

ИЗУЧЕНИЕ АДЬЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНО-ПРОНИКАЮЩИХ КАТИОННЫХ ДЕНДРИМЕРНЫХ ПЕПТИДОВ

Шатилов А.А.¹, Шатилова А.В.¹, Асанбаева А.А.^{1,2}, Копылова А.Д.¹,
Черченко Н.Г.¹, Миславский О.В.¹, Андреев С.М.¹, Смирнов В.В.^{1,2},
Хаитов М.Р.^{1,3}

¹ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Адъюванты являются важными компонентами вакцинных препаратов, в том числе аллерговакцин, позволяющими повысить их эффективность и безопасность. В настоящее время интерес мирового научного сообщества вызывает подход, основанный на включение адъюванта в состав молекулы иммуногена. Такие ковалентные адъюванты могут быть представлены веществами разных химических классов и, в частности, пептидами. Пептиды обладают такими преимуществами перед веществами других классов, как высокая эффективность и биodeградация, при этом дендримерные катионные пептиды зачастую способны к усиленной по сравнению с линейными пептидами транспортности. В рамках данной работы была изучена способность усиливать индукцию IgG двух катионных дендримерных клеточно-проникающих пептидов с показанной ранее трансмембранной активностью: LTP и SA-40. Пептиды были получены твердофазным синтезом, охарактеризованы методами масс-спектрометрии и зонного капиллярного электрофореза. Для изучения адъювантной активности пептиды были конъюгированы с рекомбинантным протеином Bet v 1, представляющим собой мажорный аллерген пыльцы березы, полученным биотехнологически с использованием продуцента E. coli и очищенным хелатной хроматографией. Конъюгация проводилась по реакции Михаэля после модификации протеина малеимидной функцией. Очистка конъюгатов производилась гелевой хроматографией и диализом, эффективность конъюгации оценивалась электрофорезом в полиакриламидном геле. Конъюгаты и чистый гBet v 1 использовались для иммунизации лабораторных мышей

Адрес для переписки:

Шатилов Артем Андреевич
ФГБУ «Государственный научный центр
«Институт иммунологии» Федерального медико-
биологического агентства»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (499) 311-67-78.
E-mail: aa.shatilov@nrcii.ru

Address for correspondence:

Artem A. Shatilov
National Research Center — Institute of Immunology,
Federal Medical-Biological Agency
24 Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (499) 311-67-78.
E-mail: aa.shatilov@nrcii.ru

Образец цитирования:

А.А. Шатилов, А.В. Шатилова, А.А. Асанбаева,
А.Д. Копылова, Н.Г. Черченко, О.В. Миславский,
С.М. Андреев, В.В. Смирнов, М.Р. Хаитов «Изучение
адъювантных свойств клеточно-проникающих
катионных дендримерных пептидов» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1033-1042.
doi: 10.15789/1563-0625-SAP-3157

© Шатилов А.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Shatilov, A.V. Shatilova, A.A. Asanbaeva,
A.D. Kopylova, N.G. Cherchenko, O.V. Mislavskii,
S.M. Andreev, V.V. Smirnov, M.R. Khaitov “Studying adjuvant
properties of cell-penetrating cationic dendrimeric peptides”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1033-1042.
doi: 10.15789/1563-0625-SAP-3157

© Shatilov A.A. et al., 2025

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SAP-3157

BALB/c для сравнения уровней IgG к rBet v 1 после четырех инъекций без использования иных адъювантов. Сыворотки крови мышей изучались иммуноферментным анализом на уровне IgG против rBet v 1, что было целевым показателем, а также против самих конъюгатов и свободных пептидов LTP и SA-40. Установлено, что оба конъюгата ощутимо повышали уровень IgG к исходному протеину, при этом один из них, LTP-rBet v 1, также вызывал реактивность сыворотки как к самому себе, так и к свободному пептиду LTP. Повышение уровня IgG к rBet v 1 в случае LTP-rBet v 1 было приблизительно четырехкратным, в случае SA-40-rBet v 1 — трехкратным. По результатам исследования сделаны выводы о наличии у исследуемых пептидов адъювантной активности, о возможных причинах наблюдаемых явлений и о перспективности дальнейших работ в данном направлении, при этом мы считаем, что структуры пептидов LTP и SA-40 могут быть впоследствии использованы в качестве референтных при разработке новых пептидных адъювантов, и в качестве ковалентного адъюванта может быть использован сам SA-40. В свою очередь, LTP, вероятно, может иметь перспективы использования также в качестве нековалентного адъюванта.

Ключевые слова: катионные дендримерные пептиды, конъюгаты пептидов, пептидные адъюванты, аллергены, рекомбинантные белки, Bet v 1

STUDYING ADJUVANT PROPERTIES OF CELL-PENETRATING CATIONIC DENDRIMERIC PEPTIDES

Shatilov A.A.^a, Shatilova A.V.^a, Asanbaeva A.A.^{a, b}, Kopylova A.D.^a,
Cherchenko N.G.^a, Mislavskii O.V.^a, Andreev S.M.^a, Smirnov V.V.^{a, b},
Khaitov M.R.^{a, c}

