

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА АНТИГЕН, ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ НА НАНОЧАСТИЦАХ ИЗ СОПОЛИМЕРА ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

Р.Г. Сахабеев¹, Д.С. Поляков¹, кандидат медицинских наук, Н.А. Грудинина¹, кандидат биологических наук, А.А. Вишня², А.А. Козловская³, Е.С. Синицына^{4,5}, кандидат химических наук, В.А. Коржиков-Влах⁴, кандидат химических наук, доцент, Т.Б. Тенникова⁴, доктор химических наук, профессор, М.М. Шавловский^{1,6}, доктор медицинских наук, профессор

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»),

Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;

²ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»,

Российская Федерация, 191186, Санкт-Петербург, Набережная реки Мойки, д. 48;

³ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»,

Российская Федерация, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29;

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»,

Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная 7–9;

⁵ФГБУН «Институт высокомолекулярных соединений» РАН,

Российская Федерация, 199004, Санкт-Петербург, В.О., Большой пр. 31;

⁶Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»,

Российская Федерация, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

E-mail: helm505@mail.ru

Введение. Полимерные нано- и микрочастицы являются перспективным материалом для адресной доставки лекарственных веществ в органы и ткани человека. При этом не изучено влияние данных частиц на гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Цель исследования. Изучение иммуногенности белка, связанного с полимерными биодegradабельными наночастицами на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем.

Методы. Активированные наночастицы были использованы для ковалентного связывания модельного белка. Была осуществлена иммунизация 2 групп мышей: в опытной группе (n=40) животным вводили наночастицы из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля, которые были ковалентно связаны с модельным белком; в контрольной группе (n=40) мышей иммунизировали смесью того же белка и немодифицированных наночастиц. Проведены 4 иммунизации с интервалами 2 нед. Кровь у мышей брали через 13 дней после каждой иммунизации.

Результаты. По данным конфокальной микроскопии, модельный белок $\beta 2M$ -sfGFP прочно сорбируется на поверхности наночастиц. Показано, что количество иммобилизованного белка составило 10 мкг на 1 мг наночастиц. Методом иммуноферментного анализа определено содержание специфических антител к модельному антигену в сыворотках мышей.

Заключение. С помощью непараметрического статистического критерия Манна–Уитни показано, что на каждом этапе иммунизации содержание антител в контрольной группе достоверно выше, чем в опытной (p<0,001).

Ключевые слова: наночастицы из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля, гуморальный иммунный ответ, зеленый флюоресцентный белок

THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO THE ANTIGEN IMMOBILIZED ON NANOPARTICLES OF COPOLYMER OF POLYLACTIC ACID AND POLYETHYLENE GLYCOL

R.G. Sakhabeev¹, D.S. Polyakov¹, N.A. Grudinina¹, A.A. Vishnya², A.A. Kozlovskaya³, E.S. Sinitsyna^{4,5}, V.A. Korzhikov-Vlakh⁴, T.B. Tennikova⁴, M.M. Shavlovsky^{1,6}

¹Institute of Experimental Medicine, Akademika Pavlova Street, 12, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

²Herzen State Pedagogical University of Russia, Embankment of the Moika River, 48, St. Petersburg, 191186, Russian Federation;

³Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytechnicheskaya, 29, St. Petersburg, 195251, Russian Federation;

⁴St. Petersburg State University, University Embankment 7–9, St. Petersburg, 199034, Russian Federation;

⁵Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Bolshoy pr., 3, St. Petersburg, 119004, Russian Federation;

⁶I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Kirochnaya street, 41, St. Petersburg, 191015, Russian Federation

E-mail: helm505@mail.ru

Introduction. Currently, polymer nano- and microparticles are a promising material for the targeted delivery of drugs to human organs and tissues. The influence of these particles on humoral and cellular immune responses has not been studied.

The aim of the study. The aim of the work was to study the immunogenicity of the protein associated with polymer biodegradable nanoparticles based on polylactic acid copolymer with polyethylene glycol.

