

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ”

Ива Иванова Иванова

***Насочване на моделен антиген от грипен вирус към
антиген-представящи клетки чрез генетично-
конструирани химерни молекули***

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор”

Професионално направление 4.3., "Биологически науки"

Научна специалност 01.06.23 "Имунология"

Научен ръководител: доц. Андрей Чорбанов, дб

София 2019

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ”

Ива Иванова Иванова

***Насочване на моделен антиген от грипен вирус към
антиген-представящи клетки чрез генетично-
конструирани химерни молекули***

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор”

Професионално направление 4.3., "Биологически науки"

Научна специалност 01.06.23 "Имунология"

Научен ръководител: **доц. Андрей Чорбанов, дб**

Научно жури: **проф. Нина Ивановска – ИМикБ**

доц. Андрей Чорбанов – ИМикБ

проф. Радостина Александрова – ИЕМПАМ

доц. Иванка Цачева – Биологически факултет СУ

проф. Мария Николова - НЦЗПБ

София 2019

Настоящият дисертационен труд е разработен в Лаборатория по Експериментална Имунология при ИМикБ-БАН. Генетичната работа е извършена съвместно с доц. Jozsef Prechl от Унгарската академия на науките – Будапеща. В работата за еукариотна експресия ни съдейства доц. Avgi Mamalaki от Hellenic Pasteur Институт – Атина.

Дисертационният труд обхваща 166 старици и съдържа 40 фигури и 5 таблици. Библиографската справка включва 405 източника предимно от последните 10 години.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на Националния семинар по патогенни микроорганизми и инфекциозна имунология на 24.09.2019 г. в Институт по Микробиология – БАН.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по Микробиология “Стефан Ангелов”, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 26, София.

БЛАГОДАРНОСТИ

Бих искала да изкажа най-искрена благодарност към научния си ръководител доц. д-р Андрей Чорбанов за помощта, съветите и търпението по осъществяването на настоящия дисертационен труд.

Благодаря още на:

Доц. Jozsef Prechl от Унгарската академия на науките – Будапеща за помоща указана в генетичната работа.

Доц. Avgi Mamalaki от Hellenic Pasteur Институт – Атина за съдействието при мащабната еукариотна експресия на генетичните конструкции.

На колегите от лабораторията по Експериментална имунология за търпението, подкрепата, помоща и вярата, които ми дадоха през годините.

Не на последно място бих искала да благодаря на семейството и приятелите си за тяхната подкрепа.

Използвани съкращения

scFv	едноверижни вариабилни фрагменти на антитела
WT	див тип
CR1/2 KO	Комплемент рецептор 1/2 нок-аут
FcγRI	Fc-гама рецептори клас I
IFN	интерферон
CD	кльстер на диференциация
ELISA	ензимносвързан имуносорбентен тест
FITC	флуоресцин изотиоцианат
ECL	усилваща хемилуминесценция
MHC	главен комплекс на тъканната съвместимост
HRP	пероксидаза от хрян
CTL	Цитотоксични Т лимфоцити
HA	хемаглутинин
NA	невраминидаза
RNP	рибонуклеопротеин
NP	нуклеопротеин
M	матричен протеин
TLR9	Тол-лайк рецептор 9
LAIV	жива атенюирана вирусна ваксина
APC	антиген представящи клетки
IV	инактивираните ваксини срещу грип
IgA	Имуноглобулин клас A
MIV	моновалентна инактивирана ваксина
CR	комплемент рецептор
SCRs	къси консенсусни повтори
ADCC	антитяло-зависимата клетъчна цитотоксичност
DCs	дендритни клетки

ITAM	имунорецепторен тирозин-базиран активационен мотив
HLA	човешки левкоцитни антигени
TNF;	тумор-некротизиращ фактор
mAbs	моноклонални антитела
IAV	Грипен вирус тип А
IBV	Грипен вирус тип В
ICV	Грипен вирус тип С
PCR	Полимеразна верижна реакция
Tg	Трансгенни миши модели
PBMC	Периферни кръвни мононуклеарни клетки
HSCs	Хематопоестични стволови клетки
NK cells	Естествени клетки убийци
CFA	Пълен адювант на Freund
IFA	Непълен адювант на Freund
Amp	Ампицилин
LPS	Липополизахарид
BSA	Говежди серумен албумин
RU	Относителни единици
CHO	Епителни клетки от яйчници на китайски хамстер
SDS-PAGE	Натриев додецилсулфат полиакриламидна гел електрофореза
DMEM	Модифицирана среда на Дюлбеко
IP	Грипен пептид

УВОД

Анти-вирусните ДНК ваксини са една нова стратегия в разработването на ваксини, която в общи линии представлява въвеждане на експресионни вектори, кодиращи вирусни антигенни секвенции в клетките на гостоприемника. Насочването на консервирани вирусни епитопи чрез антиядлови фрагменти, специфични за активиращи повърхностни клетъчни ко-рецепторни молекули върху антиген-представящите клетки може да бъде алтернативен подход за индуциране на протективен имунитет.

Известно е, че високо пречистените субеденични или синтетичните вирусни антигени са слабо имуногенни и стимулират само антиядловия, но не и клетъчно-медиацият имунен отговор. Алтернативен подход за индуциране на протективен имунитет с малки вирусни пептиди може да бъде директното насочване на вирусни епитопи към имунокомпетентните клетки чрез ДНК ваксини, кодиращи антиядлови фрагменти, специфични за активиращи повърхностни клетъчни ко-рецепторни молекули. Използвахме две моделни системи за алтернативно насочване към различни ко-рецептори.

Изследвахме нова генетична ваксина, реализирана като ДНК химерна молекула кодираща Т- и В-клетъчни епитопи на пептид от вътрешен субучастък на вирусен хемаглутинин от грип тип А, свързани със секвенции кодиращи едноверижни вариабилни фрагменти на антитела (scFv) специфични за костимулиращи В клетъчни комплемент рецептори 1 и 2. Тази рекомбинантна ДНК молекула беше интегрирана в еукариотна експресионна векторна система и използвана като гола ДНК ваксина в див тип (WT) и CR1/2 KO мишки.

Интра-мускулното приложение на ДНК конструкта води до *in vivo* експресия на имуногенен химерен протеин, който кръстосано свързва рецепторите на клетъчната повърхност върху специфичните за грипа В клетки. ДНК ваксинацията е последвана от реимунизация с протеиново-инженерната реплика на ДНК конструкта, като по този начин се доставя активационен вътреклетъчен сигнал. Имунизация с експресионен вектор, съдържащ описания конструкт и реимунизация с протеиновата химера индуцира силен анти-грипен цитотоксичен отговор, модулация на цитокиновия профил и отговор с антитела при интактни Balb/c мишки. Същата схема на имунизация не води до генериране на грип-специфичен отговор при мишки, лишени от прицелния рецептор, подчертавайки молекулярно-адювантния ефект на насочването на тези епитопи към рецепторите.

Доказано е, че FcγRI експресиран върху човешки моноцити усилва антигенното представяне *in vivo*. В еукариотна експресионна векторна система pTriEx-3 Neo бяха интегрирани различни ДНК конструкции, кодиращи едноверижни вариабилни фрагменти на антитела (scFv) от мишо анти-човешко FcγRI моноклонално антиядло, свързано за секвенция, кодираща същите Т- и В-клетъчни епитопи на пептид от вътрешен субучастък

на вирусен хемаглутинин от грип тип А. Така конструираниите химерни ДНК молекули бяха експресирани от трансфектирани СНО клетки, а способността на инженерните протеини да взаимодействат с FcγRI-експресиращите клетки беше потвърдена посредством проточна цитометрия. Фюжън протеина индуцира силна сигнална трансдукция при човешки моноцити през FcγRI.

Експресионният вектор pTriEx-3 Neo, съдържащ описания конструктор, беше използван като гола ДНК ваксина и въведен директно в експериментални хуманизирани NOD-SCID мишки с или без реимунизация с експресиращия фюжън протеин. Имунизация с генерираните ДНК химерни молекули и реимунизация с експресираните рекомбинантни протеини индуцира значително увеличение на нивата на анти-грипни IgG антителата и силна CTL активност срещу инфектираните с грипен вирус клетки в хуманизираните животни.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Първата цел на настоящото проучване беше да изследваме имунния отговор, предизвикан след имунизация на интактни Balb/C и CR1/2 имуно-дефицитни мишки с ДНК ваксина, кодираща scFv верига от CR1/2-специфично антитяло, конюгирано генетично с В/Т НА-вирусен епитоп.

Задачи I:

1. Генериране на генно-инженерна молекула, съдържаща scFv, специфично към миши CR1/2 и носеща вирусен пептиден епитоп от грипен вирус с мишена миша имунна система
2. Охарактеризиране и *in vitro* изследвания на експресираната генетична молекула или на нейната протеиново-инженерна реплика
3. Проследяване на имунния отговор след имунизация и ре-имунизация с ДНК ваксината и протеиновата реплика в интактна миша линия Balb/C и CR1/2 имуно-дефицитни мишки

Втората цел на настоящите изследвания е да бъдат генерирани високи нива на анти-грипни антитела и силен грип-специфичен цитотоксичен Т-клетъчен (CTL) отговор в хуманизирани NSG мишки чрез прилагане на химерни ДНК молекули, които кодират scFv от моноклонално антитяло срещу активирация FcγRI, свързано с имуногенни пептиди от грипен вирус. След експресия *in vivo*, генетично конструираниите молекули се очаква да се свържат селективно към APCs и да проведат силен активационен сигнал чрез техния

повърхностен FcγRI, генерирайки ефикасен анти-грипен имунен отговор в гостоприемника.

Задачи II:

4. Генериране на генно-инженерна молекула, съдържаща scFv, специфично към човешки FcγRI и носеща вирусен пептиден епитоп от грипен вирус с мишена човешка имунна система
5. Охарактеризиране и *in vitro* изследвания на експресираната генетична молекула
6. Генериране на хуманизиран трансферен модел на човешки тонзиларни клетки в хуманизирани имунодефицитни NSG мишки
7. Проследяване на имунния отговор след имунизация и ре-имунизация с ДНК ваксината и протеиновата реплика в хуманизирани имунодефицитни NSG мишки.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали:

1. Експериментални животни - Balb/c мишки, CR1/2-дефицитни мишки, NSG мишки.
2. Клетъчни линии и антитела.
3. Бактериални щамове.
4. Химерни молекули.
5. Грипен пептид.

Методи:

1. **Генетични методи** – включващи - RT-PCR; PCR; ДНК електрофореза; Рестрикционни методи; Лигазни реакции; Методи за клониране, амплифициране и изолиране на генетичен материал; ДНК-рекомбинантни техники
2. **Експресия на конструирани ДНК химерни молекули**
 - **Експресия в прокариотна система:** химерните ДНК-молекули бяха амплифицирани чрез трансформация на прокариотна компетентна култура
 - **Експресия в еукариотна система:** клетъчната линия CHO беше използвана за трансфекция с химерните ДНК-молекули
3. **Конструирани на протеинови химерни молекули**
4. **Полиакрил-амид гел електрофореза (PAGE) и Western Blotting (WB)**
5. **Флуоцитометричен анализ**
6. **ELISpot анализ за преброяване на анти-IP антитяло-секретиращи клетки**