^a National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^c Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The adjuvant agents represent important components of vaccines, including medications for specific immunotherapy, which improve their efficacy and safety. Current scope of vaccines development includes approaches based on inclusion of adjuvant into the immunogenic molecule. Such covalent adjuvants vary greatly in chemical structure, and are found among particular peptides. Peptides have distinct advantages over substances of other chemical classes, e.g., high efficiency and biodegradability, whereas dendrimeric cationic peptides are often capable of enhanced translocation ability when compared to linear peptides. In this work, the ability to enhance IgG induction was studied for two cationic dendrimeric cell-penetrating peptides with previously reported transmembrane activity, i.e., LTP and SA-40. The peptides were obtained by solid-phase synthesis and characterized by mass-spectrometry and zone capillary electrophoresis. To study adjuvant activity, the peptides were conjugated with recombinant protein Bet v 1, a major birch pollen allergen, produced as biotechnology product, using *E. coli*. Chemical conjugation was carried out with Michael reaction after maleimide functionalization of the protein. The conjugates were purified by gel chromatography and dialysis, followed by estimation of conjugation efficiency with SDS-PAGE. Conjugates and pure rBet v 1 were used to immunize BALB/c mice to compare IgG levels to rBet v 1 after 4 injections without using other adjuvants. Mouse blood sera were studied with ELISA for IgG levels against rBet v 1, being the target criterion of the study, as well as against the conjugates and free LTP and SA-40. It was found that both conjugates significantly increased the IgG level to the initial protein, while one of them, LTP-rBet v 1, also induced serum reactivity both to itself and to free LTP. The increase in IgG level to rBet v 1 was approximately four-fold in the case of LTP-rBet v 1, and three-fold with SA-40-rBet v 1. Based on the results of this study, it was concluded that both LTP and SA-40 possess adjuvant activity. We believe that LTP and SA-40 structures can be used as reference agents in development of new peptide adjuvants, and SA-40 itself may be used as a covalent adjuvant. Moreover, LTP may be considered a prospective non-covalent adjuvant.

Keywords: cationic dendrimer peptides, peptide conjugates, peptide adjuvants, allergens, recombinant proteins, Bet v 1

Исследование проведено в рамках задания ФМБА России «Адъювант-24».

Введение

Адъюванты широко используются как в экспериментальной биологии, так и в составе вакцин, позволяя усилить индукцию антител и сократить дозы антигена и курс иммунизации [6, 21]. Разработка новых адъювантов является актуальным направлением исследований в областях иммунологии и фармации, и к настоящему моменту адъювантные свойства обнаружены у веществ разных классов [3, 8, 9, 14], в том числе пептидов [12, 16, 17, 19]. К преимуществам синтетических пептидов можно отнести высокую эффективность и биосовместимость [10, 13], а также возможность их получения с применением конвенциональных технологий, как твердофазный пептидный синтез [20].

Особой значимостью поиск и испытание новых адъювантов обладает в перспективах разработки аллерговакцин для специфической иммунотерапии ввиду использования в последней антигенов, способных вызывать тяжелые нежелательные лекарственные реакции, вплоть до анафилаксии [7, 15, 18]. В настоящей работе произведена концептуальная оценка возможности применения клеточно-проникающих катионных дендримерных пептидов LTP и SA-40 [1] в качестве адъювантов для рекомбинантного протеина rBet v 1, соответствующего мажорному аллергену пыльцы березы Bet v 1 — одному из наиболее значимых аэроаллергенов центральной России [2].

Цель данной работы — получение конъюгатов рекомбинантного Bet v 1 с клеточно-проникающими дендримерными пептидами LTP и SA-40 и оценка уровня индукции конъюгатами антител у лабораторных животных в сравнении с исходным rBet v 1.

Материалы и методы

Получение пептидов

Пептидный синтез осуществлялся на синтезаторе PS3 (Protein Technologies Inc., США) с использованием Fmoc-защищенных аминокислот и смолы H-Rink-Amide-ChemMatrix (Iris Biotech, Германия). Растворитель на всех стадиях — N,N-диметилформамид (Scharlau, Испания), активация аминокислот — гексафторфосфат бензотриазолилтетраметилуриона (HBTU) (Acros Organics, Бельгия) и N-метилморфолин (Fischer Scientific, США), отщепление Fmoc-защиты — 4-метилпиперидин (Sigma-Aldrich, США). Отщепление пептидов от смолы осуществлялось в смеси концентрированной трифторуксусной кислоты (ТФУ) (Carl Roth, Германия), 1,2-этандитиола,

тиоанизола (Sigma-Aldrich, США) и воды деионизованной. Пептиды выделялись из реакционной смеси осаждением диэтиловым эфиром (ООО «Химмед», Россия). Для очистки пептидов применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы LC-20 Prominence с фотометрической детекцией при 226 и 280 нм (Shimadzu, Япония). Стационарная фаза — Kromasil Eternity-5-C18, 250 × 30 mm (Nouryon, Швеция). Элюция — медленный градиент от 5% до 70% ацетонитрила (ООО «Компонент-Реактив», Россия) в 0,1%-ном водном растворе ТФУ.

Физико-химическая характеристика пептидов

Идентификация пептидов производилась методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным анализатором с использованием спектрометра Bruker Microflex LT (Bruker, Германия). Матрица — α -циано-4-гидроксикоричная кислота (Sigma-Aldrich, США).

Чистоту пептидов определяли с помощью капиллярного электрофореза (Капель 105М, ООО «Люмекс», Россия) на незаполненном кварцевом капилляре ($l_{\text{общая}}$ — 60 см, $l_{\text{эффективная}}$ — 50 см, $d_{\text{внутренний}}$ — 75 мкм) методом нормализации. Буфер — 0,1 М фосфорная кислота (Acros Organics, Бельгия), 0,05 М трис(гидроксиметил)аминометана (Tris) (ООО «Хеликон», Россия) в деионизованной воде, ввод пробы гидродинамический, напряжение +20 кВ, детекция фотометрическая — 226 нм.