Methods. Activated nanoparticles were used for covalent binding of the model protein. Two groups of 40 mice were immunized. Nanoparticles from the copolymer of polylactic acid and polyethylene glycol, which were covalently bound to the model protein, were introduced to the experiment group. The control group was immunized with a mixture of the same protein and unmodified nanoparticles. 4 immunizations were carried out at intervals of 2 weeks. Blood sampling of mice was carried out 13 days after each immunization. The content of specific antibodies to the model antigen in the serum of mice was determined by the ELISA method.

Results. According to confocal microscopy, the model protein $\beta 2M$ -sfGFP was strongly adsorbed on the surface of nanoparticles. The amount of immobilized protein was shown to amount of $10 \mu\text{g}$ per 1 mg of nanoparticles.

Conclusion. Using the non-parametric statistical Mann-Whitney test, it was shown that at each stage of immunization the content of antibodies in the control group was significantly higher than in the experiment group ($p < 0,001$).

Key words: particles of a copolymer of polylactic acid and polyethylene glycol, humoral immune response, green fluorescent protein

ВВЕДЕНИЕ

Отличительной особенностью многих инфекций, главным образом вирусной этиологии, является их видо- и тканеспецифичность. Вирус способен атаковать только клетки определенных видов организмов-хозяев, а также поражать только некоторые ткани. Такая особенность вирусов объясняется тем, что они несут на своей поверхности лиганды, которые специфично взаимодействуют с рецепторами клеток хозяина и обеспечивают проникновение вирусов в клетки.

Так, для вируса гепатита С (ВГС) было доказано, что первым этапом его внедрения в клетку является взаимодействие белка оболочки вируса E2 с большой экстраклеточной петлей клеточного рецептора CD81 [1]. Вирус иммунодефицита человека проникает в клетку посредством связывания белка оболочки gp120 с клеточным рецептором CD4 [2]. Вирус Эпштейна–Барр взаимодействует с рецептором CD21 В-лимфоцитов при помощи мембранного гликопротеида gp350/220. В первую очередь вирусом инфицируются В-лимфоциты, которые обладают высоким уровнем экспрессии CD21 [3]. 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 [4]. Вирус лихорадки Западного Нила связывается с клеточным рецептором $\alpha\beta 3$ интегрином при помощи III домена белка оболочки E [5]. Также в пример можно привести вирус бешенства, который аналогичным образом взаимодействует с клеточным белком DYNLL1 посредством белка P [6].

Таким образом, внедрение вируса осуществляется чаще именно за счет комплементарности вирусных лигандов и рецепторов клетки. Нами предполагается создать наночастицы из биологически совместимых полимеров, на поверхности которых содержатся клеточные рецепторы, способные взаимодействовать с белками оболочки вирусов. Такая система может являться инструментом для извлечения вирусных наночастиц, например, из кровотока. В качестве полимерного носителя может служить сополимер из полимолочной кислоты и политэтиленгликоля, наночастицы из ко-

торого претерпевают ферментативную деструкцию без образования токсичных продуктов [7]. Однако к настоящему времени недостаточно изучен иммунный ответ организма на такой тип наночастиц. Важно определить, как именно наночастицы, связанные с вирусным антигеном, будут влиять на иммуногенность данного антигена. Исходя из этого, на первом этапе изучения свойств наночастиц с иммобилизованными рецепторами необходимо выяснить, насколько эффективно модифицированные наночастицы на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем способны влиять на выработку специфических антител против белка, связанного с этими наночастицами. Для этого в настоящей работе использована модельная система, представляющая собой наночастицы с иммобилизованным белком слияния $\beta 2$ -микроглобулином человека – GFP ($\beta 2M$ -sfGFP) [8].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Синтез, выделение и очистка рекомбинантного модельного слитого белка $\beta 2$ -микроглобулина человека с зеленым флюоресцентным белком

Белок $\beta 2M$ -sfGFP получали из клеток *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой, содержащей ген слитого белка $\beta 2$ -микроглобулина человека с зеленым флюоресцентным белком [8]. Для измерения концентрации полученного белка использовали спектрофотометр Thermo Scientific NanoDrop 2000. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм. Коэффициент молярной экстинкции был равен $39,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Получение наночастиц на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем

