

Сополимер ПЭГ-б-ПМК получали методом полимеризации с раскрытием цикла D,L-лактида с использованием монометилового эфира ПЭГ-5000 в качестве инициатора. Структуру сополимера определяли методом ^1H ЯМР-спектроскопии [19]. Молекулярно-массовые характеристики сополимера изучали методом эксклюзионной жидкостной хроматографии в тетрагидрофуране с использованием стандартов полистирола. Анализ проводили с использованием хроматографической системы Shimadzu LC-20 Prominence (Япония), оснащенной рефрактометрическим детектором RID 10-A и колонкой Agilent PLgel MIXED-D (5 мкм, 7.5 мм \times 300 мм).

Формирование полимерных частиц на основе ПЭГ-б-ПМК осуществляли методом наноосаждения сополимера из раствора в ацетонитриле в воду при интенсивном перемешивании, как описано нами ранее [19]. Концентрация сополимера в органической фазе составляла 5 мг/мл. Соотношение органической фазы к водной составляло 1/5, скорость перемешивания 900 об./мин. Для удаления органического

растворителя систему оставляли открытой при перемешивании в течение 24 ч (25°C). Выход НЧ составил 93%.

Получение микрочастиц на основе ПМК

Получение МЧ осуществляли согласно ранее описанной методике [3, 20]. Кратко, для формирования полимерных МЧ на основе ПМК использовали метод двойной эмульсии. Органическая фаза представляла собой раствор ПМК в дихлорметане (50 мг/мл). Первая водная фаза представляла собой смешанный раствор 1% натрий лаурилсульфата и 5% Lutrol F68 в воде. Для получения эмульсии типа использовали ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS HD 2070, снабженный микрозондом MS 73 диаметром 3 мм (Bandelin, Германия). Органическую фазу добавляли в первую водную фазу с применением одноканального шприцевого насоса BYZ-810D (Wuond, Китай); скорость введения 2 мл/мин. Соотношение объемов органическая фаза/водная фаза составляло 1/10. После завершения смешения фаз полученную эмульсию подвергали воздействию ультразвука в течение 30 с и перемешиванию со скоростью 800 об./мин.

Для компактизации капель эмульсии полученную первичную эмульсию в течение 10–15 с вносили в предварительно охлажденную до 4°C вторую водную фазу, представляющую собой 1%-ный раствор поли(винилового спирта) в воде. Соотношение объемов водная фаза 1/водная фаза 2 составляло 1/3. Удаление дихлорметана осуществляли с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML/G3B, Германия). После формирования суспензии частицы осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10000 g, 4°C). Далее частицы редицергировали под действием ультразвука в течение 5 с в дистиллированной воде и снова осаждали. Процедуру промывания частиц водой повторяли трижды с целью удаления поверхностно-активных веществ.

Изучение характеристик полученных полимерных частиц

Средний гидродинамический диаметр (D_H) МЧ и НЧ, а также электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) их поверхности определяли методом динамического и электрофоретического рассеяния света с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Ковалентная модификация поверхности частиц белком β 2M-sfGFP

НЧ на основе П(Глу-*co*-Фен) содержат в составе сополимера γ -карбоксильные группы глутаминовой кислоты, пригодные для активации и последующего ковалентного связывания белка.

Для активации частиц на основе ПМК и ПЭГ-*b*-ПМК на их поверхности предварительно генерировали карбоксильные группы путем частичного гидролиза сложноэфирных связей ПМК на поверхности частиц 0.1 М раствором NaOH, согласно ранее опубликованному протоколу [21]. После гидролиза частицы отделяли и промывали дистиллированной водой с использованием центрифугирования (14000 g, 10 мин).

В основе иммобилизации белка на поверхности частиц всех типов лежала реакция между аминокруппами белка и активированными сложноэфирными группами полимера. Карбоксильные группы всех типов полимеров активировали смесью N-гидроксисукцинимид и (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида. Реакцию проводили в 0.05 М буферном растворе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, pH 5.6. После активации избытки реагентов и побочные продукты удаляли центрифугированием или ультрафильтрацией суспензии полимерных МЧ и НЧ соответ-

ственно. К активированным частицам добавляли раствор белка в 0.1 М боратном буферном растворе, рН 8.4 и инкубировали в течение 2 ч в условиях постоянного перемешивания при комнатной температуре (25°C). После окончания реакции иммобилизации МЧ промывали 5 раз водой с центрифугированием и удалением надосадочной жидкости, или использовали метод ультрафильтрации [18].