Получение белка

Рекомбинантный продуцент rBet v 1 (изоформа 1.0101, UniProt: P15494, с гистидиновым повтором на С-конце, продуцент *E. coli*) был предоставлен профессором Р. Валентой (ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России) [5]. Клетки растили в жидкой питательной среде ГРМ-1 (2,5 г / 100 мл) (Оболensk, Россия) содержащей 25 мкг/мл канамицина при температуре 37 °С до достижения оптической плотности культуры $\geq 0,060$ AU при длине волны 600 нм NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Экспрессию белка индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Thermo Scientific, США) конечной концентрацией 1 мМ; в процессе наращивания биомассы pH поддерживался на уровне 7,0-8,0 добавлением 0,1 М NaOH (ООО «Химмед», Россия). После получения биомассы клетки концентрировали центрифугированием при 4000 g 20 минут, +4 °С (Beckman Coulter, США). Затем клетки подвергали ультразвуковой обработке с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonicator Q500 (Qsonica, США) на холоде 5 минут в лизирующем буфере (300 мМ

NaCl (ООО «Химмед», Россия), 50 мМ NaH_2PO_4 (ООО «Химмед», Россия), 10 мМ имидазола (Sigma-Aldrich, США), pH = 8,0). Разрушенные клетки осаждали центрифугированием при 18 000 g 20 минут, +4 °С. Надосадочную жидкость собирали и выделяли белок с помощью металлоафинной хроматографии на агарозной смоле Ni-NTA (Qiagen, Германия). Смолу уравнивали лизирующим буфером, затем переносили надосадочную жидкость на смолу и перемешивали в течение 2 часов при температуре +4 °С. Затем надосадочную жидкость удаляли, смолу промывали трехкратно лизирующим буфером, затем трижды буфером А (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH_2PO_4 , 50 мМ имидазола, pH = 8,0) и буфером В (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH_2PO_4 , 500 мМ имидазола, pH = 8,0), все фракции собирали для дальнейшего анализа. Анализ полученных фракций после очистки проводили электрофоретически в 14%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (ООО «Хеликон», Россия) и окрашивали раствором Кумасси (Serva, Германия), затем гель отмывали. Фракции, содержащие наибольшие количества чистого белка, были объединены. Имидазол из фракций rBet v1 удаляли с помощью диализа против 0,1 М NaH_2PO_4 с pH = 7,4 с пятью сменами раствора во внешнем контуре диализера. Подлинность полученного rBet v 1 определялась иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием моноклональных антител mAb BV16 IgG1 (Biorbyt Ltd., США) в сравнении с природным Bet v 1 (Indoor Biotechnologies, США).

Модификация белка пептидами

Модификацию rBet v 1 проводили в две стадии: на первой стадии белок был функционализирован N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-(maleimido)пропионовой кислоты (Sigma-Aldrich, США), продукт был выделен геле-фильтрацией на колонке Sephadex G-10 (Pharmacia, Швеция) с помощью гелевого хроматографа BioLogic LP (Bio-Rad, США), детекция — фотометрическая при 254 нм. На второй стадии к maleimido-функционализированному белку были присоединены пептиды SA-40 и LTP (рис. 1) по реакции Михаэля в среде ДМСО (Merck, Германия) с добавлением фосфатного буфера (9/1, pH = 8,0). Финальная очистка проводилась диализом против воды, ретентат лиофилизировался. Полученные конъюгаты SA-40 — rBet v 1 и LTP — rBet v 1 анализировали с помощью электрофореза в 14% и 15% ПААГ (ООО «Хеликон», Россия) в сравнении с rBet v 1. Стандарты — лизоцим (~13 кДа) и куриный овальбумин (~42 кДа) (Sigma-Aldrich, США).

Иммунизация лабораторных животных

Растворы для иммунизации готовились посредством растворения 1 мг антигена в 12 мл

стерильного физиологического раствора (НПП «ПанЭко», Россия) в асептических условиях. В исследовании использовались самки мышей линии BALB/c весом 18-20 г, возрастом 6-8 недель, которые после получения были помещены в карантин на две недели и имели неограниченный доступ к еде и воде. Мыши были распределены по 4 группам для иммунизации: 1 — LTP — rBet v 1; 2 — SA-40 — rBet v 1; 3 — rBet v 1 (все по 9 мышей), 4 — интактные (5 мышей). Иммунизацию проводили трехкратно подкожно и однократно внутривентриально в дозе 25 мкг/мышь (25 мкг в 300 мкл), с двухнедельными интервалами, интактным мышам вместо антигенов вводили 300 мкл физиологического раствора. Через 7 дней после и 4 иммунизации у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса. Кровь центрифугировали 10 минут при 2000 g (Eppendorf, Германия) и +8 °С, и отбирали сыворотку. Сыворотку крови мышей хранили при +4 °С.

Оценка уровня индукции IgG

Определение индукции IgG полученными конъюгатами после полной иммунизации проводился методом иммуноферментного анализа (ИФА) на среднесорбционных планшетах (Greiner, Австрия). В лунки планшета наносили растворенные в фосфатном буфере с pH = 7,4 (НПП «ПанЭко», Россия) конъюгаты SA-40 — rBet v 1 и LTP — rBet v 1, rBet v 1, бычий сывороточный альбумин (БСА) (НПП «ПанЭко», Россия) в концентрации 10 мкг/мл (100 мкл на лунку) при +37 °С в течение 1 часа. Затем планшет пятикратно отмывали фосфатным буфером с добавлением 0,1%-ном Tween-20 (Sigma-Aldrich, США) 150 мкл на лунку. Затем незанятые участки связывания на поверхности лунок планшета блокировали 5%-ным обезжиренным сухим молоком, (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере с добавлением 0,1%-ного Tween-20, 200 мкл на лунку, при комнатной температуре в течение 1 часа и отмывали планшет, как указано выше. В лунки планшета вносили сыворотку крови мышей в разведении 1/100 в фосфатном буфере с добавлением 0,05%-ного Tween-20 и 0,1%-ного БСА (100 мкл на лунку) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После пятикратной отмывки вносили по 100 мкл на лунку вторичные противомышинные антитела овцы, меченные пероксидазой хрена (ООО «Сорбент», Россия). После пятикратной отмывки в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ) (BD, США) и инкубировали 30 минут. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл на лунку 0,5М H_2SO_4 . Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном фотометре Multiskan GO (Thermo Fisher, США) при двух длинах волн: 450 (ОП450) и 620 (ОП620).