По данным гелепроникающей хроматографии, среднечисловая молекулярная масса образцов сополимера поли-(D,L-молочной кислоты) с полиэтиленгликолем (ПЭГ-5000) составила 96 000 Да, среднемассовая молекулярная масса образца полимера – 133 000 Да, а индексы полидисперсности – 1,4. Анализ был выполнен на установке Shimadzu LC-20 Prominence с рефрактометрическим детектором RID 10-A (Япония). Калибровка получена с использованием полистирольных стандартов. Формирование полимерных наночастиц

на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем (ПМК-ПЭГ) осуществляли методом наноосаждения. Концентрация сополимера в органической фазе составляла 5 мг/мл. Органическую фазу, состоящую из 100 мг сополимера ПМК-ПЭГ-5000 и 20 мл ацетонитрила, вводили со скоростью 2 мл/мин в 100 мл воды при перемешивании 1000 об/мин. Соотношение органической фазы и водной составляло $1/5$. Для удаления органического растворителя систему оставляли перемешиваться на 24 ч при 25°C. Затем отбирали часть наночастиц для определения выхода и анализа их размера. Выход полимерных наночастиц составил 93%. Средний размер наночастиц и индекс полидисперсности оценивали методом динамического рассеивания света. Были получены полимерные наночастицы диаметром 96 нм и индексом полидисперсности 0,087. Наночастицы хранили при температуре 4°C.

Связывание белка β 2M-sfGFP с наночастицами на основе ПМК-ПЭГ

Ковалентное связывание белка слияния β 2M-sfGFP с поверхностью наночастиц на основе блок-сополимера ПМК-ПЭГ-5000 осуществляли в 2 этапа. На 1-м гидролизировали сложноэфирные связи полимолочной кислоты гидроксидом натрия, а именно 80 мг частиц с концентрацией 1,0 мг/мл переводили в раствор 0,01 М NaOH и перемешивали 15 мин. Затем методом диализа осуществляли очистку от непрореагировавших низкомолекулярных соединений в течение 90 мин. Инкубировали наночастицы в 0,05 М растворе 2-(N-морфолин)-этансульфоновой кислоты с pH 5,4 в течение 15 мин. Далее активировали карбоксильные группы добавлением 1,0 мл N-гидроксисукцинимиды в течение 10 мин при перемешивании и 0,5 мл (N-3-диметиламинопропил)N-этилкарбодиимида гидрохлорида (концентрация каждого вещества была равна 1 мг/мл). Образец перемешивали 30 мин в ледяной бане. Затем проводили диализ дистиллированной водой в течение 60 мин. На 2-м этапе осуществляли реакцию иммобилизации белка в течение 1 ч при перемешивании. К наночастицам в боратном буфере с pH 8,4 был добавлен модельный белок β 2M-sfGFP с концентрацией 1 мг/мл в объеме 0,8 мл. После завершения реакции связывания наночастицы помещали в концентраты Vivaspin-20 100 кДа (Sartorius, Германия). Для очистки наночастиц от не связавшегося с ними белка проводили центрифугирование при 3000 г в течение 5 мин. После концентрирования образца наночастицы переводили в 0,01 М натрий-фосфатный буфер с pH 7,0. Показано, что количество иммобилизованного белка составило 10 мкг на 1 мг наночастиц. Наночастицы хранили при температуре 4°C.

Исследование полученного конъюгата наночастиц и рекомбинантного модельного белка β 2M-sfGFP с помощью конфокальной микроскопии

Конфокальные изображения получали с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510

Meta (Zeiss, Германия), с иммерсионным объективом C-Apochromat 40x/1.2 W Corr UV-VIS-IR M27. Флюоресценцию β 2M-sfGFP детектировали с использованием оптического фильтра 505 нм при возбуждении флюоресценции лазером с длиной волны 488 нм. В проходящем свете изображения получали с помощью метода дифференциально-интерференционного контраста. Обработку изображений осуществляли с использованием прилагаемого к микроскопу программного обеспечения LSM 510.

