

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ПОМОЩЬЮ КАПСУЛИРОВАННЫХ АЛЛЕРГЕНОВ

Е.В. Свирщевская

Е.И. Каширина¹, Д.Б. Чудаков¹, А.С. Долгова², С.В. Хлгатян³

¹ ФГБУН институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва

² ФБУН ЦНИИ Институт эпидемиологии Роспотребнадзора 3ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

esvir@ya.ru

SPECIFIC IMMUNOTHERAPY USING ENCAPSULATED ALLERGENS

E.V.Svirshchevskaya, E.I.Kashirina¹, D.B. Chudakov¹, A.S. Dolgova², S.V. Khlgatian³

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

² Institute of epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow

³ Mechnikov's Institute of vaccine and sera, Moscow

Аллергия I типа характеризуется формированием антител E класса к безвредным объектам, попадающим в организм из окружающей среды, таким как пыльца деревьев и трав, фрагменты бытовых микроорганизмов, яд насекомых и т. д. Единственным методом патогенетического лечения аллергии вот уже более 100 лет остается специфическая иммунотерапия (СИТ), состоящая из длительного курсового введения малых доз экстрактов аллергенов [1]. Введение низких доз аллергенов связано с развитием опосредованной IgE реакции, которая может достигать уровня анафилактического шока. Поэтому основной целью при разработке новых лекарственных средств для СИТ является поиск возможности предотвращения перекрестного связывания вакцин с IgE-антителами во избежание риска развития побочных реакций.

Уменьшить риск и повысить эффективность СИТ позволяет изменение поверхностной структуры аллергенов, которое может быть достигнуто различными способами: обработка экстрактов аллергенов глутаровым альдегидом, использование мутантных форм аллергенов, связывание аллергенов с другими полимерами и др. [2-4]. Такие препараты, теряющие способность взаимодействовать с IgE-антителами, значительно более безопасны и могут использоваться в дозах, многократно превышающих дозы для стандартных экстрактов аллергенов.

На сегодняшний день ведутся интенсивные исследования по созданию вакцин на основе различного типа полимерных матриц, в том числе на основе хитозана [5-6]. Хитозан – природный биосовместимый и биоразлагаемый полимер, обладающий адъювантной активностью. Работы по капсулированию аллергенов из клещей домашней пыли (КДП) в наночастицы на основе хитозана активно ведутся китайской группой Liu Z. с соавторами [7-9]. Авторы исследовали эффект

пептида Der f 2 47-67 [7] или экстракта аллергена [8-9] в составе наночастиц, вводимых мышам разными путями [7-9]. Во всех случаях был выявлен терапевтический эффект в мышинной модели аллергии на КДП. **Целью** настоящей работы являлось получение и характеристика наночастиц (НЧ) на основе гидрофобного хитозана, конъюгированного со смесью рекомбинантных белков коровьего молока Bos d4, 5, 6, 8. Для более полного экранирования аллергенов частицы дополнительно были покрыты сукцинилхитозаном по типу конструкции «ядро-оболочка». Предполагается, что такая конструкция обеспечит высокую эффективность вакцинации, ускорит терапевтический эффект и позволит исключить возникновение осложнений при проведении иммунотерапии.

Методы. Рекомбинантные белки коровьего молока были получены в E. coli, очищены на Ni-агарозе и охарактеризованы с помощью гель-электрофореза. Ядра НЧ размером 80-90 нм были получены карбодимидным методом при смешивании активированного гексаноилхитозана 40 кДа с аллергенами в результате самосборки (дзета-потенциал + 8mV), после чего ядра дополнительно покрывались сукцинилхитозаном, добавляемом по каплям при постоянном перемешивании. Полученные конечные НЧ имели диаметр 120-180 нм, что определяли методом динамического светорассеяния, и были заряжены отрицательно (от -8 до -13mV). Анализ связывания капсулированных белков с сыворотками больных с аллергией на коровье молоко проводили методом ИФА. Сыворотки крови предоставлены ФГБНУ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова с письменного согласия больных. Исследования проводили по утвержденному протоколу №19 от 14.01.2019.

Для анализа способности индуцировать гуморальные реакции мышей иммунизировали подкожно 3 раза свободными аллергенами, ядрами и конечными НЧ.

Концентрацию аллергенов в НЧ оценивали с помощью введения флуоресцентных белков. Индуцируемый ответ исследовали в динамике с помощью ИФА.