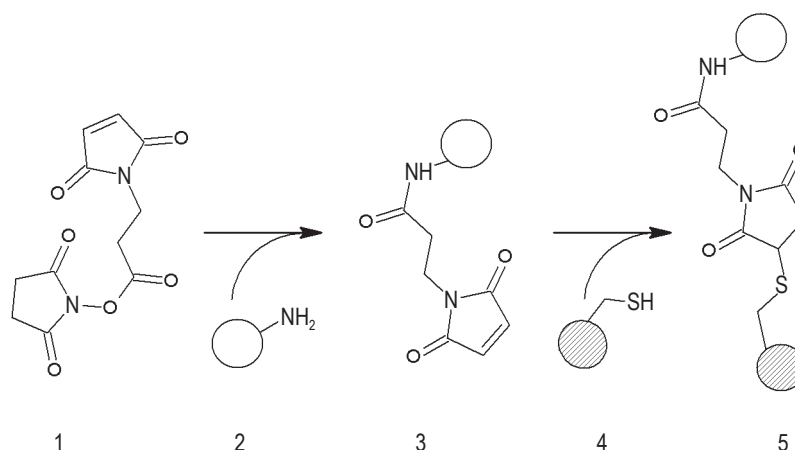


Рисунок 1. Схема модификации rBet v 1 пептидами

Примечание. 1 – N-гидроксисукцинимидный эфир 3-(малеими́до)пропионовой кислоты; 2 – rBet v 1; 3 – rBet v 1 функционализированный 3-(малеими́до)пропионовой кислотой; 4 – SA-40 или LTP; 5 – конъюгат rBet v 1 с пептидом.

Figure 1. Scheme of modification of rBet v 1 with peptides

Note. 1, 3-Maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester; 2, rBet v 1; 3, rBet v 1 functionalized with 3-(maleimido)propionic acid; 4, SA-40 or LTP; 5, rBet v 1 conjugate with peptide.

нм. Программным обеспечением прибора высчитывалась разница между ОП450 и ОП620 (ΔОП). Число повторов – 3. Значимость различий определялась по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Результаты

Получение пептидов

Были получены С-амиды пептидов с аминокислотными последовательностями, приведенными в таблице 1.

Масс-спектры, подтверждающие подлинность синтезированных пептидов, а также электрофореграммы, подтверждающие их чистоту, представлены на рисунке 2. Целевой пик с $m/z = 2754,4$ соответствует расчетной молекулярной массе 2756 Да для SA-40; пик с $m/z = 2337,6$ соответствует расчетной молекулярной массе 2338 Да для LTP, что говорит об успешном получении исследуемых пептидов. Чистота для полученных пептидов составила 95% для SA-40 и 100% для LTP.

Получение конъюгата rBet v 1 с пептидами

Электрофорез в ПААГ представлен на рисунке 3. Из полученных данных видно, что конъюгаты SA-40 – rBet v 1 и LTP – rBet v 1 находятся выше уровня rBet v 1, что свидетельствует об успешной функционализации белка пептидами – предположительно, от 1 до 5 остатками пептидов на молекулу rBet v 1.

Оценка уровня индукции IgG

Адъювантный эффект пептидов определялся по индукции IgG к rBet v 1. Для этого сыворотка животных анализировалась на реактивность к антигену, rBet v 1 и пептиду-адъюванту, как указано в таблице 2.

Полученные результаты приведены на рисунке 4. Из них следует, что во всех иммунизированных группах был получен специфичный антительный ответ к rBet v 1, при этом конъюгаты индуцировали IgG к rBet v 1 сильнее, чем чистый протеин. У сыворотки группы 1, иммунизированной LTP-rBet v 1, наблюдалась интен-

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРЫ ПЕПТИДНЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

TABLE 1. STRUCTURES OF DENDRIMERIC PEPTIDES

Наименование Name	Структура Structure	Расчетная среднеизотопная молекулярная масса, Да Calculated average isotopic molecular weight, Da	Заряд Charge
SA-40	(ArgArgArgLeulleLysPhelle) ₂ Lys-LysAsnThrCys	2756	+11
LTP	((Arg) ₂ Lys) ₂ Lys) ₂ LysAlaCys	2338	+16