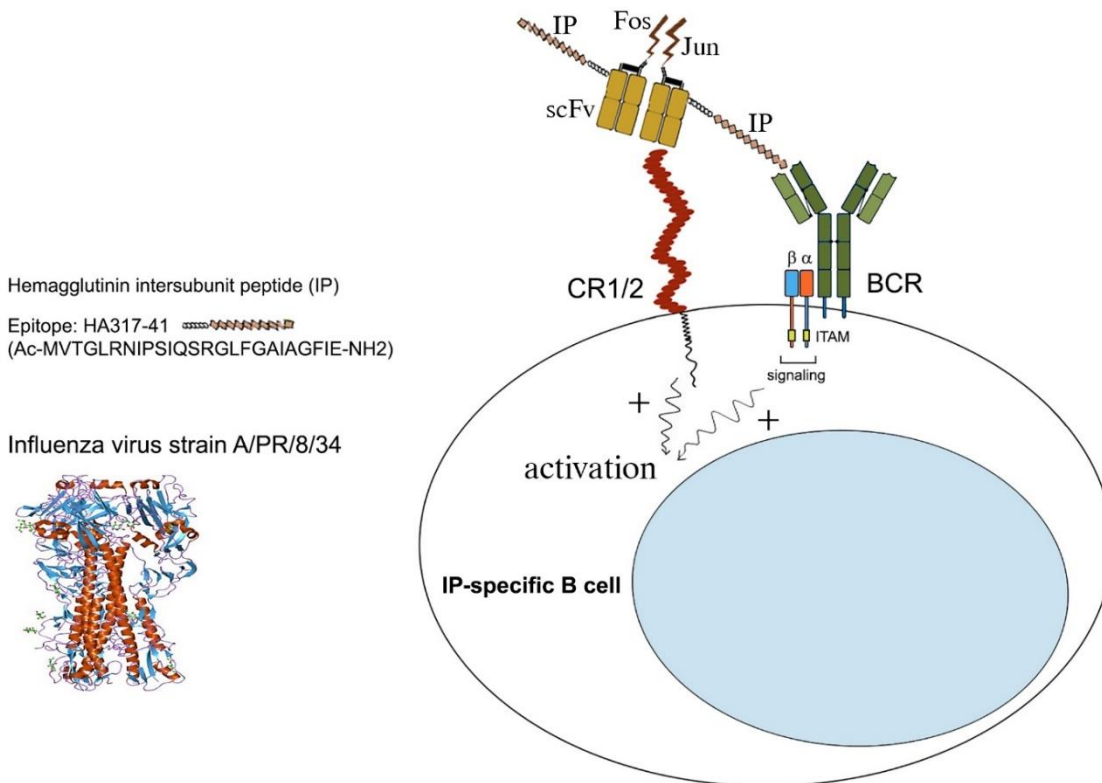
7. Тест за антигенно представяне
8. Сигнална трансдукция
9. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) за анти-IP IgG антитела
10. Тестване за цитокини
11. Тест за цитотоксичност
12. Статистически анализ

РЕЗУЛТАТИ

IV. РЕЗУЛТАТИ – част 1

1. Схематично представяне на работната хипотеза

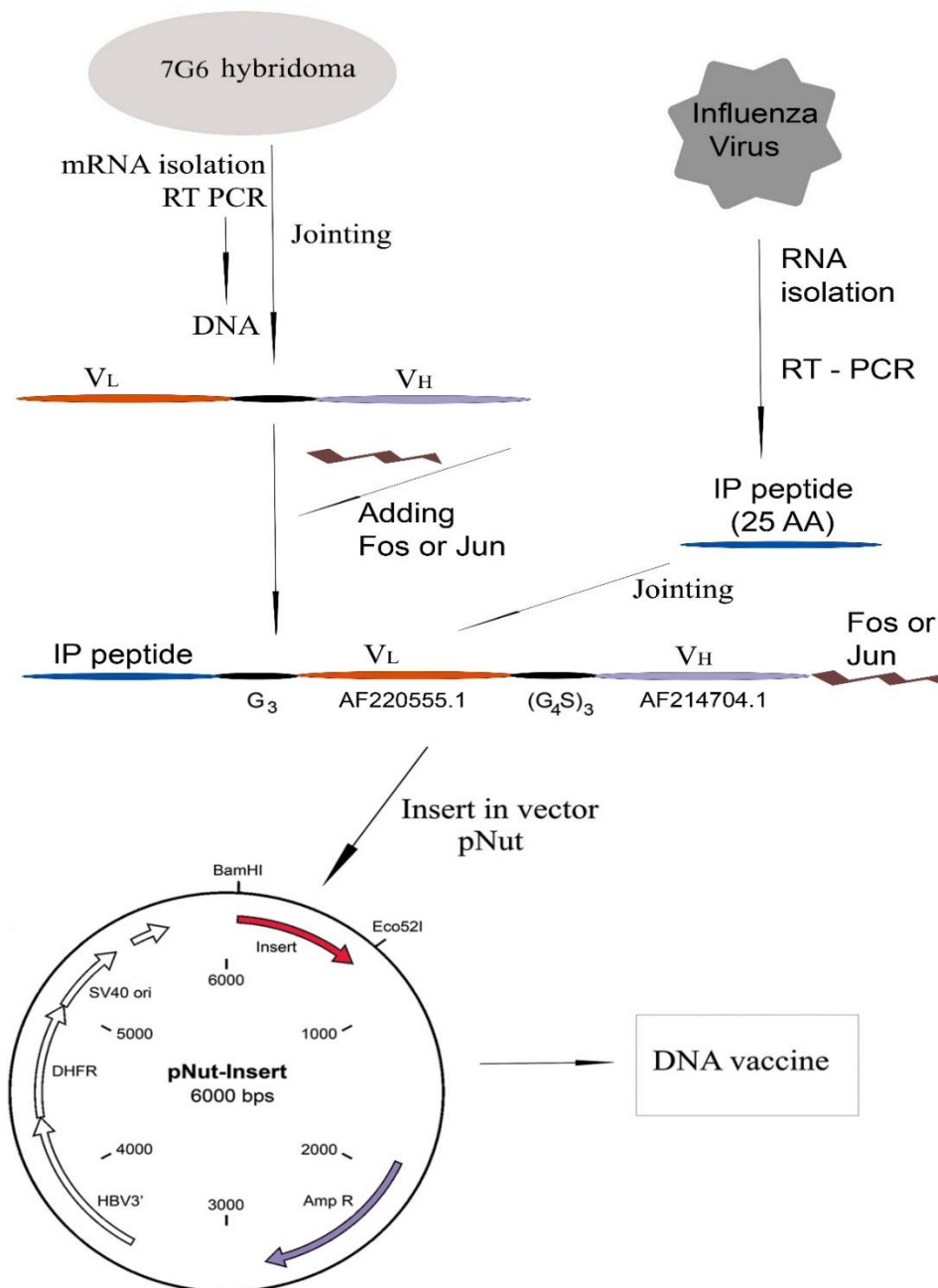
След експресия *in vivo*, генетично конструираните молекули се очаква да се свържат селективно към IP-специфичните В клетки и да проведат силен активационен сигнал чрез техния повърхностен CR1/2, генерирайки ефикасен анти-грипен имунен отговор в гостоприемника (Фиг. 1).



Фигура 1. Свързване на експресираната химерна молекула към CR1/2 и BCR върху IP-специфичните В клетки

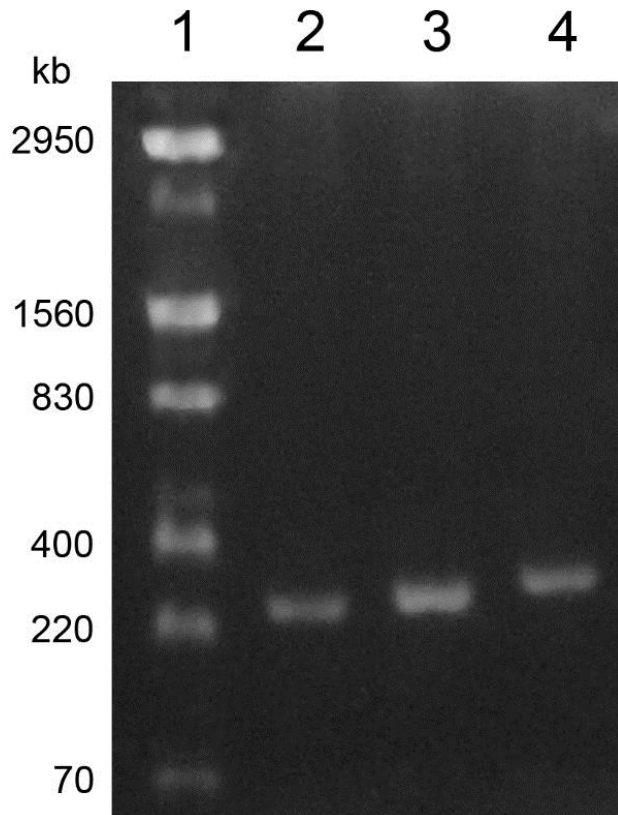
2. Конструкция на рекомбинантни ДНК молекули

Генетичните конструкции носещи вирусния пептид 7G6scFv-Fos/Jun бяха конструирани и въведени в еукариотен експресионен вектор pNut, притежаващ вирусен промотор за експресия на чужд протеин (Фиг. 2).



Фигура 2. Генетично конструиране на рекомбинанти ДНК молекули: общ преглед (за детайли виж в секция Методи).

След амплификация в компетентна прокариотна култура ДНК-химерните молекули бяха пречистени и анализирани посредством ензимна рестрикция (BamHI/Eco52I). Правилните размери на фрагментите бяха показани чрез агарозна електрофореза (Фиг. 3).

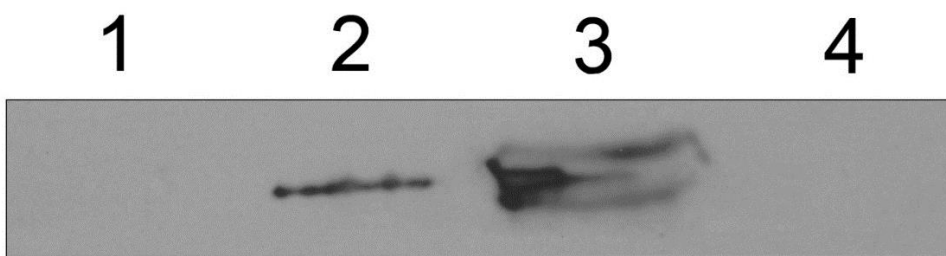


Фигура 3. Рестрикционен анализ на агарозна ДНК електрофореза на вектор pNut, съдържащ различните генетични конструкции. 1 молекулни маркери; 2 – pNut-7G6scFv; 3 - pNut-IP-7G6scFv; 4 - pNut-IP-7G6scFv-Fos.

3. Еукариотна експресия на генетичните конструкции

За да се демонстрира еукариотната експресия на рекомбинантните генетични конструкции IP-7G6scFv-Fos/Jun CHO клетки бяха трансфектирани с вектор-носител pNut

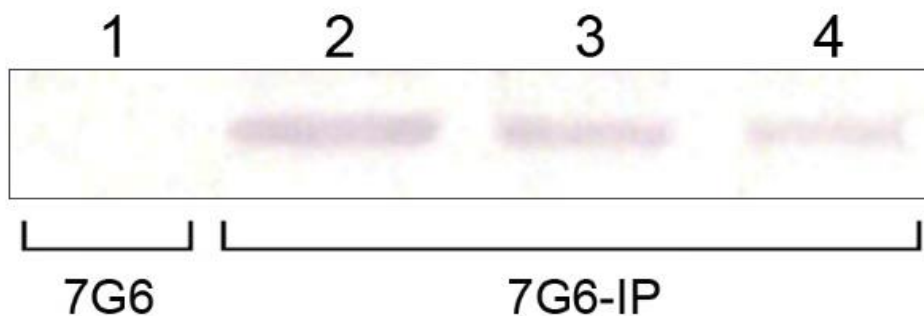
и бяха избрани позитивни клонове. Супернатанти на култивираните трансфектирани СНО клетки бяха концентрирани 10 пъти чрез ултрафилтрация и експресираните фюжън протеини бяха подложени на Western blot анализ (фиг. 4).



Фигура 4. Рекombинантните химерни протеини запазват В-клетъчния епитоп на IP пептида след експресия от СНО клетки. СНО клетки трансфектирани с химерните ДНК конструкции бяха култивирани със селективен маркер, след което супернатантата беше концентрирана. Изолираните и пречистени рекombинантни протеини бяха разделени чрез натриев додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE) и трансферирани върху нитроцелулозна мембрана. Експресираните фюжън протеини бяха инкубирани с анти-IP-специфично моноклонално антитяло IP2-11-1, последвано от инкубиране с козе анти-мише IgG-HRP конюгирано антитяло и проявени чрез ECL. Линия 1 - празен вектор pNut; линия 2 - pNut-IP; линия 3 - pNut-IP-7G6scFv-Fos; линия 4 – нетрансфектирани клетки. Показаните резултати са представителни за три независими експеримента.

4. Конструирание на протеиновите химери

Успешното конструирание на протеиновите химери чрез химическо свързване на грипни пептиди към имуноглобулиновата молекула беше тествано чрез SDS-PAGE и Western blot.