Количественный анализ белка

Количество иммобилизованного β 2М-sfGFP определяли по разнице количества белка в растворе до и после проведения реакции. Определение концентрации белка в растворе проводили спектрофотометрически при длине волны 490 нм, используя спектрофотометр для измерения оптической плотности в капле Thermo Scientific NanoDrop 2000 (США). Расчет проводили с использованием калибровочной зависимости, предварительно построенной по растворам β 2М-sfGFP с известной концентрацией.

Иммунизация и получение сыворотки крови мышей

В работе были использованы самки-гибриды F1 (СВА х С57BL) массой в среднем 20–25 г (возраст 4–6 мес.). Мышей содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 ч, с предоставлением корма и воды *ad libitum*. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ препараты мышам вводили внутрибрюшинно. Количество НЧ для одной иммунизации во всех опытах составляло 0.1 мг на 1 мыш, количество β 2М-sfGFP – 1 мкг на 1 мыш. Препараты вводились в объеме 0.4 мл на животное.

Изучение сыворотки крови мышей и обработка данных

Анализ содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках крови иммунизированных мышей осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу иммуноферментного анализа (ИФА) [22]. Кратко, в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл 0.05%-ного раствора глутарового альдегида и инкубировали 1 ч при температуре 37°C. 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. Спустя 1 ч инкубирования планшеты в термостимуемом орбитальном шейкере вносили по 200 мкл 3%-ного раствора обезжиренного молока в PBS с добавлением 0.5% Tween 20. Спустя 1 ч инкубирования планшеты в термостимуемом орбитальном шейкере содержимое лунок заменяли на 100 мкл сыворотки крови мышей в 3%-ном растворе обезжиренного молока в PBST в разведениях 1 : 2000, 1 : 1000 и 1 : 500 и снова инкубировали в течение 1 ч. Затем лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST при помощи автоматического планшетного промывателя (Bio-Rad, США) и вносили специфические вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat anti Mouse-HRP, abcam, Великобритания), в разведении 1 : 50000 в 3%-ном растворе молока в PBST в количестве 100 мкл/лунка. Еще через 1 ч вносили по 100 мкл проявителя. Проявитель готовили следующим образом: 5 мг ТМБ растворяли в 1 мл ацетонитриле, разбавляли 0.1 М цитрат-фосфатным буфером, рН 4.0, до 11 мл, после чего непосредственно перед внесением в планшет в полученный раствор добавляли 1 мкл 30%-ного H₂O₂. Спустя 10 мин инкубирования на орбитальном шейкере в темноте измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия).

Таблица 1. Характеристики полимеров и частиц на их основе до и после иммобилизации белка β 2M-sfGFP

Полимер	Тип частиц	$M_n (D)$	Характеристики исходных частиц			Характеристики модифицированных частиц	
			D_H (нм)	ИПД	ζ -потенциал (мВ)	D_H (нм)	ζ -потенциал (мВ)
П(Глу- <i>co</i> -Фен)*	НЧ	6800 (1.15)	120 ± 3	0.19	-45 ± 2	130 ± 5	-44 ± 2
ПЭГ- <i>b</i> -ПМК	НЧ	30 300 (1.20)	115 ± 2	0.09	-33 ± 5	128 ± 5	-37 ± 4
ПМК	МЧ	23 200 (1.13)	1400 ± 10	0.22	-15 ± 3	1427 ± 12	-20 ± 5

* Содержание мономерных звеньев в сополимере составляло: Глу/Фен = 4/1 (мол/мол).