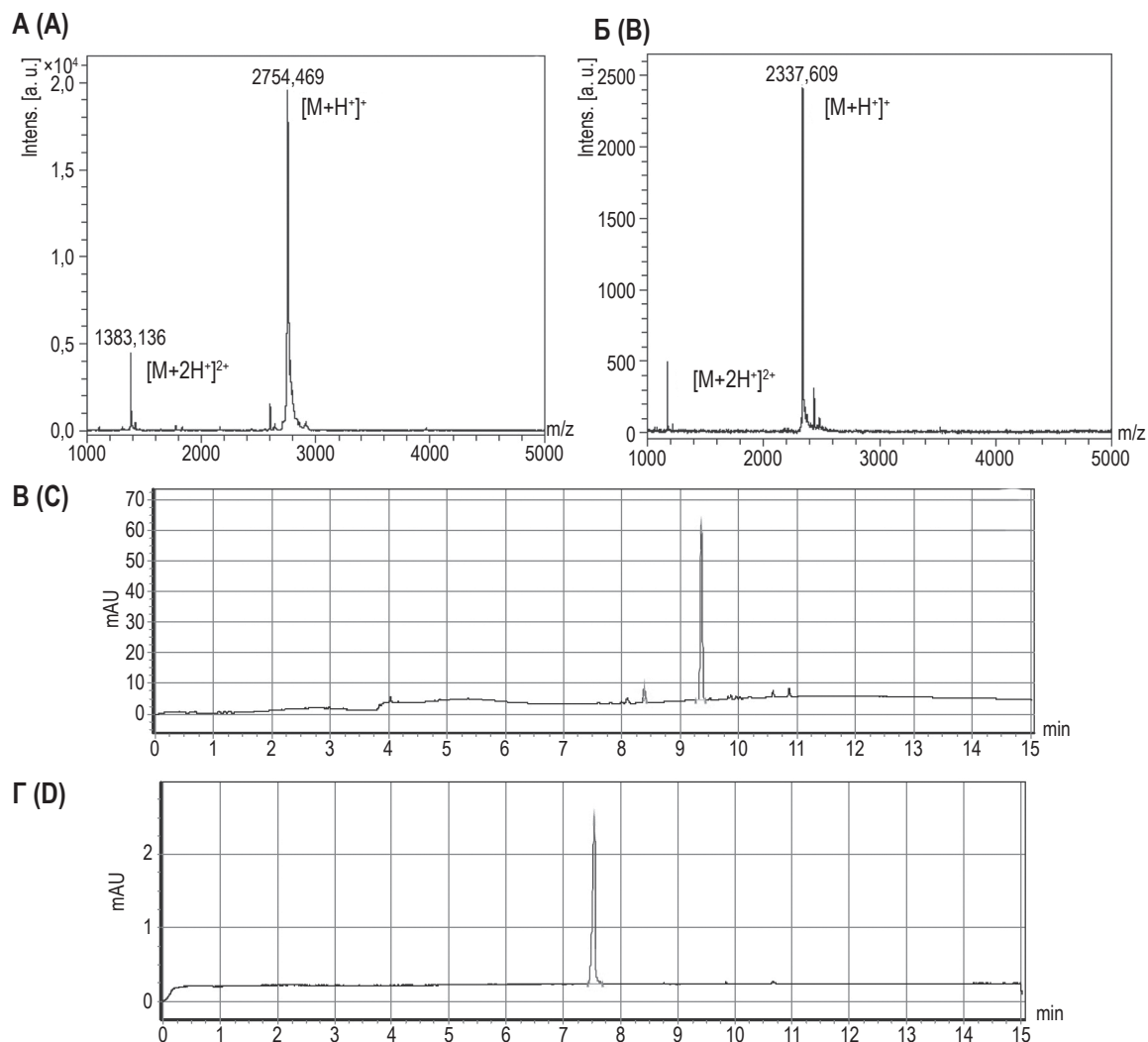


Рисунок 2. Масс-спектры пептидов SA-40 (А) и LTP (Б), и электрофореграммы SA-40 (В) и LTP (Г)

Figure 2. Mass spectrum of peptides SA-40 (A) and LTP (B) and electrophoregrams SA-40 (C) и LTP (D)

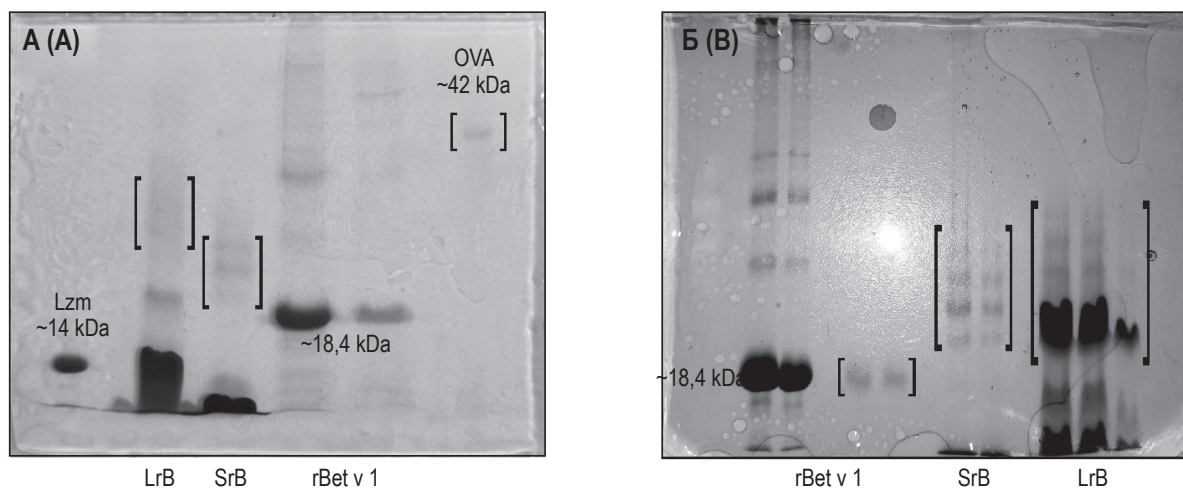


Рисунок 3. Электрофорез в ПААГ для rBet v 1 и конъюгатов в 14% геле (А) и 15% геле (Б)

Примечание. L-rB – LTP-rBet v 1, S-rB – SA-40-rBet v 1, Lzm – лизоцим, OVA – куриный овальбумин.

Figure 3. Polyacrylamide gel electrophoresis for rBet v 1 and conjugates in 14% gel (A) and 15% gel (B)

Note. L-rB, LTP-rBet v 1; S-rB, SA-40-rBet v 1; Lzm, lysozyme; OVA, chicken egg ovalbumin.