Иммунизация и получение сыворотки крови мышей

В работе были использованы самки-гибриды F1 (CBAxС57BL) 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 наночастиц для одной иммунизации во всех опытах составляло 0,1 мг на 1 мыш, количество β 2M-sfGFP – 1 мкг на 1 мыш. Препараты вводили в объеме 0,4 мл на 1 животное. Вся работа выполнялась в соответствии с международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных.

Изучение полученных сывороток и обработка данных

Анализ содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках иммунизированных мышей осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу иммуноферментного анализа (ИФА) [9]. В лунки 96-луночного планшета вносили раствор глутарового альдегида. Инкубировали 1 ч. Затем в лунки вносили по 100 мкл раствора sfGFP. Спустя 1 ч вносили раствор обезжиренного молока с добавлением 0,5% Tween 20. Далее в лунки планшета вносили сыворотки мышей, через 1 ч – специфические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, спустя еще 1 ч – проявитель и измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера. Анализ данных проводили в программе Rstudio 1.1.453.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы был выделен и очищен модельный белок β 2M-sfGFP. Использование именно этого белка слияния обусловлено тем, что он имеет в составе sfGFP, который легко детектируется; его свойства изучены ранее, в том числе нами [9, 10]. Однако несмотря на преимущества, оказалось, что sfGFP с весьма низкой эффективностью связывается с полимерными частицами из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля. Для увеличения количества связанного с наночастицами белка были проведены эксперименты по иммобилизации 2 белков слияния: β 2M-sfGFP и белка слияния транстиретина человека – GFP (TTR-sfGFP), полученных нами ранее [11–13]. При сравнении эффективности связывания этих 2 белков с наночастицами было

установлено, что на 1 мг наночастиц количество связавшегося $\beta 2\text{M-sfGFP}$ было выше, чем для TTR-sfGFP. Кроме того, наночастицы после связывания с TTR-sfGFP агрегируют (данные не опубликованы).

Для дальнейшей работы использованы полученные конъюгаты наночастиц и $\beta 2\text{M-sfGFP}$. Было установлено, что связывающая способность $\beta 2\text{M-sfGFP}$ к наночастицам составляла 10 мкг белка на 1 мг наночастиц.

Для подтверждения связывания наночастиц с $\beta 2\text{M-sfGFP}$ была использована лазерная сканирующая микроскопия (рис. 1). На рис. 1, а представлен конъюгат наночастиц с $\beta 2\text{M-sfGFP}$, обладающий флюоресценцией, характерной для sfGFP, что свидетельствует об успешном связывании модельного белка с наночастицами. Также нужно отметить, что $\beta 2\text{M-sfGFP}$ не теряет способности к флюоресценции при связывании с наночастицами. В то же время наночастицы, не имеющие на своей поверхности модельного белка, флюоресценцией не обладают (рис. 1, з).

Для изучения влияния наночастиц на иммунгенность модельного белка были проиммунизированы 2 равные по численности группы мышей (см. таблицу). Первая группа была проиммунизирована смесью наночастиц и $\beta 2\text{M-sfGFP}$, вторая – конъюгатом наночастиц с $\beta 2\text{M-sfGFP}$, таким образом, что количество вводимых наночастиц и $\beta 2\text{M-sfGFP}$ было идентичным. Для оценки динамики образования антител было проведено 4 иммунизации с интервалами по 2 нед. Забор крови мышей осуществлялся из щечной вены через 13 дней после каждой иммунизации.

Для оценки содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках 2 групп мышей был использован иммуноферментный анализ. С помощью критерия Шапиро–Уилка установлено, что в каждой группе при каждой иммунизации распределение не было нормальным ($p < 0,001$). Поэтому для попарного сравнения 2 групп внутри каждой иммунизации использовали непараметрический статистический критерий Манна–Уитни. В результате статистической обработки полученных данных показано, что при каждой иммунизации сравниваемые группы достоверно различались ($p < 0,001$).

Количество специфических антител к sfGFP в сыворотке крови было выше в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных наночастиц (контроль) на протяжении всего периода иммунизаций (рис. 2). При иммунизации конъюгатом наночастиц и $\beta 2\text{M-sfGFP}$ (опытная группа) количество антител к sfGFP было достоверно ниже.