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. Количество мышей в каждой группе было равным 40 особям. Иммуноферментный анализ делался в 3-х повторностях для каждого образца. Стандартное отклонение для группы “контроль” составило 0.212, для группы “НЧ-ПАК” – 0.708, для “НЧ-ПМК” - 0.687, а для группы “МЧ-ПМК” – 0.102.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики полимеров, исходных частиц и частиц, модифицированных белком β 2M-sfGFP (комплексный антиген), представлены в табл. 1. Видно, что все использованные полимеры имели относительно невысокую M_n и узкую дисперсность (D). Полученные НЧ на основе П(Глу-*co*-Фен) и ПЭГ-*b*-ПМК имели близкий D_H около 120 нм и индексы полидисперсности (ИПД), не превышающие 0.2. Полученные полимерные НЧ имели значительный отрицательный заряд поверхности (дзета-потенциал ≤ -30 мВ), что в совокупности с небольшим размером ($D_H \leq 120$ нм) обеспечивало им высокую коллоидную стабильность. Несмотря на относительно невысокое абсолютное значение дзета-потенциала МЧ (15 мВ), данные полимерные частицы также характеризовались высокой коллоидной стабильностью. В этом случае коллоидная стабильность обеспечивалась совокупностью отрицательного заряда поверхности и наличием стабилизирующих ПАВ на поверхности МЧ.

Выбранный метод иммобилизации β 2M-sfGFP обеспечивал формирование гидролитически устойчивой амидной связи между белком и поверхностью полимерной частицы. Условия иммобилизации были оптимизированы так, чтобы получить иммобилизационную емкость, равную 10 мкг/мг частиц. Характеристики комплексных антигенов также представлены в табл. 1.

Иммобилизация белка на поверхности НЧ приводит к небольшому увеличению их D_H . Последнее может быть связано как с образованием дополнительных свободных карбоксильных групп ПМК при частичном гидролизе полимера на поверхности частиц во время модификации, так и со вкладом иммобилизованных молекул белка. В случае частиц на основе П(Глу-*co*-Фен) подобного эффекта не наблюдалось, что обусловлено наличием собственного избыточного содержания свободных карбоксильных групп в полимере.

Для изучения влияния частиц различного типа на иммуногенность модельного белка β 2M-sfGFP проводили иммунизацию 4-х групп мышей, равных по численности. В качестве системы детектирования иммунного ответа использовали sfGFP и антитела к нему. Дизайн эксперимента и экспериментальные группы отражены в табл. 2.

Таблица 2. Состав антигенов и экспериментальные группы для иммунизации

Группа	Тип частиц	Модификация	Свободный белок
Контроль	ПЭГ- <i>б</i> -ПМК	Нет	β 2M-sfGFP
НЧ-ПАК	П(Глу- <i>co</i> -Фен)	Ковалентная иммобилизация β 2M-sfGFP	Нет
НЧ-ПМК	ПЭГ- <i>б</i> -ПМК	Ковалентная иммобилизация β 2M-sfGFP	Нет
МЧ-ПМК	ПМК	Ковалентная иммобилизация β 2M-sfGFP	Нет

В 3 экспериментальных группах проводили иммунизацию мышей с использованием НЧ на основе полиаминокислот (НЧ-ПАК) и ПЭГ-*б*-ПМК (НЧ-ПМК), также МЧ ПМК, содержащих на поверхности иммобилизованный β 2M-sfGFP. Иммунизацию контрольной группы проводили с использованием физической смеси НЧ ПЭГ-*б*-ПМК и свободного β 2M-sfGFP. Для оценки динамики образования антител проводили 4 иммунизации с интервалами по 2 недели. Забор крови мышей осуществляли из щечной вены через 13 дней после каждой иммунизации.

На основании результатов проведенного эксперимента установлено, что данные, характеризующие количество антител, не обладают нормальным распределением в каждой из четырех групп при каждой иммунизации (критерий Шапиро–Уилка). Также данные характеризовались негомогенностью дисперсий (критерий Барлетта). Для попарного сравнения четырех групп внутри каждой иммунизации использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Сравнение уровня специфических антител в различных группах показало, что наибольший уровень антител к sfGFP в сыворотке крови содержался в случае иммунизации мышей смесью белка и НЧ (группа “контроль”). При иммунизации мышей НЧ, модифицированными β 2M-sfGFP (группы “НЧ-ПАК” и “НЧ-ПМК”), количество антител к sfGFP было значимо ниже ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой. Однако между собой группы “НЧ-ПАК” и “НЧ-ПМК” достоверно не отличались ($p = 0.71$). Также было установлено, что размер частиц влияет на иммуногенность связанного с ними белка. Количество антител к sfGFP было значимо ниже в группе “МЧ-ПМК” по сравнению с другими группами (рис. 1).