ТАБЛИЦА 2. СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

TABLE 2. SCHEME OF ELISA EXPERIMENT

Группа Group	Антиген при иммунизации Antigen used during immunization	Аналит в иммуноферментном анализе Analyte used in ELISA
1	LTP-rBet v 1	rBet v 1
		LTP-rBet v 1
		LTP
		BSA – отрицательный контроль специфичности BSA, negative control for specificity
2	SA-40-rBet v 1	rBet v 1
		SA-40-rBet v 1
		SA-40
		BSA – отрицательный контроль специфичности BSA, negative control for specificity
3	rBet v 1	rBet v 1
		BSA – отрицательный контроль специфичности BSA, negative control for specificity
4	Интактные Intact	Сыворотка использовалась как отрицательный контроль для других групп Serum was used as negative control for all other groups

сивная реактивность в отношении LTP-rBet v 1 и LTP. Сыворотка группы 2, иммунизированной SA-40-rBet v 1, значительно менее активно связывала SA-40-rBet v 1 и SA-40, чем rBet v 1.

Обсуждение

Из представленных результатов ИФА следует, что конъюгаты обладали большей иммуногенностью, чем рекомбинантный протеин, однако следует обратить внимание на разницу, наблюдаемую в ответе сывороток на антигены, использованные при иммунизации. Так, на рисунке 4 заметно, что при иммунизации SA-40-rBet v 1 максимальная реактивность сыворотки формируется к rBet v 1, и значительно меньшая – к SA-40 и SA-40-rBet v 1. В свою очередь, сыворотка группы 1, иммунизированной LTP-rBet v 1, имея сравнимый со второй группой уровень неспецифического связывания БСА, наиболее активно реагирует с LTP-rBet v 1, а также интенсивно связывает чистый LTP, при этом ответ к rBet v 1 был несколько сильнее такового у второй группы, и в случае обеих групп он был выше, чем у третьей группы, иммунизированной rBet v 1, в 3–4 раза. На наш взгляд, такие различия обусловлены строением дендримерных пептидов (рис. 5) и, соответственно, их физико-химическими свойствами.

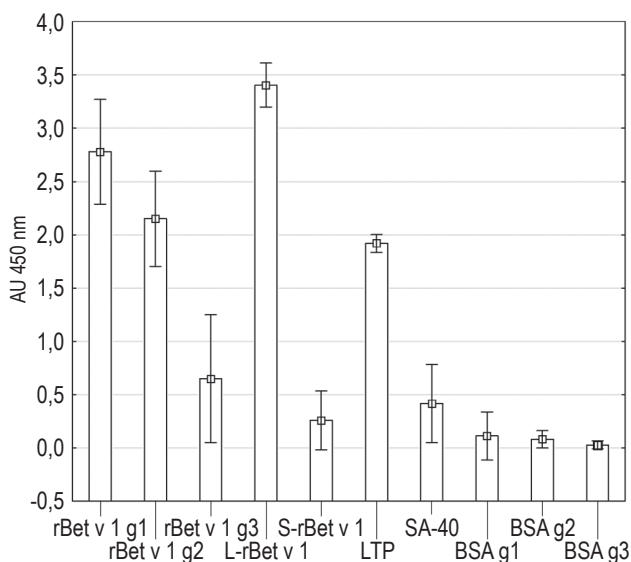


Рисунок 4. Оценка уровня индукции IgG исследуемыми веществами у иммунизированных животных

Примечание. L-rBet v 1 – LTP-rBet v 1, S-rBet v 1 – SA-40-rBet v 1. Представлены средние значения $\pm$ доверительный интервал 95%. $n = 3$. $p \leq 0,05$.

Figure 4. Evaluation of IgG induction in mice by compounds of interest

Note. L-rBet v 1, LTP-rBet v 1; S-rBet v 1, SA-40-rBet v 1.

Means $\pm$ 95% confidence intervals are presented. $n = 3$. $p \leq 0.05$.

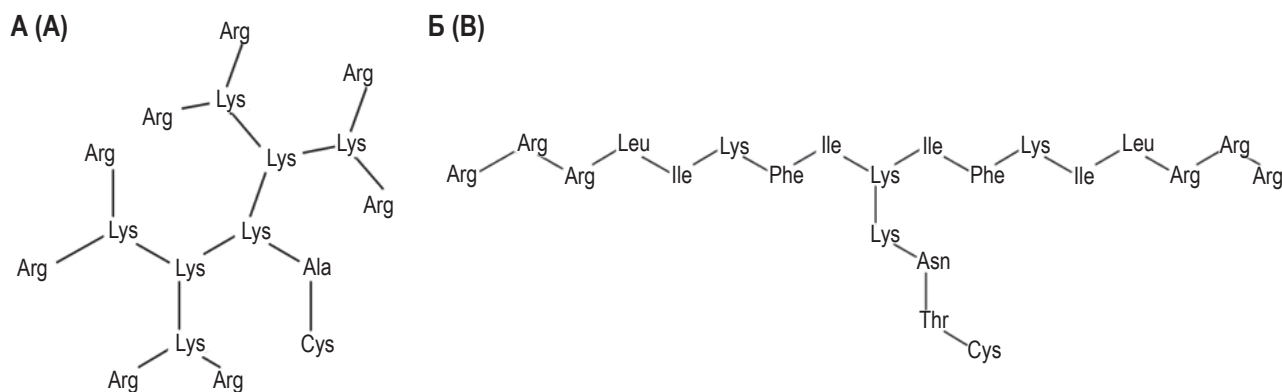


Рисунок 5. Структуры LTP (А) и SA-40 (Б)

Figure 5. Structures of LTP (A) and SA-40 (B)