Полученные результаты можно объяснить тем, что макрофаги захватывают наночастицы в брюшной полости, а затем элиминируют их; это приводит к деградации белка, связанного с наночастицами. Таким обра-

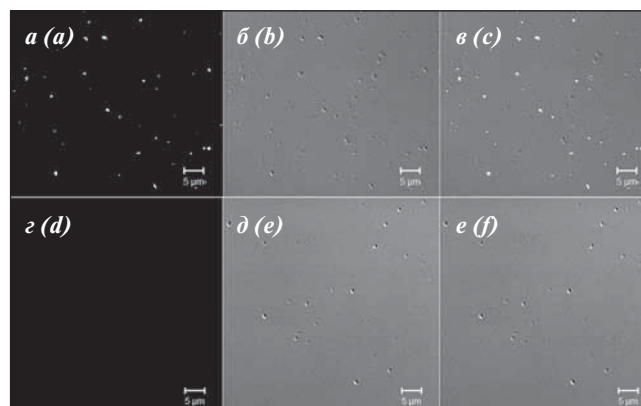


Рис. 1. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии наночастиц на основе сополимера полимолочной кислоты с полиэтиленгликолем: а, з – флюоресценция при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм; б, д – дифференциально-интерференционный контраст; в, е – совмещенное изображение (соответственно а, б; з, д)
Fig. 1. Results of confocal laser scanning microscopy of nanoparticles based on a copolymer of poly(lactic) acid with polyethylene glycol: а, d – fluorescence excited by a laser with a wavelength of 488 nm, б, е – differential-interference contrast, с, f – combined image (а and б; d and е, respectively)

Состав антигена для иммунизаций
The composition of the antigen for immunizations

Группа	Состав частиц	Модификация	Свободный белок
1-я, контрольная	Сополимер ПМК-ПЭГ	Нет	$\beta 2\text{M-sfGFP}$
2-я, опытная	Сополимер ПМК-ПЭГ	Ковалентная связь с $\beta 2\text{M-sfGFP}$	Нет

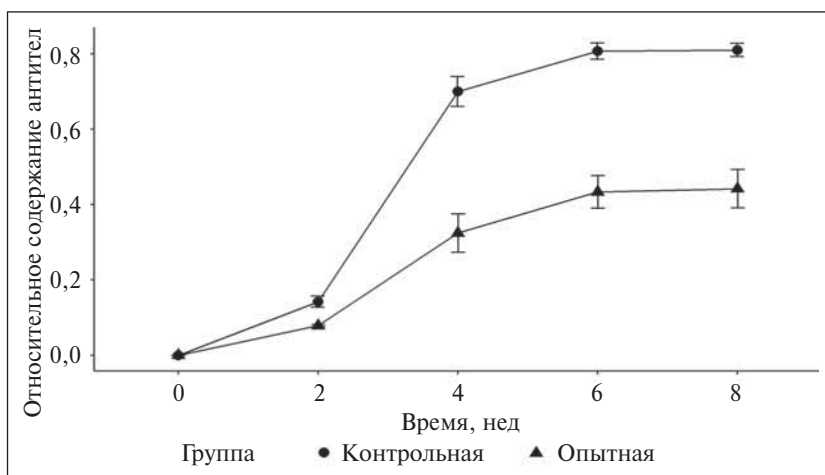


Рис. 2. Относительное содержание специфических антител против модельного белка в сыворотках крови иммунизированных мышей. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами
Fig. 2. The relative content of specific antibodies against the model protein in the sera of immunized mice. Data are presented as mean values with confidence intervals

зом, у мышей опытной группы содержание антигена в крови и лимфе понижается по сравнению с таковым в контрольной группе. Притекающая лимфа доставляет антиген в лимфатический узел, где, в том числе, происходит выработка специфических антител. Таким образом, в опытной группе поступление антигена в лимфатические узлы уменьшается, что ведет к более слабой выработке антител а лимфоцитах по сравнению с таковой в контрольной группе, иммунизированной свободным $\beta 2M$ -sfGFP. В то же время свободный $\beta 2M$ -sfGFP сразу высвобождается в кровоток и в лимфатическую систему, обеспечивая более эффективный гуморальный ответ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы был получен и очищен рекомбинантный $\beta 2M$ -sfGFP, в дальнейшем использованный