На рис. 2 представлены суммарные результаты относительного содержания специфических антител к модельному белку во всех четырех иммунизациях в различных группах экспериментальных животных.

Как видно из представленных данных, в контрольной группе наблюдается более высокое содержание специфических антител к модельному белку. В то же время во всех группах, в которых иммунизация проводилась частицами с иммобилизованным на поверхности белком, содержание специфических антител к модельному белку было значительно ниже. Однако сравнение 3 опытных групп позволяет заключить, что комплексные антигены на основе НЧ, модифицированных β 2M-sfGFP, характеризовались большей иммуногенностью, чем комплексный антиген на основе МЧ. При этом природа НЧ (полиаминокислота или поли(молочная кислота)) не оказывала влияния на иммуногенность белка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что мономер белка β 2M-sfGFP в свободном от частиц состоянии вызывает сильно выраженный гуморальный иммунный ответ. Растворимый антиген с током лимфы эффективнее проникает в регионарные лимфоузлы, в которых вследствие процесса рециркуляции лимфоцитов растворимый антиген могут распознать своими иммуноглобулиновыми рецепторами В-лимфоциты, осуществить процессинг антигена и презен-

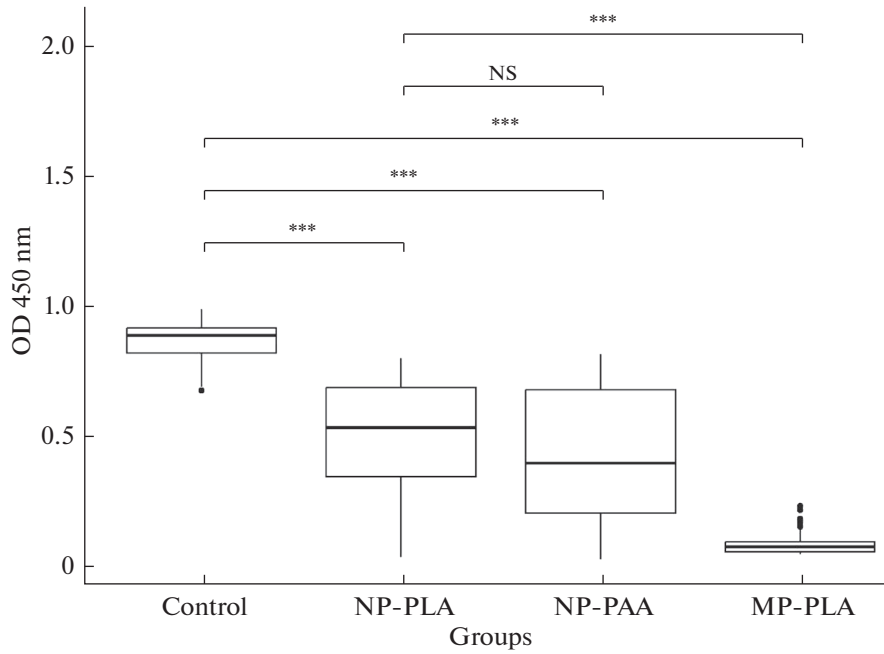


Рис. 1. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках крови мышей, иммунизированных антигенами различного состава (3-я иммунизация). *** – $p < 0.001$.