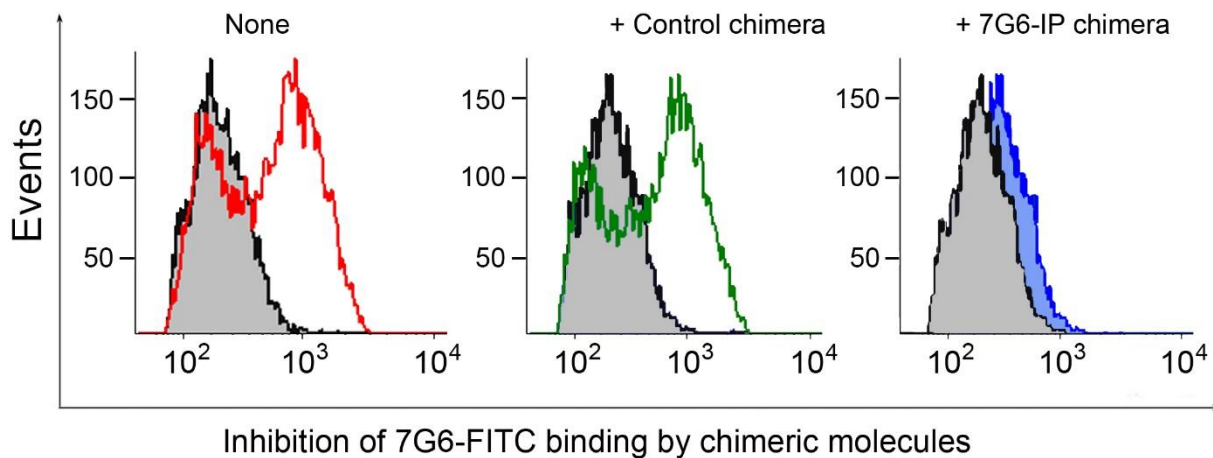


Фигура 5. Протеиновата химерна молекула 7G6–IP запазва своята функционална активност след химическата конюгация. IP пептидите ковалентно-свързани към анти-CR1/2 антителата запазват интактни и достъпни своите епитопи, които се разпознават от анти-IP антитела. Пробите (20 µg, 10 µg и 5 µg) от 7G6–IP химерата (линии 2-4) или неконюгираното антитяло 7G6 (линия 1) бяха подложени на SDS-PAGE и трансферирани на нитроцелулозни мембрани. Мембраните бяха блокирани и инкубирани с мише анти-IP специфично моноклонално антитяло IP2-11-1, последвано от инкубация с анти-мише IgG конюгирано с алкална фосфатаза. Реакцията беше проявена чрез добяване на субстрат NBT/BCIP. Показаните резултати са представителни за три независими експеримента.

Разпознаването на IP пептида от IP-специфичното моноклонално антитяло IP2-11-1 при Western blot анализа потвърждава, че пептидите, свързани с плъше-IgG, запазват своя В-клетъчен епитоп (фиг. 5) и той е достъпен за взаимодействие с IP-специфични В-лимфоцити.

5. Химерата свързва мишия CR1/2

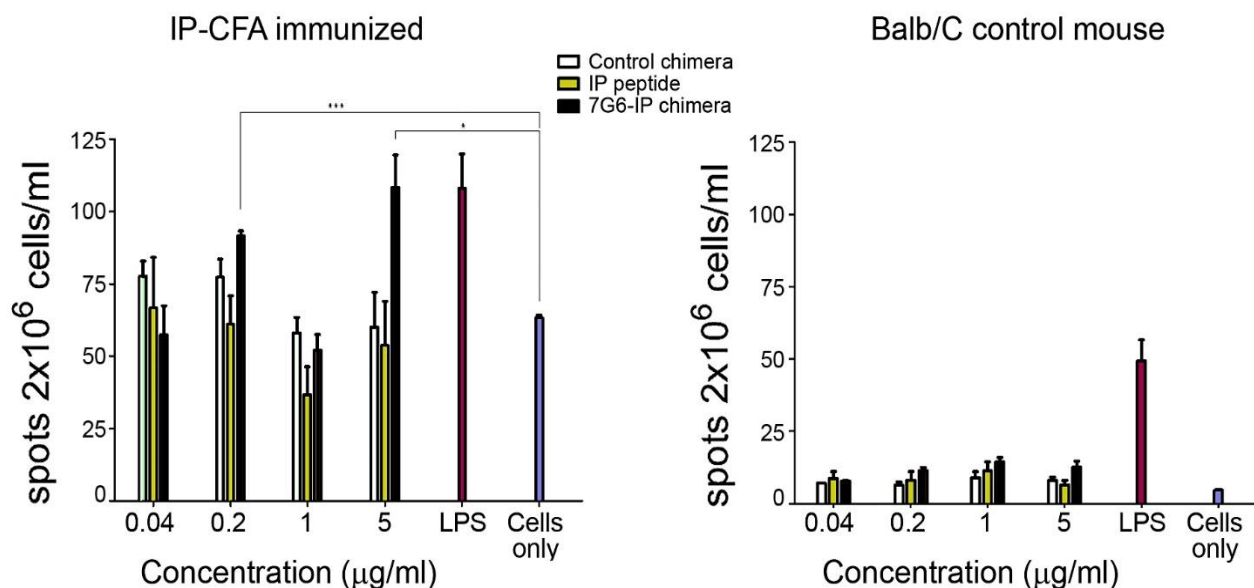
Използвайки проточна цитометрия демонстрирахме способността на 7G6-IP химерата да се свързва към CR1/2 върху миша В лимфомна клетъчна линия експресираща CR1/2 . Ефектът на 7G6-IP химерата беше оценен в конкуренция с FITC-конюгирано анти-CR1/2 антитяло за същия рецептор (фиг. 6).



Фигура 6. 7G6–IP химерата запазва способността си да се свързва към CR1/2 върху миша В лимфомна клетъчна линия ПА1.6 (CR1/2-позитивна) и се конкурира с FITC-конюгирано анти-CR1/2 антитяло за същия рецептор. Показани са резултати от проточна цитометрия. Клетките бяха инкубирани с 7G6–IP химерата или контролната химера, промити и инкубирани с FITC-конюгирано 7G6 антитяло. Показаните резултати са представителни за пет независими експеримента.

6. Анти-IP IgG секретиращите плазматични клетки се повлияват от 7G6-IP химерата

Установихме, че култивирането на спленоцити от IP-CFA - имунизирани мишки в присъствието на 7G6-IP химера води до увеличен брой плазмоцити, продуциращи анти-IP IgG. Нашите данни показаха, че съвместното кръстосано-свързване на BCR и повърхностния CR1/2 върху лимфоцитите, специфични за IP, увеличава производството на антитела (фиг. 7, ляв панел).



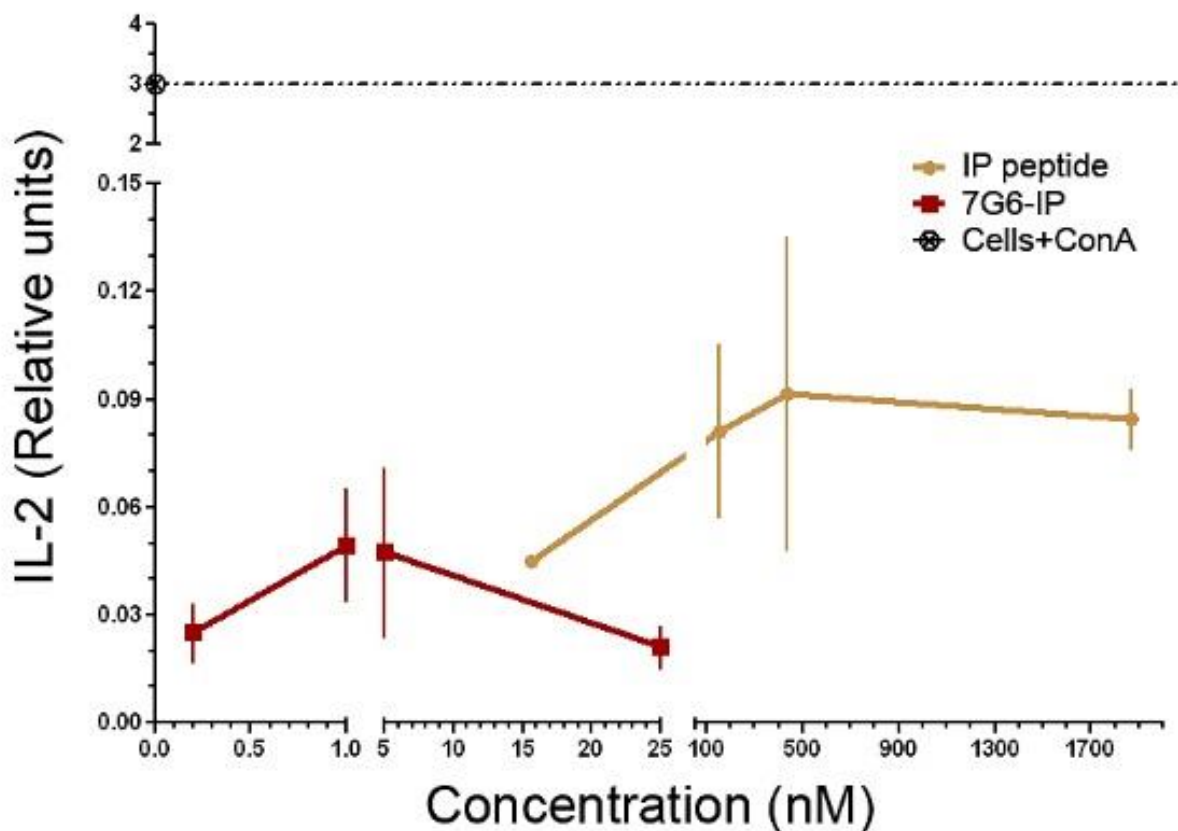
Фигура 7. Едновременното свързване на BCR и CR1/2 върху IP-специфичните В лимфоците стимулира антитяловата продукция. Спленоцити от IP пептид-имунизирани (ляв панел) или нетретирани Balb/C мишки (десен панел) бяха култивирани в присъствието на 7G6-IP химерата или на контролната химера или на свободен IP пептид. Броя на плазматичните клетки, секретиращи анти-IP пептид-специфични IgG антитела беше определен чрез ELISpot анализ. Резултатите са представени като средна +/-SD

стойност от три повторения. Спленоцитите от всяка мишка бяха тествани индивидуално, като броя точки в тестовите ямки беше сравнен с контролните ямки, съдържащи спленоцити, култивирани само със среда. р-стойностите са изчислени с помощта на two-way ANOVA тест (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Данните са представителни за пет независими експеримента.

Най-видимото увеличаване на броя на плазмоцитите, секретиращи IP-специфични IgG антитела се наблюдава след инкубация на спленоцити с 5 $\mu\text{g/ml}$ 7G6-IP химерна молекула. Като контрола проведохме същия експеримент със спленоцити от третиран с PBS животни. Наличието на IP-специфични плазмоцити не беше открито (фиг. 7, десен панел).

7. IP пептидът от 7G6-IP химерата запазва своя Т клетъчен епитоп

Освен В-клетъчен епитоп, IP пептидът включва и I-E^d ограничен Т клетъчен епитоп (HA317–329). Инкубацията на APCs (В клетки) със свободния IP пептид води до активиране на пептид-специфични Т клетки.

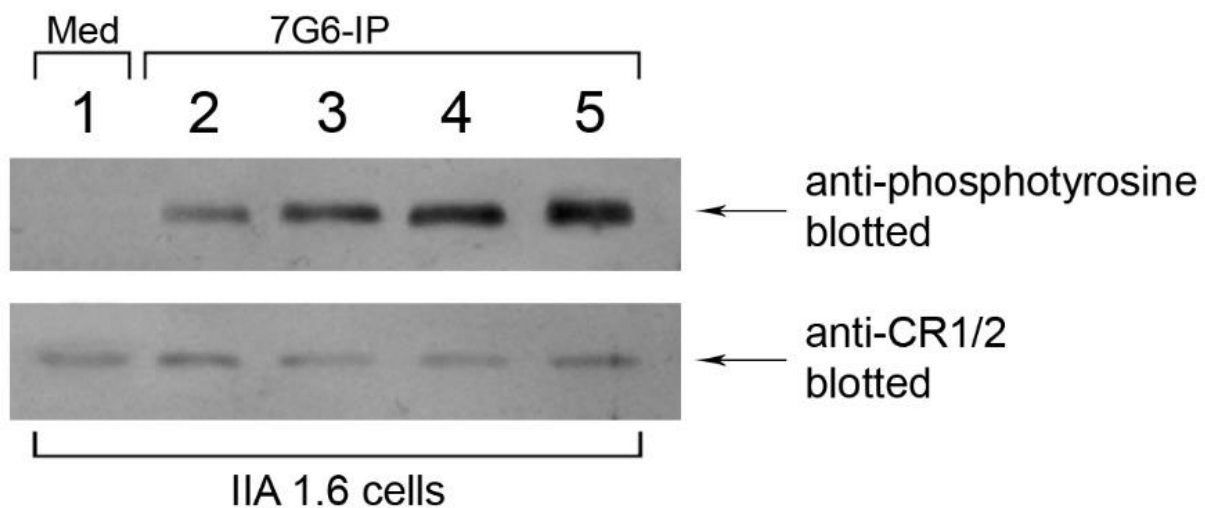


Фигура 8. CR1/2-медирано представяне на IP чрез В лимфоцитите на IP-специфичните Th cells. CD4⁺ Т клетки, изолирани от IP-CFA имунизирани Balb/C мишки бяха инкубирани с пречистени В клетки от нетретираны Balb/C мишки за 24 часа на 37°C в присъствието на различни концентрации от 7G6-IP или свободен IP пептид. Продукцията на IL-2 от Th клетките в културалната супернатанта беше използвана за отчитане на ефикасността на антигенното представяне. Данните са представителни за пет независими експеримента.