в качестве модельного антигена. Проведено связывание модельного белка $\beta 2M$ -sfGFP с полимерными наночастицами, определено соотношение наночастиц и белка в полученном конъюгате. Проведены иммунизация и взятие крови у 2 групп по 40 мышей. Методом ИФА определено содержание специфических антител к модельному антигену в сыворотках крови мышей. Показано, что $\beta 2M$ -sfGFP, не связанный ковалентной связью с наночастицами (контроль), вызывал более выраженный гуморальный иммунный ответ, чем его конъюгат с наночастицами (опытная группа).

* * *

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фараонова Т.Е., Оленина Л.В., Колесанова Е.Ф. Возможные клеточные рецепторы вируса гепатита С. Биомедицинская химия. 2008; 54 (2): 154–66. (Faraonova T.E., Olenina L.V., Kolesanova E.F. Vozmozhnye kletochnye receptory virusa gepatita S. Biomeditsinskaja himija. 2008; 54 (2): 154–66 (in Russian))
2. Myszka D. G., Sweet R. W., Hensley P., Brigham-Burke M., Kwong P. D., Hendrickson W. A., Doyle M. L. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000; 97 (16): 9026–31.
3. Гурцевич В.Э., Демина Е.А., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В., Смирнова К.В., Душенькина Т.Е., Максимович Д.М., Парамонова У.В., Монин И.С., Лихтенштейн А.В. Вирус Эпштейна-Барр у больных классической лимфомой Ходжкина. Клиническая онкогематология. фундаментальные исследования и клиническая практика. 2018; 11 (2): 160–6. (Gurcevich V.Je., Demina E.A., Senjuta N.B., Botezatu I.V., Smirnova K.V., Dushen'kina T.E., Maksimovich D.M., Paramonova U.V., Monin I.S., Lihenshtejn A.V. Virus Jepshtejna-Barr u bol'nyh klassicheskoj limfomoj Hozhdkina. Klinicheskaja onkogematologija. fundamental'nye issledovanija i klinicheskaja praktika. 2018; 11 (2): 160–6 (in Russian))
4. Боровая Т.Г. К вопросу о роли клеточных рецепторов во взаимодействии с вирусами простого герпеса. Морфологические ведомости. 2013; 4: 116–28. (Borovaja T.G. K voprosu o roli kletochnyh receptorov vo vzaimodejstvii s virusami prostogo gerpesa. Morfolozicheskie vedomosti. 2013; 4: 116–28 (in Russian))
5. Богачек М.В., Зайцев Б.Н., Секацкий С.К., Протопопова Е.В., Терновой В.А., Иванова А.В., Качко А.В., Иванисенко В.А., Дитлер Г., Локтев В.Б. Характеристика S-концевой части гликопротеина Е вируса Западного Нила и оценка силы его взаимодействия с $\alpha V\beta 3$ интегрином как с предполагаемым клеточным рецептором Биохимия. 2010; 75 (4): 571–81. (Bogachek M.V., Zajcev B.N., Sekackij S.K., Protoporova E.V., Ternovoj V.A., Ivanova A.V., Kachko A.V., Ivanisenko V.A., Difter G., Loktev V.B. Harakteristika S-koncevoj chasti glikoproteina E virusa Zapadnogo Nila i ocenka sily ego vzaimodejstva s $\alpha V\beta 3$ integrinom kak s predpolagaemym kletochnym receptorom Биохимия. 2010; 75 (4): 571–81 (in Russian))
6. Ne Raux H.L., Flamand A., Blondel D. Interaction of the Rabies Virus P Protein with the LC8 Dynein Light Chain. J. of virology. 2000; 74 (21): 10212–6 <https://doi.org/10.1128/JVI.74.21.10212-10216.2000>
7. Calzoni E., Cesaretti A., Polchi A., Di Michele A., Tancini B., Emiliani C. Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. J. Funct Biomater. 2019; 10 (4) <https://doi.org/10.3390/jfb1010004>.
8. Solovjov K.V., Polyakov D.S., Grudinina N.A., Egorov V.V., Morozova I.V., Aleynikova T.D. and Shavlovskij M.M. Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins TTR-sfGFP and $\beta 2M$ -sfGFP. Preparative biochemistry and biotechnology. 2011; 41 (4): 337–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21967335>