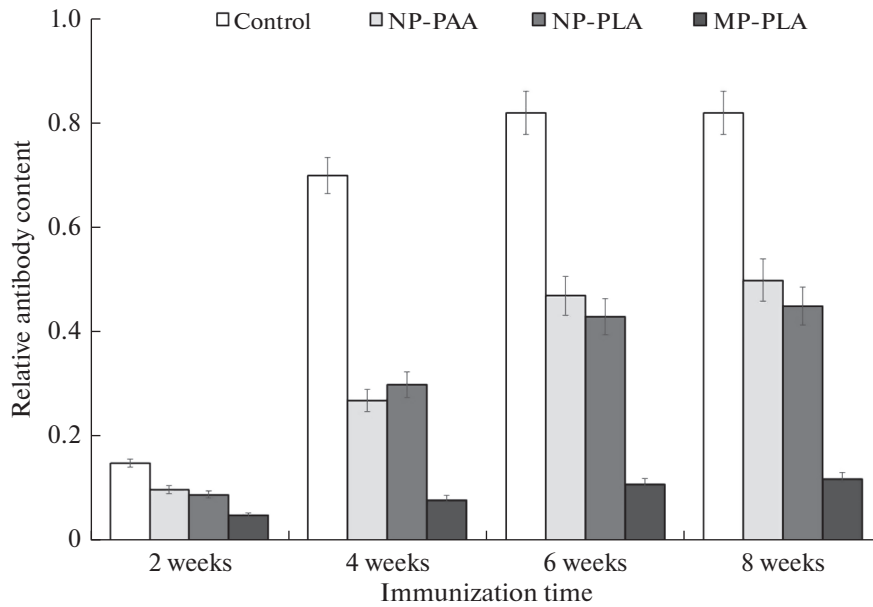


Рис. 2. Оценка относительного содержания специфических антител после введения контрольного и комплексных антигенов в четырех иммунизациях. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами. Обозначения: ■ – контроль; ● – НЧ-ПАК; + – НЧ-ПМК; ▲ – МЧ-ПМК.

тировать его Т-лимфоцитам-хелперам, распознающим своими Т-клеточными рецепторами этот же антиген. По этому же механизму образуются специфические антитела в случае иммунизации мышей конъюгатами белка с НЧ разных составов, однако количество таких антител было значимо ниже ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой. В случае иммунизации мышей конъюгатом МЧ с модельным белком требуется дополнительный этап деградации макрофагами или дендритными клетками, который способствует активации клеточного иммунного ответа. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что наиболее сильный гуморальный иммунный ответ будет образовываться на мономер белка $\beta 2$ -микроглобулина человека, а крупные фибриллярные структуры белка $\beta 2$ -микроглобулина человека способны поглощаться клетками иммунной системы человека.