Ефективността на антигенното представяне се подобрява чрез насочване на IP пептида към CR1/2, използвайки 7G6-IP химерна молекула (фиг. 8).

8. 7G6-IP химерата индуцира сигнал през CR1/2

Способността на конструираната протеинова химерна молекула да предизвика инициране на клетъчна сигнализация през ко-стимулаторния повърхностен В клетъчен рецептор беше доказана чрез CR1/2 позитвна (FcγRIIb-негативна) В-клетъчна линия. Сигналната трансдукция беше потвърдена от наблюдаваното тирозиново фосфорилиране на рецептора в CR1/2-експресираща В-клетъчна линия след инкубиране с 7G6-IP химерна молекула (фиг. 9).

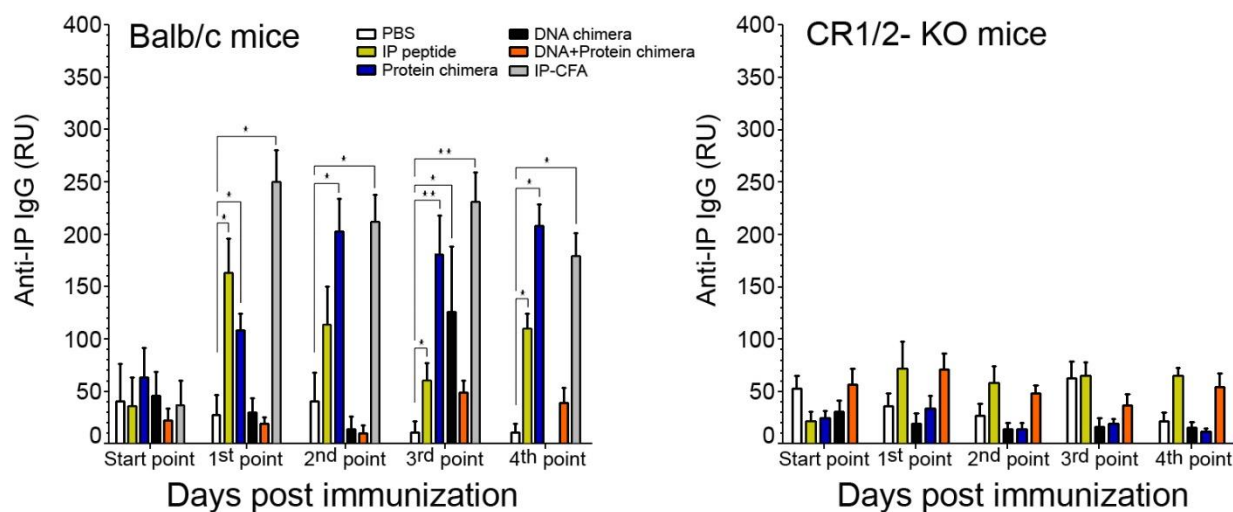


Фигура 9. 7G6-IP химерните молекули иницират сигнална трансдукция през CR1/2. Мишата CR1/2-позитивна В лимфомна клетъчна линия ПA1.6 беше инкубирана в присъствието на 7G6-IP химерата на 37 °C за 10, 5, 2 или 0 мин. Клетки, култивирани само в среда бяха използвани като контроли. Клетките бяха лизирани, подложени на

имуно-преципитация чрез анти-CR1/2 антители, последвана от western блот с анти-фосфотирозиново антители (горен панел) или с анти-CR1/2 (7G6) антители (долен панел). Данните са представителни за три независими експеримента.

9. Генериране на анти-IP антитела

Кръвните проби бяха събрани чрез ретро-орбитална пункция и мишите серуми бяха тествани за IgG анти-IP антитела чрез ELISA. Серумите, получени в края на експеримента (ден 90), също бяха тествани и бяха регистрирани значителни разлики между групите. Balb/C групата, третирана със 7G6-IP, произвежда високи нива на анти-IP антитела след втората имунизация и по-нататък достига нивото, регистрирано в Balb/C група, инжектирана с IP + CFA (фиг. 10, ляв панел).



Фигура 10. Имунизацията с протеиновата химера 7G6-IP индуцира хуморален имунен отговор в Balb/C мишки. Представени са титри на анти-IP IgG антитела в мишки, инжектирани с PBS или с 50 µg от pNut-IP-7G6scFv (i.m.) или с 20 µg IP пептид, или с 20 µg IP пептид в CFA, или с 20 µg 7G6-IP (i.p.). Резултатите са представени като относителни единици (Relative Units, RU). Те са изчислени чрез използването на стандартно IgG антители срещу IP. Титрите, получени от стандартните разреждания бяха използвани за построяването на крива от 0 до 400.0 RU. Резултатите са представени като RU, получени от индивидуалните серуми, събрани преди всяка имунизация и 3 седмици след последната такава. Всяка точка на x-линията индикира инжектиране, както е описано

в секция мат. и методи. Резултатите са представени като средна $\pm$ SEM стойност; р-стойностите са изчислени с помощта на Mann-Whitney U тест (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$), сравнени с PBS- третираните контроли.

Balb/C групата, имунизирана с IP произвежда умерени нива на IgG антитела след първата и втората имунизация, докато в групата, ваксинирана с pNut-IP-7G6scFv-Fos/Jun IgG нивата на антитела се повишават 5 седмици след втората ДНК имунизация и не се откриват в крайната точка на наблюдение. Индукция на IgG анти-IP антитела не се наблюдава в групата на Balb/C, имунизирана с pNut-IP-7G6scFv-Fos/Jun + 7G6-IP.

Не бяха открити анти-IP IgG антитела в серумите на C57/B6 CR1/2 KO мишки, инжектирани или с ДНК химерни молекули, или с протеин-инженерна конструкция (Фиг. 10, десен панел).

10. Цитокинов профил

Нивата на IL4, IL10 и IFN- γ бяха измерени в миши серуми след имунизация с различните конструкции, използвайки ELISA китове. Th1 цитокинът IFN- γ е важен за ефективния клетъчен имунен отговор след ваксинация (включително ДНК ваксинация) и високите нива в миши серум корелират с генерирането на антиген-специфични IFN- γ – продуциращи CD8⁺ клетки (фиг. 11).

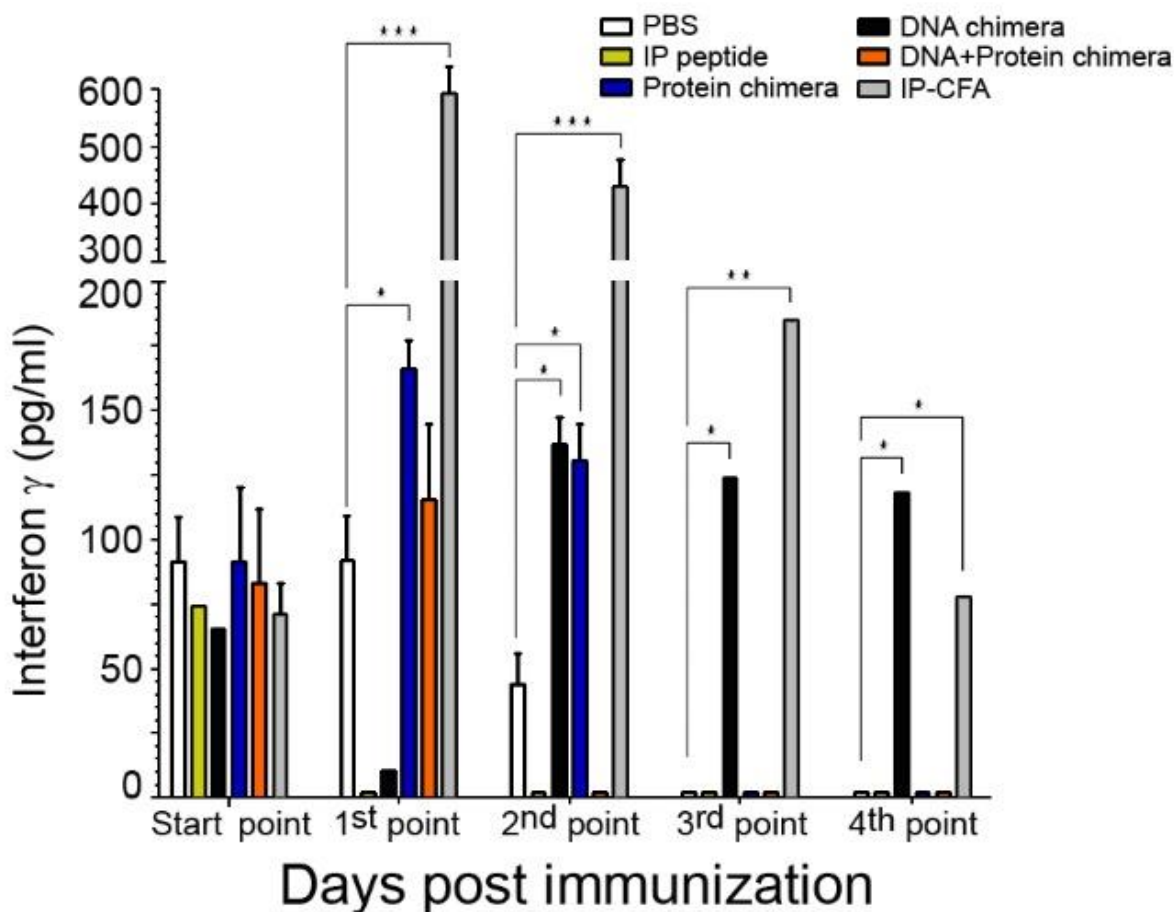
Както се очакваше, групите Balb/C мишки, третирани с pNut-IP-7G6scFv-Fos/Jun, произвеждат високи серумни нива на IFN- γ само след двойна ДНК имунизация в сравнение с инжектираните с PBS мишки, докато мишки, третирани със 7G6-IP, произвеждат високи нива на IFN- γ , започвайки от първата имунизация.

Реимунизацията с 7G6-IP в група В значително намалява производството на IFN- γ в сравнение с група А.

Не бяха наблюдавани значителни разлики в производството на IL-4 и IL-10 между групите животни, имунизирани с ДНК и/или протеинови химерни молекули и мишки, третирани с PBS.