LTP имеет 16 основных центров, в то время как SA-40 лишь 11, при этом у LTP они выражены 8 гуанидиновыми группами (pKa ~12,48) и 8 аминогруппами (pKa ~9,04), а у SA-40 есть лишь 6 гуанидиновых групп и 5 аминогрупп. Расчетные значения pI этих пептидов близки и составляют: ~12,96 для LTP и ~12,81 для SA-40, однако различия в зарядах более наглядны на электрофореграммах, полученных для данных пептидов в идентичных условиях. Так, при капиллярном электрофорезе время миграции LTP меньше такового у SA-40 на 1,75 мин (рис. 2В, Г), а при электрофорезе в ПААГ свободный LTP в образце LTP-гBet v 1 при миграции образует мало разделимую зону 0~13 кДа (рис. 3). С учетом повышенного напряжения при капиллярном зонном электрофорезе данный факт может говорить о склонности LTP, в отличие от SA-40, к образованию супрамолекулярных структур. Данное явление в настоящее время изучается нами, однако можно сделать предположение, что LTP может создавать в растворе мицеллы, и, в случае присутствия чистого LTP в составе LTP-гBet v 1 по причине неполного присоединения или протекания ретро-реакции Михаэля, мицеллярный слой может образовываться вокруг гBet v 1. Структура SA-40, в свою очередь, обладает меньшей полярностью, чем у LTP, в связи с чем для него мицеллообразование мы считаем менее вероятным и ненаблюдаемым в результатах данного исследования. Следует отметить, что на полученную разницу в уровнях ответа к дендримерам также может влиять неодинаковый процесс гидролиза конъюгатов в АПК, который может приводить к выраженной презентации LTP, но не SA-40. Мы считаем, что реактивность антисыворотки к LTP и его конъюгату с гBet v 1 является негативным фактором в вопросе его перспективности в качестве адъюванта в сравнении с SA-40, впрочем, это также может свидетельствовать о более выраженной способности LTP к образованию некова-

лентного комплекса с протеином и проявлению адъювантной активности в таком состоянии.

Наблюдаемую повышенную иммуногенность конъюгатов, на наш взгляд можно объяснить тремя факторами: во-первых, пептиды могут переносить протеин внутрь АПК, во-вторых, конъюгаты могут обладать значительно увеличенным поверхностным зарядом, что может провоцировать их захват АПК, в-третьих, конъюгация могла реструктурировать гBet v 1 предпочтительным для процессирования и презентации образом.

В случае первого фактора мы полагаем, что конъюгаты могут попасть в АПК благодаря трансмембранной активности пептидов, но не могут покинуть лизосому. Ввиду основности использованных пептидов, на наш взгляд, они могут действовать как дополнительные «якоря» для протеина в лизосоме. Необходимо упомянуть, что в настоящее время нами не изучена трансмембранная активность конъюгатов на клеточных культурах.

Второй возможный фактор — действие дендримеров в качестве приманки для АПК — характерен для описанных в литературе ковалентных адъювантов [4, 11] и также может быть экстраполирован на использованные дендримерные пептиды, так как их заряд составляет +16 и +11.

Третий фактор — реструктуризация гBet v 1 в ходе конъюгации — нами в рамках описываемых испытаний не изучался, однако можно предположить значительное влияние пептидов на структуру протеина ввиду относительно больших молекулярных масс пептидов (составляют около 13% от массы протеина).

Заключение

В настоящей работе были получены два клеточно-проникающих пептидных дендримера, их подлинность была подтверждена масс-спектрометрией, а чистота, по данным зонного капиллярного электрофореза, составила не менее 95%.

Нами показано, что их конъюгация с гBet v 1 повысила индукцию IgG к последнему приблизительно в три раза, что свидетельствует о наличии у обоих пептидов адъювантных свойств. Мы предполагаем, что SA-40 предпочтительнее ЛТР в качестве ковалентного адъюванта, в то время как ЛТР может проявлять более выраженную активность в качестве нековалентного адъюванта, и данные структурно-обусловленные различия следует принимать во внимание при получении новых пептидов с адъювантной активностью. В работе кратко

приведена гипотеза, объясняющая адъювантный эффект, однако в дальнейшем планируется проведение работ по прояснению механизма иммунного эффекта таких пептидов. Дальнейшие перспективы данной работы мы видим в разработке и получении стандартных пептидных адъювантов, а также в изучении сопутствующих иммунизации явлений: аллергенности и толерогенности таких комплексов и потенциального влияния присутствия пептидов в их составе на эпитопный профиль рекомбинантного протеина.