Выявленное в данной работе влияние размера полимерных частиц, содержащих на поверхности конъюгированный белок, согласуется с опубликованными ранее данными для частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПМГК), несущих совместно инкапсулированный овальбумин и олигонуклеотид [23]. В частности, авторами было показано, что использование в качестве носителей НЧ диаметром 300 нм приводило к большему антигенспецифическому иммунному ответу у мышей по сравнению с частицами той же природы, но размером 1, 7 и 17 мкм. В указанной работе авторы отмечают, что чем меньше частицы ПМГК, используемые для доставки антигена, тем сильнее антигенспецифический Т-клеточный ответ. Схожая тенденция для овальбумина, конъюгированного на поверхности полистирольных частиц диаметром от 40 нм до 2 мкм, была показана в работе [24]. В данном случае, наибольший уровень антител детектировался для комплексного антигена на основе НЧ диаметром 40 нм, а наименьший на основе МЧ диаметром 2 мкм. Таким образом, независимо от природы полимера, влияние размера полимерной частицы имеет схожую тенденцию на иммуногенность комплексного антигена. В нашем случае схожий результат для НЧ на основе полиаминокислоты и поли(молочной кислоты) подтверждает данный вывод. В отличие от частиц на основе поли(молочной кислоты) и ее сополимеров, а также полистирольных частиц и липосом, в литературе практически отсутствуют данные о влиянии частиц на основе полиаминокислот на иммуногенность связанных с ними белков [7].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Локального этического комитета Института экспериментальной медицины.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20104).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.С.П., В.А.К.-В., Е.Г.К.-В., М.М.Ш.), экспериментальная работа (Р.Г.С., Д.С.П., Е.С.С. и В.А.К.-В.), сбор данных (Р.Г.С., Д.С.П., В.А.К.-В.), обработка данных (Р.Г.С., Д.С.П., Е.Г.К.-В.), написание и редактирование манускрипта (Р.Г.С., Е.Г.К.-В. и М.М.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rawal S, Patel MM* (2019) Threatening cancer with nanoparticle aided combination oncotherapy. *J Control Release* 301: 76–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.015>
2. *Kumar B, Jalodia K, Kumar P, Gautam HK* (2017) Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* 41: 260–268.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.019>
3. *Polyakov D, Sinitsyna E, Grudinina N, Antipchik M, Sakhabeev R, Korzhikov-Vlakh V, Shavlovsky M, Korzhikova-Vlakh E, Tennikova T* (2021) Polymer Particles Bearing Recombinant LEL CD81 as Trapping Systems for Hepatitis C Virus. *Pharmaceutics* 13: 672.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050672>
4. *Pati R, Shevtsov M, Sonawane A* (2018) Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. *Front Immunol* 9: 02224.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02224>
5. *Tewabe A, Abate A, Tamrie M, Seyfu A, Abdela Siraj E* (2021) Targeted Drug Delivery — From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. *J Multidiscip Health* 14: 1711–1724.
<https://doi.org/10.2147/JMDH.S313968>
6. *Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z* (2010) Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines* 9: 1095–1107.
<https://doi.org/10.1586/erv.10.89>
7. *Ben-Akiva E, Est Witte S, Meyer RA, Rhodes KR, Green JJ* (2019) Polymeric micro- and nanoparticles for immune modulation. *Biomater Sci* 7: 14–30.
<https://doi.org/10.1039/C8BM01285G>
8. *Marin E, Briceno ML, Caballero-George C* (2013) Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *Int J Nanomedicine* 8: 3071–3091.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S47186>
9. *Elmowafy EM, Tiboni M, Soliman ME* (2019) Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *J Pharm Invest* 494 (49): 347–380.
<https://doi.org/10.1007/S40005-019-00439-X>
10. *Iudin D, Zashikhina N, Demyanova E, Korzhikov-Vlakh V, Shcherbakova E, Boroznjak R, Tarasenko I, Zakharova N, Lavrentieva A, Skorik Y, Korzhikova-Vlakh E* (2020) Polypeptide self-assembled nanoparticles as delivery systems for polymyxins B and E. *Pharmaceutics* 12: 868.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090868>
11. *Boddu SHS, Bhagav P, Karla PK, Jacob S, Adatiya MD, Dhameliya TM, Ranch KM, Tiwari AK* (2021) Polyamide/Poly(Amino Acid) Polymers for Drug Delivery. *J Funct Biomater* 12: 58.
<https://doi.org/10.3390/jfb12040058>
12. *Richard A, Margaritis A* (2001) Poly(Glutamic Acid) for Biomedical Applications. *Crit Rev Biotechnol* 21: 219–232.
<https://doi.org/10.1080/07388550108984171>
13. *Zhang Y, Song W, Lu Y, Xu Y, Wang C, Yu DG, Kim I* (2022) Recent Advances in Poly(α -L-glutamic acid)-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Biomolecules* 12: 636.
<https://doi.org/10.3390/biom12050636>
14. *Singer JW* (2005) Paclitaxel poliglumex (XYOTAXTM, CT-2103): A macromolecular taxane. *J Control Release* 109: 120–126.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.033>
15. *Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP* (2006) Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27: 4356–4373.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>
16. *He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C* (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31: 3657–3666.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>
17. *Solovyov KV, Polyakov DS, Grudinina NA, Egorov VV, Morozova IV, Aleynikova TD, Shavlovsky MM* (2011) Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins ttr-sfgfp and β 2M-sfGFP. *Prep Biochem Biotechnol* 41: 337–349.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2010.548433>
18. *Zashikhina N, Sharoyko V, Antipchik M, Tarasenko I, Anufrikov Y, Lavrentieva A, Tennikova T, Korzhikova-Vlakh E* (2019) Novel Formulations of C-Peptide with Long-Acting Therapeutic Potential for Treatment of Diabetic Complications. *Pharmaceutics* 11: 27.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010027>
19. *Sinitsyna E, Bagaeva I, Gandalipov E, Fedotova E, Korzhikov-Vlakh V, Tennikova T, Korzhikova-Vlakh E* (2022) Nanomedicines Bearing an Alkylating Cytostatic Drug from the Group of 1,3,5-Triazine Derivatives: Development and Characterization. *Pharmaceutics* 14: 2506.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112506>