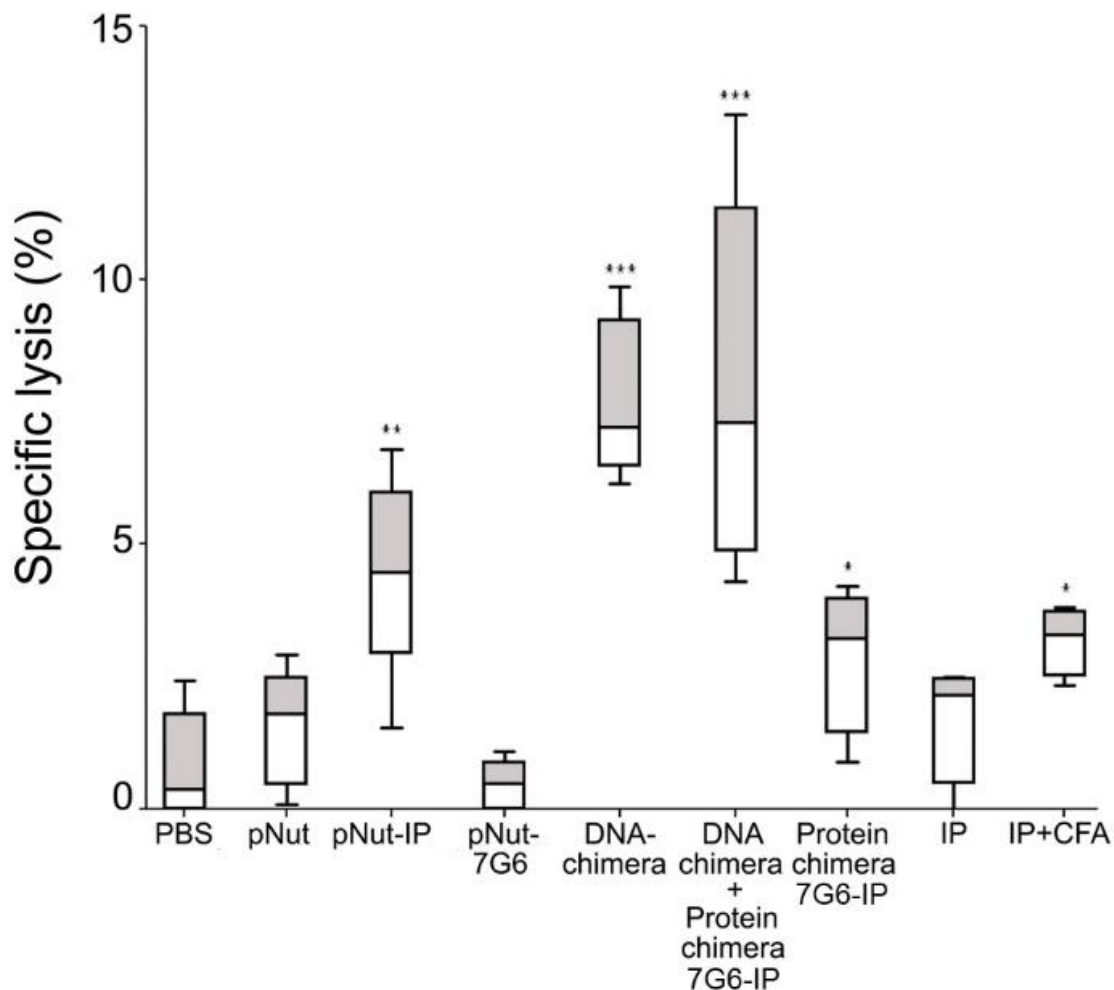
11. Генериране на цитотоксични Т клетки

Беше проучена CTL активността на изолирани клетки от слезки при всички животни срещу заразени с грип 3T3 клетки 2 седмици след последната имунизация на всяка група. Имунизацията със 7G6-IP, IP самостоятелно или IP + CFA предизвиква ниска цитотоксична активност, докато pNut-IP дава умерен резултат (фиг. 12).



Фигура 11. ДНК имунизацията с pNut-IP-7G6scFv индуцира продукция на IFN- γ в третираните мишки. Серумните нива на IFN- γ в Balb/c мишки, третирани както е описано във фиг. 23 бяха измерени чрез сандвичева ELISA. Резултатите са представени като средна $\pm$ SEM стойност от 6 – 8 мишки в група; p стойностите са изчислени в сравнение с PBS-третираните контроли използвайки Mann-Whitney U тест (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001)

Цитотоксичната активност в имунизираните групи pNut-IP-7G6scFv-Fos/Jun и pNut-IP-7G6scFv-Fos/Jun + 7G6-IP е значително по-висока в сравнение с другите третирани групи.

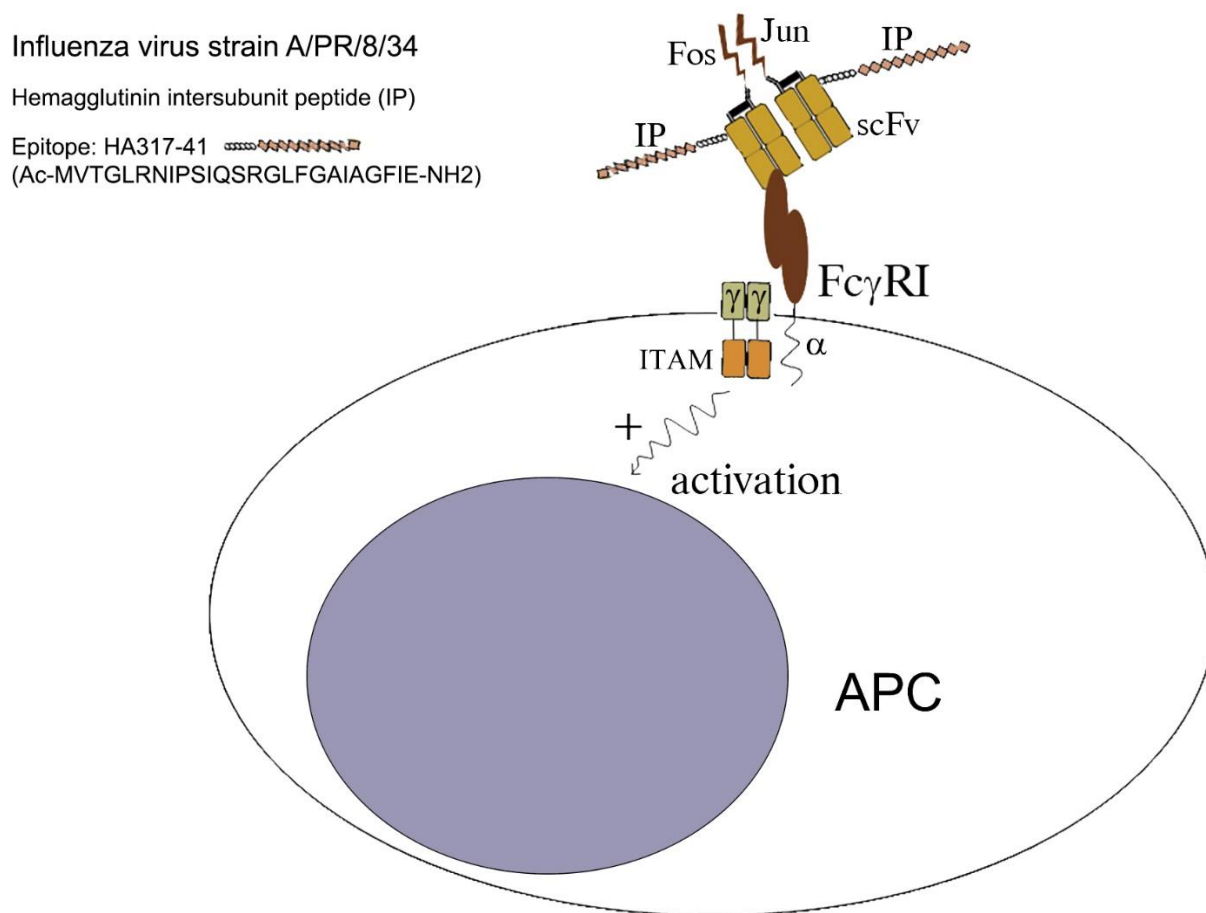


Фигура 12. CTL активност на спленцити изолирани на ден 30 след последната имунизация. 3Т3 клетки инфективни с грипния вирус бяха култивирани с ефекторни спленцити в съотношение 1:40 за 4 часа на 37 °C. Концентрацията на LDH в супернатантите беше установена в триплицирани проби чрез търговски CytoTox анализ. Резултатите са представени като средна $\pm$ SEM стойност сравнявайки имунизираните и PBS-третираните мишки използвайки Mann-Whitney U тест (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001). Данните са представителни за три независими експеримента.

IV.РЕЗУЛТАТИ – част 2

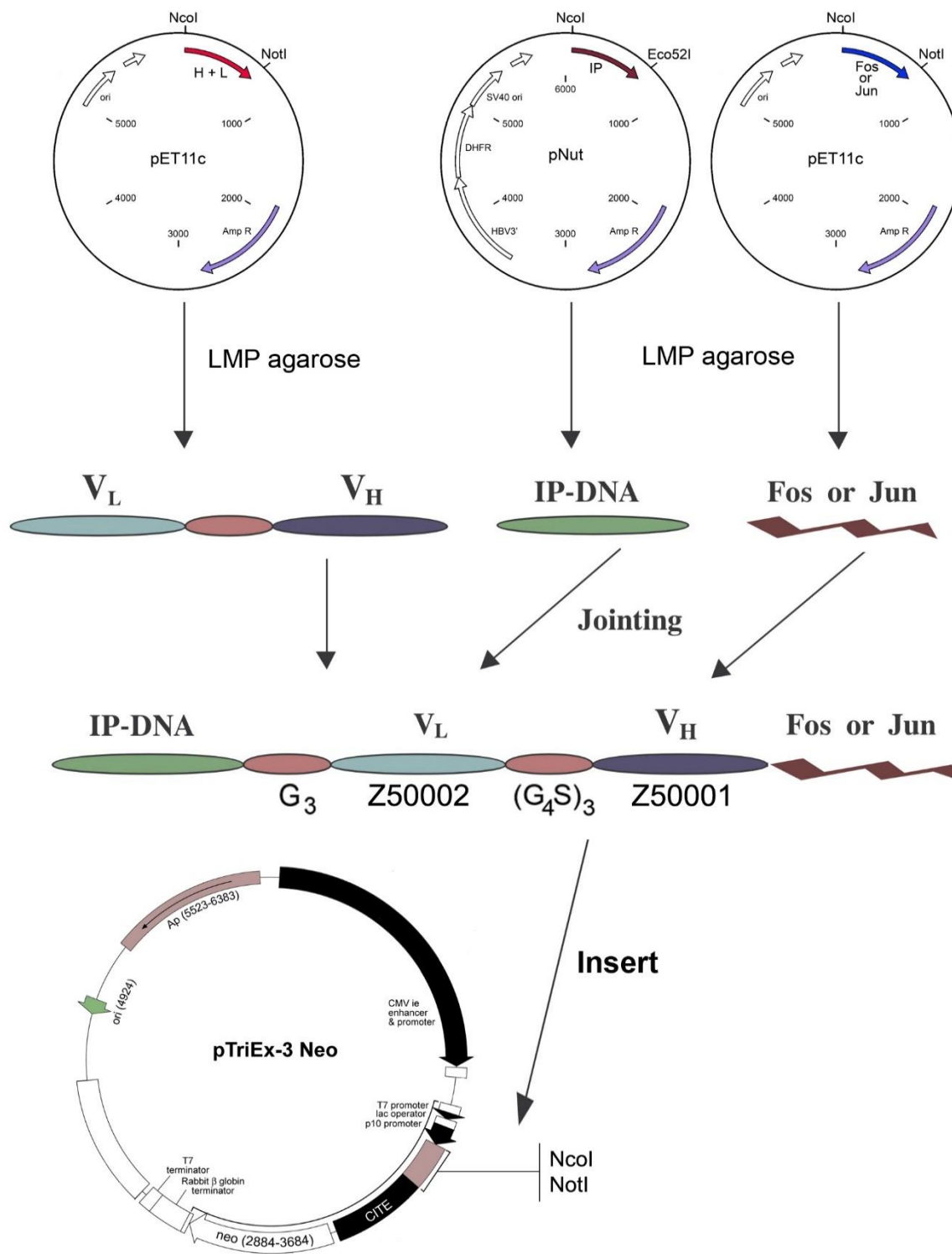
1. Схематично представяне на работната хипотеза

След експресия *in vivo*, генетично конструираните молекули се очаква да се свържат селективно към APCs и да проведат силен активационен сигнал чрез техния повърхностен FcγRI, генерирайки ефикасен анти-грипен имунен отговор в гостоприемника (Фиг. 13).