Список литературы / References

1. Кожихова К.В., Андреев С.М., Успенская Д.В., Шатилова А.В., Турецкий Е.А., Шатилов А.А., Лушникова А.А., Вишнякова Л.И., Шиловский И.П., Смирнов В.В., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Суперкатионные пептидные дендримеры как векторы для доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих // Иммунология, 2022. Т. 43, № 3. С. 320-332. [Kozhikhova K.V., Andreev S.M., Uspenskaya D.V., Shatilova A.V., Turetsky E.A., Shatilov A.A., Lushnikova A.A., Vishnyakova L.I., Shilovskiy I.P., Smirnov V.V., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Supercationic peptide dendrimers as vectors for nucleic acids delivery to mammalian cells. *Immunologiya = Immunologiya*, 2022, Vol. 43, no. 3, pp. 320-332. (In Russ.)]
2. Козулина И.Е., Курбачева О.М., Ильина Н.И. Аллергия сегодня. Анализ новых эпидемиологических данных // Российский аллергологический журнал, 2014. Т. 11, № 3. С. 3-10. [Kozulina I.E., Kurbacheva O.M., Ilyina N.I. Allergy today. Analysis of new epidemiological data. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2014, Vol. 11, no. 3, pp. 3-10. (In Russ.)]
3. Apostólico J.D.S., Lunardelli V.A.S., Coirada F.C., Boscardin S.B., Rosa D.S. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 1459394. doi: 10.1155/2016/1459394.
4. Blanco-Pérez F., Papp G., Goretzki A., Möller T., Anzaghe M., Schülke S. Adjuvant allergen fusion proteins as novel tools for the treatment of type I allergies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2019, Vol. 67, no. 5, pp. 273-293.
5. Brazhnikov G., Smolnikov E., Litovkina A., Jiang T., Shatilov A., Tulaeva I., Tulaev M., Karaulov A., Poroshina A., Zhernov Yu., Focke-Tejkl M., Weber M., Akinfenwa O., Elisyutina O., Andreev S., Shilovskiy I., Shershakova N., Smirnov V., Fedenko E., Lepeshkova T.S., Beltyukov E.C., Naumova V.V., Kundi M., Khaitov M., Wiedermann U., Valenta R., Campana R. Natural human Bet v 1-specific IgG antibodies recognize non-conformational epitopes whereas IgE reacts with conformational epitopes. *Allergy*, 2023, Vol. 78, no. 12, pp. 3136-3153.
6. Del Giudice G., Rappuoli R., Didierlaurent A.M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 39, pp. 14-21.
7. DuToit G., Smith P., Muraro A., Fox A.T., Roberts G., Ring J., Worm M. Identifying patients at risk of anaphylaxis. *World Allergy Organ. J.*, 2024, Vol. 17, no. 6, 100904. doi: 10.1016/j.waojou.2024.100904
8. Facciola A., Visalli G., Laganà A., Di Pietr A. An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines*, 2022, Vol. 10, no. 5, 819. doi: 10.3390/vaccines10050819.
9. Gamazo C., D'Ameli C., Gastaminza G., Ferrer M., Irache J.M. (2017) Adjuvants for allergy immunotherapeutics. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2017, Vol. 13, no. 10, pp. 2416-2427.
10. Kozhikhova K.V., Shilovskiy I.P., Shatilov A.A., Timofeeva A.V., Turetskiy E.A., Vishniakova L.I., Nikolskii A.A., Barvinskaya E.D., Karthikeyan S., Smirnov V.V., Kudlay D.A., Andreev S.M., Khaitov M.R. Linear and dendrimeric antiviral peptides: Design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus. *J. Mater. Chem. B*, 2020, Vol. 8, no. 13, pp. 2607-2617.
11. Li Q., Li Z., Deng N., Ding F., Li Y., Cai H. Built-in adjuvants for use in vaccines. *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, Vol. 227, 113917. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113917.
12. Lingnau K., Riedl K., von Gabain A. IC31⁺ and IC30, novel types of vaccine adjuvant based on peptide delivery systems. *Expert Rev. Vaccines*, 2007, Vol. 6, no. 5, pp. 741-746.
13. Luo K., Li C., Wang G., Nie Y., He B., Wu Y., Gu Z. Peptide dendrimers as efficient and biocompatible gene delivery vectors: Synthesis and in vitro characterization. *J. Control. Release*, 2011, Vol. 155, no. 1, pp. 77-87.
14. McKee A.S., Marrack P. Old and new adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, Vol. 47, pp. 44-51.
15. Mueller R.S. Allergen-specific immunotherapy. *Vet. Allergy*, 2013, pp. 85-89.
16. Nagpal G., Chaudhary K., Agrawal P., Raghava G.P. Computer-aided prediction of antigen presenting cell modulators for designing peptide-based vaccine adjuvants. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, pp. 1-15.
17. Ogawa C., Liu Y.J., S Kobayashi K. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr. Bioact. Compd.*, 2011, Vol. 7, no. 3, pp. 180-197.
18. Ring J., Guterth J. 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT). *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 6, pp. 713-724.

19. Rudra J.S., Tian Y.F., Jung J.P., Collier J.H. A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 2, pp. 622-627.
20. Stawikowski M., Fields G.B. Introduction to peptide synthesis. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 2012, Chapter 18, pp. 18.1.1-18.1.13.
21. Vogel F.R. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, Vol. 30, no. 3, pp. 266-270.

Авторы:

Шатилов А.А. — научный сотрудник лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Шатилова А.В. — научный сотрудник лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Асанбаева А.А. — лаборант лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»; аспирант ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Копылова А.Д. — лаборант лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Черченко Н.Г. — к.б.н., технолог лаборатории моделирования иммунологических процессов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Миславский О.В. — к.фарм.н., старший научный сотрудник лаборатории фармакологии и фармацевтической разработки ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Андреев С.М. — к.х.н., заведующий лабораторией пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Смирнов В.В. — д.фарм.н., доцент, заведующий лабораторией фармакологии и фармацевтической разработки ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Хайтов М.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»; заведующий кафедрой иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Shatilov A.A., Researcher, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Shatilova A.V., Researcher, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Asanbaeva A.A., Laboratory Assistant, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; PhD student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Kopylova A.D., Laboratory Assistant, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Cherchenko N.G., PhD (Biology), Technologist, Laboratory of Modeling of Immunological Processes, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Mislavskii O.V., PhD (Pharmacy), Senior Researcher, Pharmacology and Pharmaceutical Development Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Andreev S.M., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Smirnov V.V., PhD, MD (Pharmacy), Associate Professor, Head, Pharmacology and Pharmaceutical Development Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Professor, A. Arzamastsev, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, A. Neliubin Institute of Pharmacy, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Khaitov M.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Head, Department of Immunology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.12.2024
Отправлена на доработку 18.12.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 14.12.2024
Revision received 18.12.2024
Accepted 23.03.2025