20. Korzhikov V, Averianov I, Litvinchuk E, Tennikova TB (2016) Polyester-based microparticles of different hydrophobicity: the patterns of lipophilic drug entrapment and release. *J Microencapsul* 33: 199–208.
<https://doi.org/10.3109/02652048.2016.1144818>
21. Korzhikov-Vlakh V, Averianov I, Sinitsyna E, Nashchekina Y, Polyakov D, Guryanov I, Lavrentieva A, Raddatz L, Korzhikova-Vlakh E, Scheper T, Tennikova T (2018) Novel Pathway for Efficient Covalent Modification of Polyester Materials of Different Design to Prepare Biomimetic Surfaces. *Polymers* 10: 1299.
<https://doi.org/10.3390/polym10121299>
22. Polyakov DS, Antimonova OI, Sakhabeev RG, Grudinina NA, Khodova AE, Sinitsyna ES, Korzhikov-Vlakh VA, Tennikova TB, Shavlovsky M (2017) Poly(lactic acid) nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. *Russ J Infect Immun* 7: 123–129.
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-123-129>
23. Joshi VB, Geary SM, Salem AK (2013) Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J* 15: 85–94.
<https://doi.org/10.1208/s12248-012-9418-6>
24. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IFC, Plebanski M (2004) Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J Immunol* 173: 3148–3154.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3148>

Immune Response to the Introduction of Fibrillogenic β 2-Microglobulin Protein Conjugated with Different Types of Polymer Particles

R. G. Sakhabeev^{a, b, *}, D. S. Polyakov^b, E. S. Sinitsyna^c, E. G. Korzhikova-Vlakh^c,
V. A. Korzhikov-Vlakh^{c, d}, and M. M. Shavlovsky^b

^aSt. Petersburg Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia

^bInstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

^cInstitute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^dSaint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: helm505@mail.ru

The effect of the composition and size of polymeric particles on the immunogenicity of the fibrillogenic β 2-microglobulin protein immobilized on their surface was studied. For this purpose, nanoparticles (NP) based on a copolymer of L-glutamic acid and L-phenylalanine (P(Glu-co-Phe)) and a block copolymer of poly(ethylene glycol) with poly(lactic acid) (PEG-*b*-PLA) as well as microparticles (MP) based on poly(lactic acid) (PLA) were selected. α -L-amino acid copolymer-based nanoparticles were prepared by gradient phase inversion, and PEG-*b*-PLA-based nanoparticles by nanoprecipitation. Double emulsion method was used to form polymeric microparticles based on PLA. Recombinant chimeric model protein beta-2-microglobulin-green fluorescent protein (β 2M-sfGFP) was used to covalently modify all types of polymeric particles followed by immunization of four groups of laboratory animals equal in number. An enzyme immunoassay method was used to evaluate the humoral immune response. In three experimental groups, mice were immunized using poly(amino acid)-based nanoparticles (NP-PAA) and PEG-*b*-PLA (NP-PLA) as well as PLA microparticles containing immobilized β 2M-sfGFP on the surface. The control group was immunized using a physical mixture of PEG-*b*-PLA nanoparticles and free β 2M-sfGFP. The highest level of antibodies to sfGFP in blood serum was found when mice were immunized with a mixture of protein and nanoparticles. When mice were immunized with β 2M-sfGFP-modified nanoparticles, the amount of antibodies to sfGFP was statistically significantly lower ($p < 0.001$) compared to the control group. However, the groups immunized with nanoparticles of similar size but different composition conjugated to the model proteins did not differ significantly among themselves. It was also found that the size of the particles affects the immunogenicity of the associated protein. A similar pattern of relative antibody content in the sera of mice was maintained at all steps of immunization.

Keywords: immunization, immune response, protein antigen, polymeric micro- and nanoparticles, complex antigens