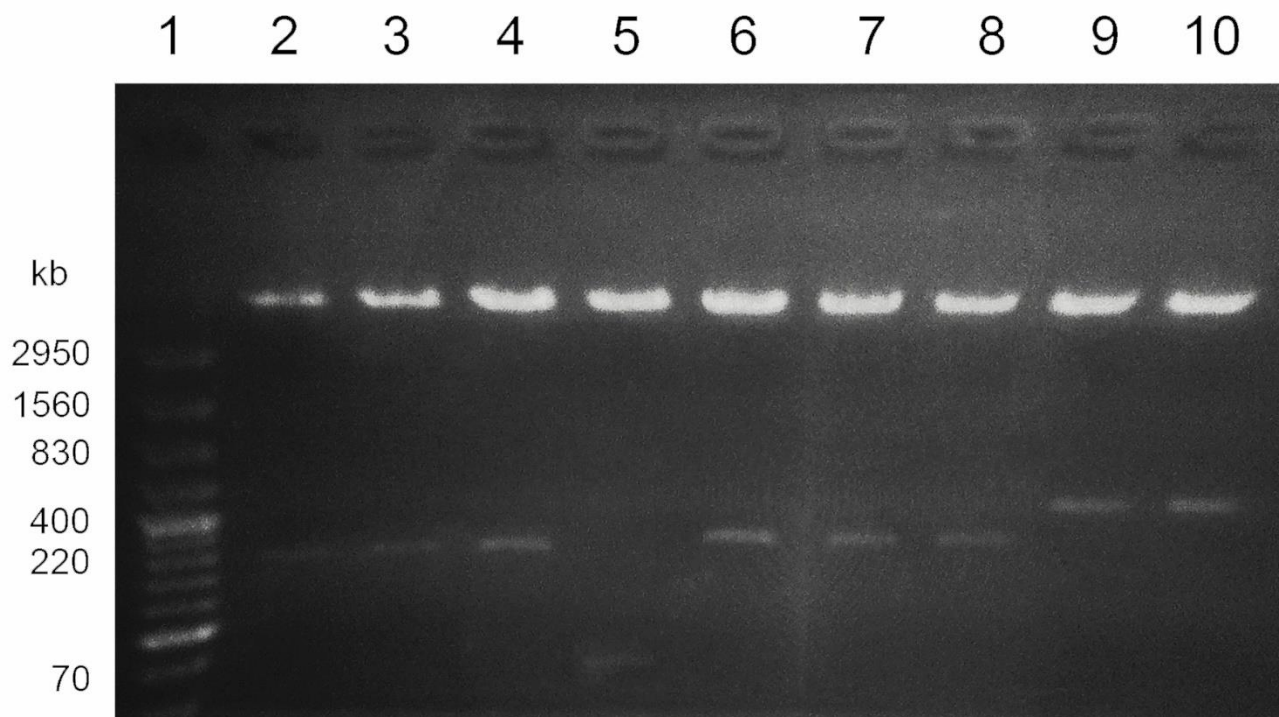
Фигура 13. Свързване на експресираната химерна молекула към FcγRI върху антиген-представящите клетки (APC)

2. Конструкция и анализ на рекомбинантни ДНК молекули



Фигура 14. Генетично конструиране на рекомбинанти ДНК молекули: общ преглед (за детайли виж в секция Методи).

Генетичните конструкции pTriEx-L-sc22-IP-Jun, pTriEx-L-sc22-IP3-Fos, pTriEx-L-sc22 и pTriExL-IP бяха конструирани и въведени в еукариотен експресионен вектор pTriEx, съдържащ CMV промотор за кодирана протеинова експресия. Схематичното конструиране на ДНК химерните молекули е представено на фиг. 14. Получените ДНК химерни молекули бяха амплифицирани в компетентна прокариотна клетъчна култура чрез селекция с ампицилин, след което бях изолирани, пречистени и анализирани посредством ензимна рестрикция (NcoI/ NotI). Правилните размери на инсертите бяха потвърдени чрез агарозна електрофореза (фиг. 15). Количеството ДНК от цялата рестриктазна реакция (10 µl) беше нанесено в 1.2 % агарозен гел.

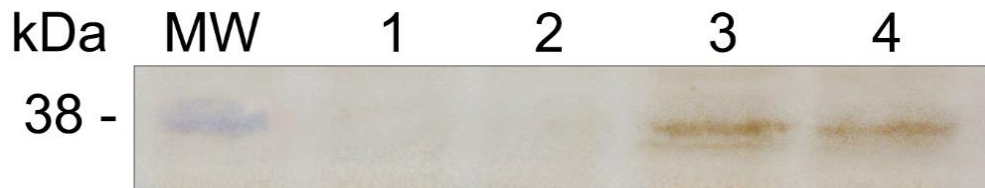


Фигура 15. Рестрикционен анализ на агарозна ДНК електрофореза на вектор pTriEx, съдържащ различните генетични конструкции. 1 молекулни маркери; 2 – 4 pTriEx-L-sc-22; 5 pTriEx-L-IP; 6 – 8 pTriEx-L-sc-22-IP-JUN; 9 – 10 pTriEx-L-sc-22-IP3-FOS

Положително трансформирани клонове бяха съхранени в глицерол на -70°C . Няколко клона бяха секвенирани и идентифицирани, използвайки T7 и T7 терминиращи праймери, за да се изключи PCR медирана мутагенеза. Резултатът потвърди правилното въвеждане и интактност на генерираните конструкции.

3. Експресираните рекомбинантни протеини запазват В-клетъчния си епитоп

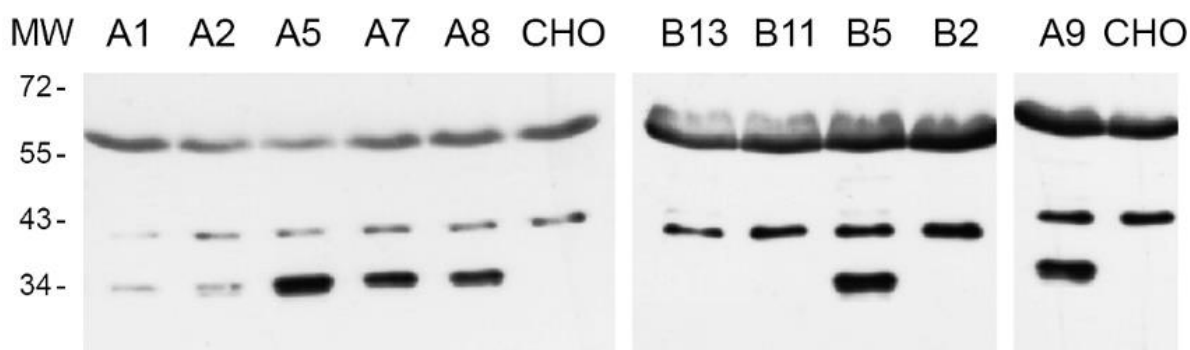
СНО клетките, трансфектирани с различните pTriEx конструкции, бяха селектирани с генетицин, а експресираните рекомбинантни протеини пречистени чрез Ni-афинитетна хроматография и концентрирани чрез ултрафилтрация. IP-епитопите от фюжън протеините бяха разпознати от IP-специфичното антитяло IP2-11-1, което беше потвърдено с Western blot анализ и достъпни за взаимодействие с IP-специфични В лимфоцити (Фиг. 16).



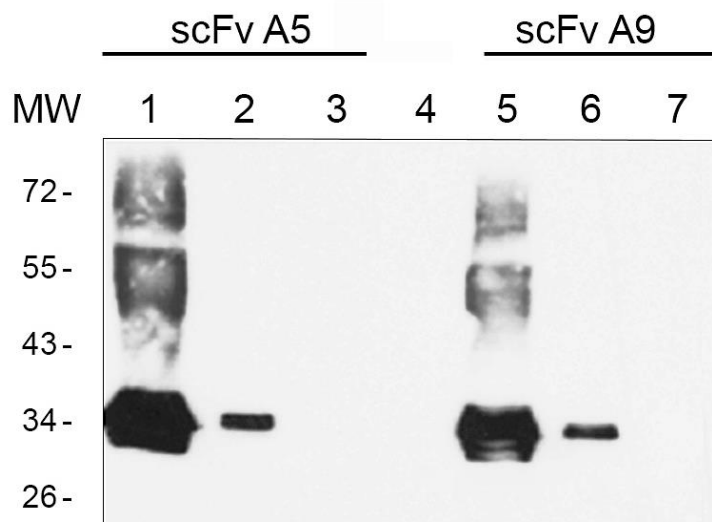
Фигура 16. Разпознаване на IP епитопа. Фюжън протеините запазват В-клетъчния епитоп на IP пептида след експресия. СНО клетки трансфектирани с химерните ДНК конструкции бяха култивирани със селективен маркер, след което супернатантата беше концентрирана. Изолираните и пречистени рекомбинантни протеини бяха разделени чрез натриев додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE) и трансферирани върху нитроцелулозна мембрана. Експресираните фюжън протеини бяха инкубирани с анти-IP-специфично моноклонално антитяло IP2-11-1, последвано от инкубиране с анти-мише IgG-AP конюгирано антитяло и проявени чрез NBT/BCIP. Линия 1, празен вектор pTriEx, линия 2, pTriEx sc22, линия 3, pTriEx-sc22-IP-Jun, линия 4, pTriEx -sc22-IP3-Fos. Бяха използвани Full-range Rainbow Molecular Weight Markers, за да бъдат определени размерите. Показаните резултати са представителни за три независими експеримента.

4. Мащабна еукариотна експресия на генетичните конструкции

CHO клетките бяха трансфектирани или с генетичните конструкции pTriEx-L-sc22-IP-Jun и pTriEx-L-sc22-IP3-Fos, или с контролен празен вектор. Трансфектираните клетки бяха инкубирани в CHO клетъчна среда и успешно трансфектираните клонове бяха селектирани чрез постепенно добавяне на увеличавано количество селективен маркер G418. Селектираните клонове бяха култивирани в CL 350 CELLline система за мащабна продукция (фиг. 17). Експресираните фузионни протеини в супернатантата бяха пречистени чрез Ni-афинитетна хроматография и в последствие концентрирани чрез ултрафилтрация.



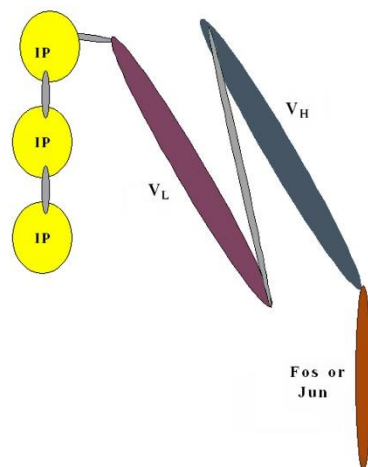
Фигура 17. Western blot анализ на трансфектирани позитивни клонове след селектиране с G418 преди избор на крайни продуценти.



Фигура 18. Машабно произведен фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos. Експресираните протеинови химери pTriEx-L-sc22-IP-Jun/pTriEx-L-sc22-IP3-Fos от позитивни клонове A5 и A9 бяха подложени на SDS-PAGE електрофореза и анализирани чрез Western blot анализ. Получените елуирани фракции – преминалата, промиващата и фюжън протеиновата (10 µg/ямка) бяха нанесени на 12% SDS-PAGE електрофореза и трансферирани на PVDF мембрани. Мембраните бяха блокирани и инкубирани с анти-His-Tag антитяло, конюгирано с HRP, след което проявени чрез усилена хемилуминисценция (ECL). Линия 1, A5 елуирана фракция; линия 2, A5 преминала фракция; линия 3, A5 фракция при промиване; линия 4, нетрансфектирани CHO клетки; линия 5, A9 елуирана фракция; линия 6, A9 преминала фракция; линия 7, A9 фракция при промивка. Показаните резултати са представителни за три независими експеримента.

Пречистените рекомбинантни протеини бяха подложени на SDS-PAGE и анализирани чрез Western blot. Няколко позитивни клона бяха потвърдени за самостоятелната форма на фюжън протеина, както и бивалентния (Fos/Jun) конструктор (Фиг. 18).