Результаты. Методом ИФА отбирали сыворотки, имеющие IgE антитела к рекомбинантным белкам (N=12). В качестве контроля использовали сыворотки здоровых доноров (n=10). Показали, что включение белков в НЧ без оболочки снижало эффективность распознавания аллергена IgE антителами в сыворотках больных на ~60%. Дополнительная оболочка из сукцинилхитозана полностью экранировала аллерген от контакта с IgE антителами из сывороток больных. Соответственно, можно сделать вывод, что капсуляция аллергенов в полимерную оболочку препятствует связыванию с IgE антителами и, как следствие, не будет вызывать дегрануляции тучных клеток.

Упаковка аллергенов в полимерную оболочку теоретически не обязательно должна быть в виде НЧ. Однако для того, чтобы полученные препараты были иммуногенными и безопасными, требуется их эффективный и полный фагоцитоз макрофагами. Известно, что макрофаги лучше всего фагоцитируют микроорганизмы, с которыми они эволюционно наиболее часто встречались, такие как бактерии и вирусы, имеющие наноразмеры. Удобный размер (100-200 нм) обеспечивает быстрый и полный фагоцитоз наночастиц, что необходимо как для проявления иммуногенности, так и для безопасности препаратов. Для анализа процесса фагоцитоза использовали НЧ, полученные аналогичным методом с меченым родамином белком Bos 6. Инкубация наночастиц с макрофагами мыши линии J774 в течение 1 ч приводила к значительному фагоцитозу, который практически завершался через 3 ч, что было показано методом конфокальной микроскопии. При этом частицы поступали в эндосомально-лизосомальный путь внутриклеточного процессинга, что необходимо для эффективной презентации антигена Т-клеткам. Через 12 ч. инкубации лишь малая часть наночастиц оставалась в эндосомах; основная часть меченых белков локализовалась к этому времени в лизосомах. Полученные данные показали, что капсуляция аллергенов приводит к снижению или отмене распознавания нативных белков IgE антителами, но не влияет (возможно, даже усиливает) на фагоцитоз наночастиц макрофагами.

Для анализа индукции гуморального ответа капсулированными аллергенами мышей иммунизировали подкожно НЧ. Анализ продукции IgG антител показал, что после 2-3 иммунизаций титры IgG достигали 10-30 тыс; доминировали IgG1 антитела. При иммунизации смесью белков наблюдали доминирование: титры IgG1 падали в ряду Bos d8 > Bos d6 > Bos d4 > Bos d5 (30, 6, 4, 1 тыс соответственно).

Таким образом, на основе производных природного полисахарида хитозана получены наночастицы типа «ядро-оболочка», позволяющие полностью экранировать от распознавания специфичными IgE антителами содержащиеся в них рекомбинантные белки-аллергены. Такие конструкции в дальнейшем могут быть использованы для разработки безопасных препаратов для СИТ аллергии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Jacobsen L, Wahn U, Bilo BM. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorised by level of benefit -the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012. V. 2. № 1. P. 8.
2. Yang L, Hirose S, Suzuki K, Hiroi T, Takaiwa F. Expression of hypoallergenic Der f 2 derivatives with altered intramolecular disulphide bonds induces the formation of novel ER-derived protein bodies in transgenic rice seeds. *J Exp Bot*. 2012. V. 63. № 8. P. 2947.
3. Bonura A, Passantino R, Costa MA, Montana G, Melis M, Bondi ML, Butteroni C, Barletta B, Corinti S, Di Felice G, Colombo P. Characterization of a Par j 1/Par j 2 mutant hybrid with reduced allergenicity for immunotherapy of Parietaria allergy. *Clin Exp Allergy*. 2012. V. 42. № 3. P. 471.
4. Heydenreich B, Bellinghausen I, Lorenz S, Henmar H, Strand D, Würtzen PA, Saloga J. Reduced in vitro T cell responses induced by glutaraldehyde modified allergen extracts are caused mainly by retarded internalization of dendritic cells. *Immunology*. 2012. V. 136. № 2. P. 208.
5. Arca HC, Günbeyaz M, Senel S. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines*. 2009. V. 8. № 7. P. 937.
6. Jabbal-Gill I, Watts P, Smith A. Chitosan-based delivery systems for mucosal vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012. V. 9. № 9. P. 1051.
7. Li J, Liu Z, Wu Y, Wu H, Ran P. Chitosan microparticles loaded with mite group 2 allergen Der f 2 alleviate asthma in mice. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008. V. 18. № 6. P. 454.
8. Liu Z, Guo H, Wu Y, Yu H, Yang H, Li J. Local nasal immunotherapy: efficacy of Dermatophagoides farinae-chitosan vaccine in murine asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009. V. 150. № 3. P. 221.
9. Yu HQ, Liu ZG, Guo H, Zhou YP. [Therapeutic effect on murine asthma with sublingual use of Dermatophagoides farinae/chitosan nanoparticle vaccine]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2011. V. 29. № 1. P. 4.