9. Поляков Д.С., Антимонова О.И., Сахабеев Р.Г., Грудина Н.А., Ходова А.Е., Синецкина Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. Влияние наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка. Инфекция и иммунитет. 2017; 7 (2): 123–9. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-123-129> (Polyakov D.S., Antimonova O.I., Sakhabeev R.G., Grudinina N.A., Khodova A.E., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovskij M.M. Polylactic acid nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. Russian Journal of Infection and Immunity. 2017; 7 (2): 123–9. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-123-129> (in Russian))
10. Поляков Д.С., Грудина Н.А., Богословская Т.Ю., Соколов А.В., Мандельштам М.Ю., Васильев В.Б. Получение в клетках HEK293 химерного белка, состоящего из рецептора LDL и EGFP; перспективная система для оценки эффектов мутаций в гене LDLR. Цитология. 2017; 59 (12): 881–7. (Poljakov D.S., Grudinina N.A., Bogoslovskaja T.Ju., Sokolov A.V., Mandel'shtam M.Ju., Vasil'ev V.B. Poluchenie v kletkah HEK293 himernogo belka, sostojashhego iz receptora LDL i EGFP; perspektivnaja sistema dlja ocenki jeffektov mutacij v gene LDLR. Citologija. 2017; 59 (12): 881–7 (in Russian))
11. Поляков Д.С., Грудина Н.А., Соловьев К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотоян Арег А., Шавловский М.М. Бета-2-микроглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантного бета-2-микроглобулина человека. Медицинский академический журнал. 2010; 10 (2): 40–9. ISSN 1608-4101 <http://elibrary.ru/item.asp?id=22969470> (Poljakov D.S., Grudinina N.A., Solov'jov K.V., Egorov V.V., Sirotkin A.K., Alejnikova T.D., Totoljan Areg A., Shavlovskij M.M. Beta-2-mikroglobulinovij amiloidoz: fibrillogenez prirodno i rekombinantnyh beta-2-mikroglobulinov cheloveka. Medicinskij akademicheskij zhurnal. 2010; 10 (2): 40–9. ISSN 1608-4101 <http://elibrary.ru/item.asp?id=22969470> (in Russian))
12. Поляков Д.С., Сахабеев Р.Г., Шавловский М.М. Частичная денатурация рекомбинантного белка для его аффинного выделения. Прикладная биохимия и микробиология. 2016; 52 (1): 122–7. <http://elibrary.ru/item.asp?id=25069770> (Переводная версия статьи: Polyakov D.S., Sakhabeev R.G., Shavlovskij M.M., Partial Denaturation of Recombinant Protein for Affinity Purification. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologija. 2016; 52 (1): 122–7 (in Russian))
13. Kirill V. Solovjov, Anna M. Kern, Natalya A. Grudinina, Tatyana D. Aleynikova, Dmitry S. Polyakov, Irina V. Morozova, Michael M. Shavlovskij. Genetic structures and conditions of their expression, which allow receiving native recombinant proteins with high output. International Journal of biomedicine. 2012; 2 (1): 45–9 <http://elibrary.ru/item.asp?id=20245469> http://ijbm.org/articles/2_1_BR1.pdf

Поступила 1 февраля 2019 г.

Для цитирования: Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Грудина Н.А., Вишня А.А., Козловская А.А., Синецкина Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. Гуморальный иммунный ответ на антиген, иммобилизованный на наночастицах из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля. Молекулярная медицина. 2019; 17 (3): 32–36. <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-03-06>

For citation: Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Grudinina N.A., Vishnya A.A., Kozlovskaja A.A., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovskij M.M. The humoral immune response to the antigen immobilized on nanoparticles of copolymer of polylactic acid and polyethylene glycol. Molekulyarnaya meditsina. 2019; 17 (3): 32–36 (in Russian). <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-03-06>