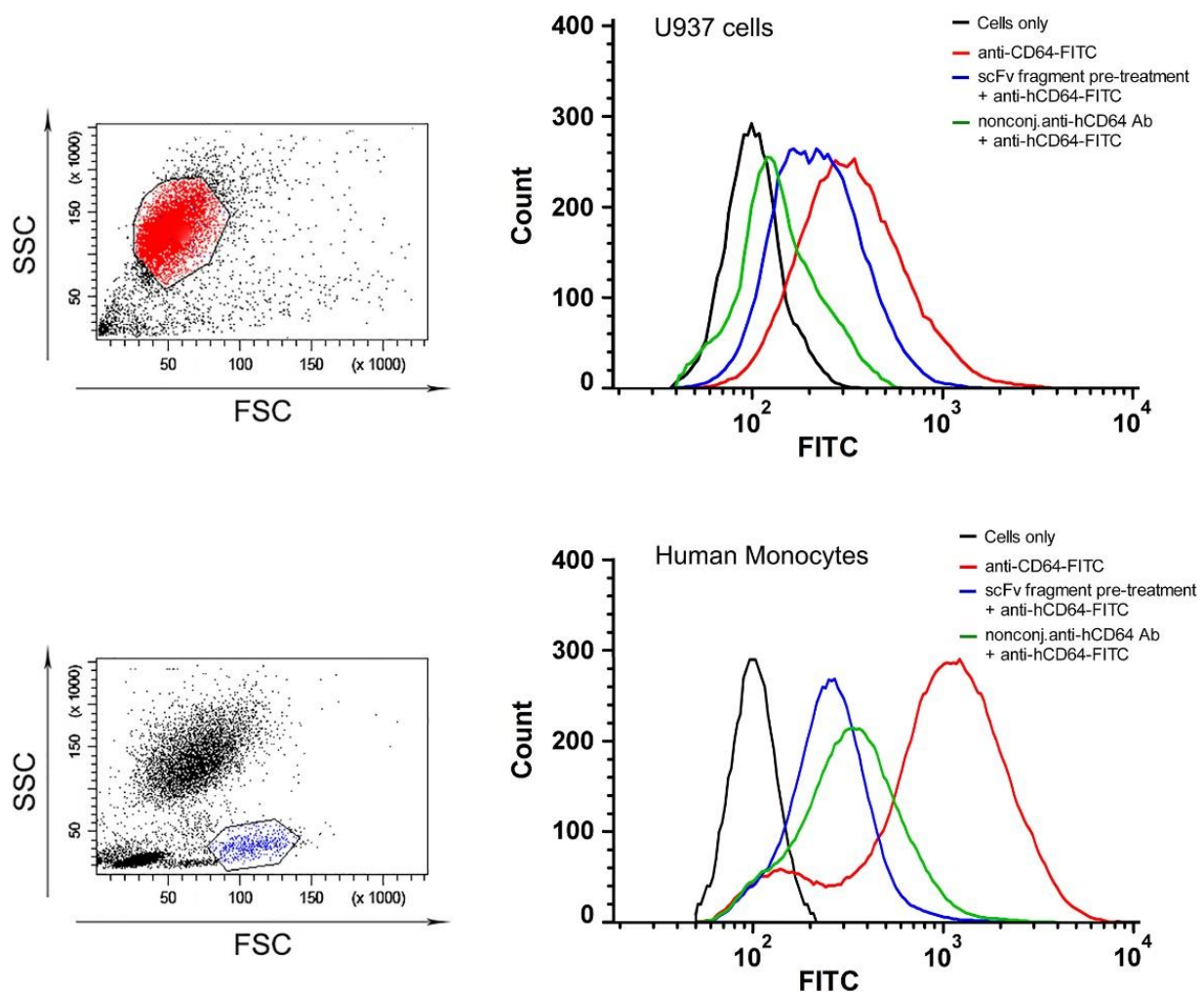
Предполагаемият схематичният вид на продуцираният протеин е представен на фигура 19.



Фигура 19. Структура на едновалентната протеинова химерна молекула след експресия на ДНК-химерата.

5. Експресираният фюжън протеин свързва човешкия FcγRI

Способността на sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos рекомбинантните протеини да свържат FcγRI беше демонстрирана чрез проточна цитометрия. Специфичността на химерните молекули беше доказана на FcγRI-експресираща човешка лимфомна клетъчна линия U937 (Фиг. 20, горен панел) или на CD14-позитивни моноцити/макрофаги (Фиг. 20, долен панел) при конкурентно инхибиране с FITC-конюгирано анти-човешко CD64 антители за същия рецептор. Химерата sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos запази антиген-свързващата си активност и предотврати свързването на търговското FITC-белязано анти-човешко CD64 антители при двата експеримента.

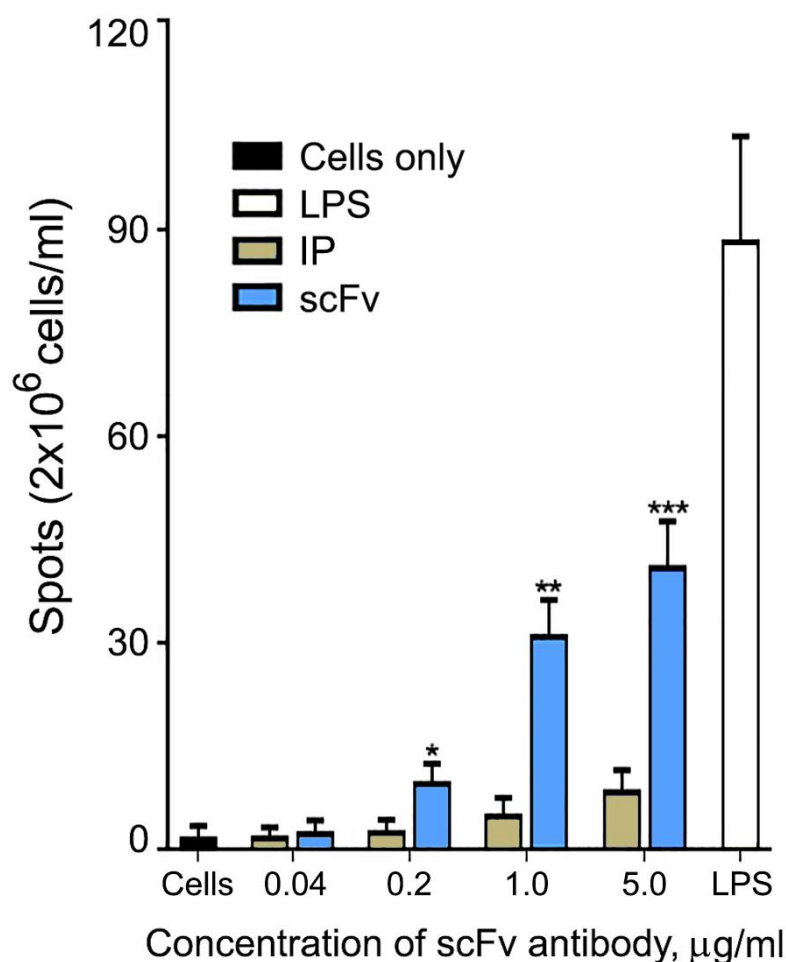


Фигура 20. Експресираните фюжън протеини sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos запазват способността си да свързват FcγRI и да се конкурират с анти- FcγRI антители, конюгирано с FITC, специфично към същия рецептор. Показани са резултатите от проточната цитометрия. FcγRI-експресираща лимфомна човешка линия U937(горен панел) или

изолирани мононуклеарни клетки от периферна кръв от здрави донори (долен панел) бяха инкубирани с sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, последвано от инкубиране с FITC-конюгирано анти-FcγRI антители. Показаните резултати са представителни за пет независими експеримента.

6. Експресираният фюжън протеин оказва въздействие върху анти-IP IgG секретиращите плазмени клетки

Култивиране на ТМС в присъствието на химерните молекули sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos доведе до повишено образуване на антитела от анти-IP IgG секретиращите плазмени клетки (Фиг. 21).



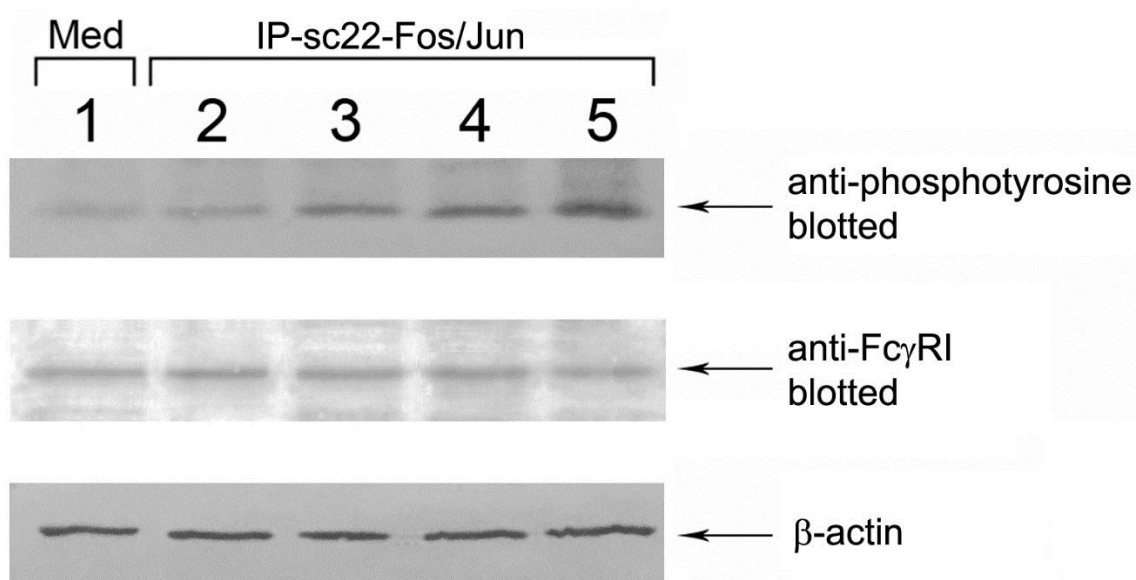
Фигура 21. Свързването на FcγRI на APC от фюжън протеина sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos индуцира активацията на В-клетката. ТМС изолирани от здрави донори бяха култивирани

в присъствието на нарастващи концентрации на sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos фюжън протеина или свободен IP пептид. Беше определен броя на плазмените клетки, секретирани анти-IP пептид-специфични антитела чрез ELISpot анализ. Броят на точките в тестовите ямки беше сравнен с контролните ямки, съдържащи спленоцити, култивирани единствено в клетъчна среда. Резултатите са представени като средна $\pm$ SD стойност от три повторения. ТМС от всеки донор бяха тествани индивидуално. р-стойностите са изчислени с помощта на two-way ANOVA тест (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Данните са представителни за пет независими експеримента.

Беше наблюдавано значително увеличаване на броя на плазмените клетки, секретирани антитела със същата специфичност след инкубиране на ТМС с 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$ фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos в сравнение с клетките, инкубирани единствено с IP пептид. Не беше установено наличие на IP-специфични плазмоцити при клетки, култивирани единствено със среда за култивиране.

7. sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos фюжън протеините индуцират сигнал през Fc γ RI

Способността на експресирания протеинова химерна молекула да предизвика сигнал през ко-стимулаторния повърхностен рецептор Fc γ RI беше доказана чрез човешката лимфмна линия U937.

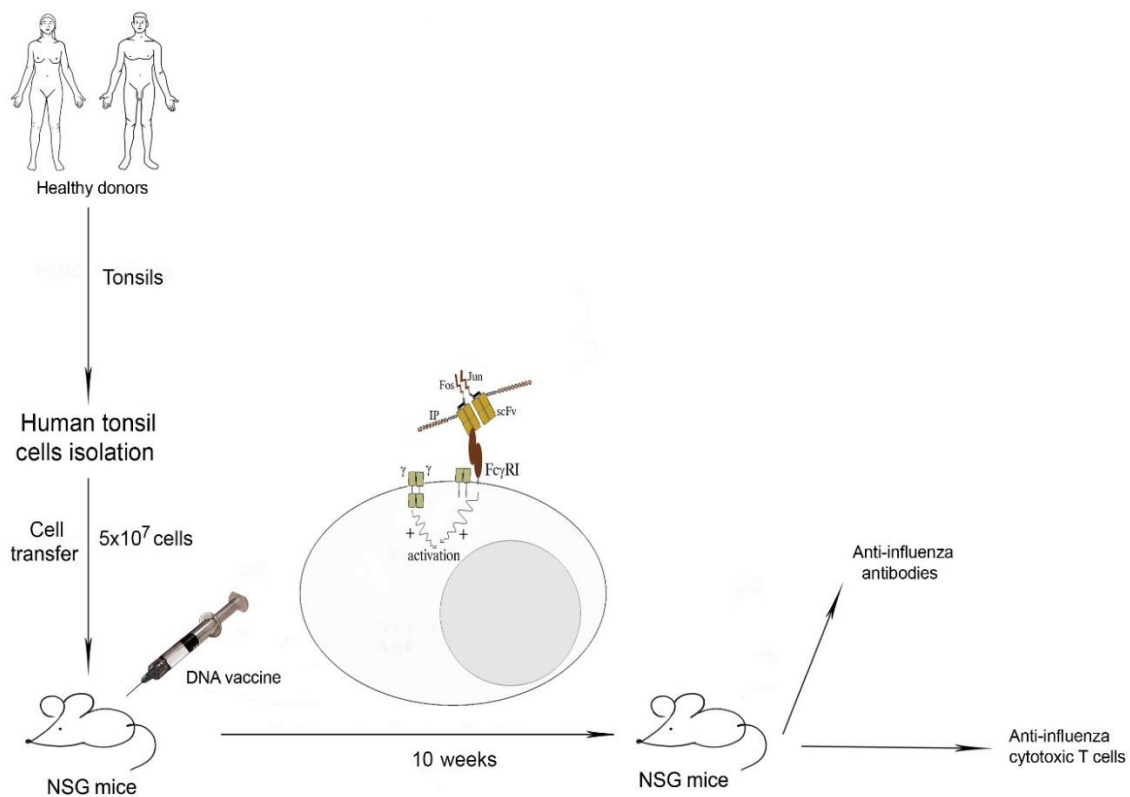


Фигура 22. Свързването на FcγRI на APC от фюжън протеина sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos води до сигнална трансдукция през FcγRI. Изолираните човешки клетки от сливици бяха инкубирани в присъствието на sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos фюжън протеин при 37 °C за 0, 2, 5 или 10 мин. Клетките, култивирани само в среда бяха използвани като контроли. Клетките бяха лизирани и центрофугирани, а супернатантите бяха подложени на имунопреципитация с анти-FcγRI антитяло, последвано от Western blot с анти-фосфотирозин антитяло (горен панел) или с анти-FcγRI антитяло (среден панел). Western blot мембраните бяха проявени чрез усилена хемилуминесценция. За нормализиране, мембраната беше повторно инкубирана с антитяло срещу β-актин (най-долния панел). Линия 1, нетретираните клетки; линия 2, sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos (0 мин); линия 3, sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos (2 мин), линия 4, sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos (5 минути); линия 5, sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos (10 min). Показаните данни са представителни за три независими експеримента.

Фосфорилираният мотив беше установен посредством антитяло срещу фосфорилираната молекула phospho-Тур, която участва във вътреклетъчната сигнализация. ТМС бяха инкубирани за различни интервали от време в присъствието на фюжън протеините, последвано от имунопреципитация на FcγRI комплекса. Както е показано на фиг. 22, беше установена силна фосфорилация на тирозин в пряка зависимост от времето след инкубиране на ТМС със sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos. При нетретираните клетки беше наблюдавана слаба фосфорилация на тирозин.

8. Генериране на хуманизиран NSG миши модел за изследване на новите химерните молекули

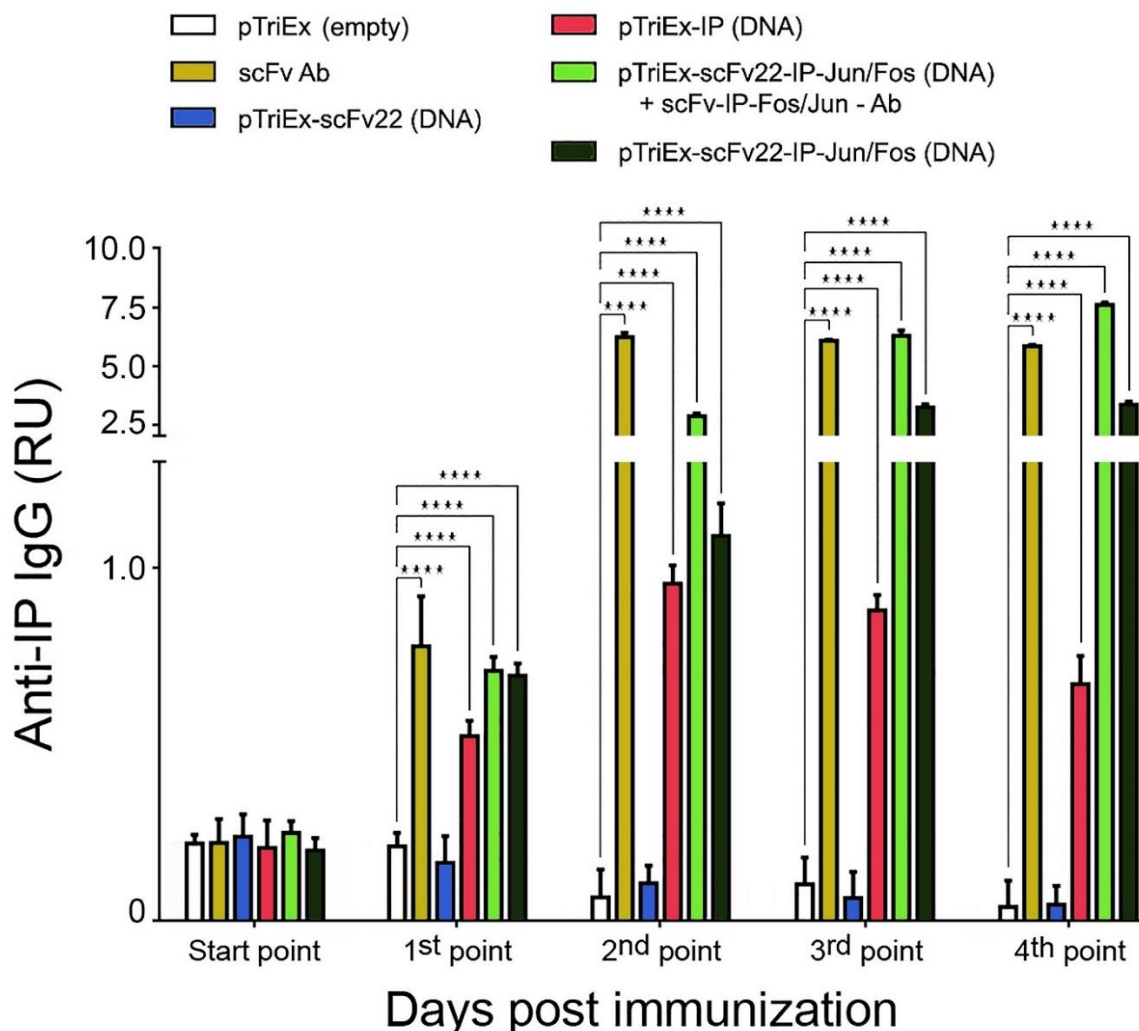
Ефектът на генерираните химерни молекули беше изследван *in vivo* в хуманизирани женски NSG мишки. За хуманизиране на 48 NSG мишки бяха използвани ТМС, изолирани от IP-позитивни здрави донори. Схематично експеримента и етапите в него са представени на фиг. 23.



Фигура 23. Схематично представяне на процеса на хуманизиране и третирането на експерименталните животни с генерираните химерни молекули

9. Секретиране на анти-IP антителя в хуманизираните мишки

Животните бяха третираны както е описано в секцията Материали и методи.



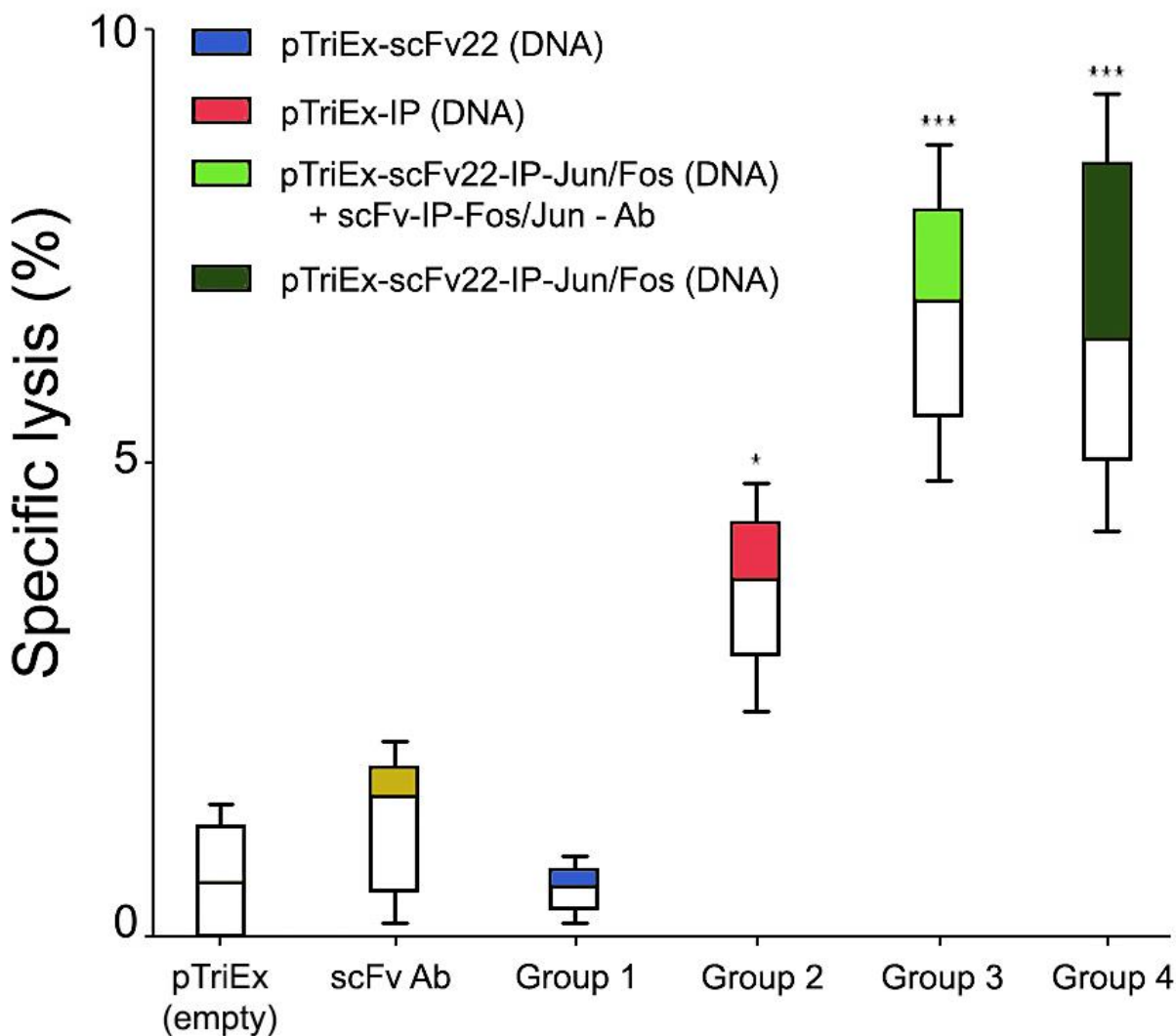
Фигура 24. Имунизация с pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos и реимунизация с експресиран фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos индуцира хуморален имунен отговор в хуманизирани NSG мишки. Титърът на анти-IP IgG антителата при мишки, инжектирани с празен вектор pTriEx, или с pTriExsc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, или с pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, реимунизирани с експресиран фюжън протеин или имунизирани с експресиран фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, или с pTriEx-IP, или с pTriEx-sc22 беше определен с ELISA. Резултатите са представени като относителни единици (RU), изчислени с помощта на стандартни IgG антитела срещу IP. Титрите, получени от разрежданията на стандарта, бяха използвани за създаване на крива от 0 до 100.0 RU. Резултатите са изразени като RU, получени от индивидуалните серуми, събрани преди имунизацията, по време и 2 седмици след последната имунизация. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD от три повторения. р-стойностите бяха изчислени посредством two-way ANOVA тест (**** $p < 0.0001$) в сравнение с контролите, третиран с pTriEx.

Всички мишки бяха кръвопускани всяка седмица, а получените серуми съхранявани при -70 °C. Нивата на IgG анти-IP антителата бяха установени чрез ELISA, при която беше установена значителна разлика между групите. Както е показано на фиг. 24, имунизацията на трансферирани с TMC NSG мишки с sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos конструктите, последвано от стимулация с експресирания фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos води до високи нива на анти-IP антитела след последната имунизация в сравнение с имунизация с празен вектор pTriEx. От друга страна сходни нива на анти-IP антитела бяха детектирани след имунизация и стимулация единствено с фюжън протеина sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos или ДНК pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos конструкции, без стимулация с протеиновия конструкт. Умерени нива на анти-IP антитела бяха детектирани в хуманизираните животни имунизирани с pTriEx-IP.

Не бяха открити анти-IP антитела в серуми на NSG мишки, трансферирани с TMC, инжектирани с празен плазмид или pTriEx-sc22.

10. Генериране на цитотоксични Т клетки

Беше проучена CTL активността на изолирани клетки от слезки и лимфни възли при всички животни срещу заразени с грип 3T3 клетки 2 седмици след последната имунизация на всяка група. Инжектирането на празен pTriEx, pTriEx-sc22 или sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos фюжън протеин индуцира слаба цитотоксична активност, докато pTriEx-IP даде междинни резултати (Фиг. 25). Цитотоксичната активност на NSG мишки, трансферирани с TMC и третираните с pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos + sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos фюжън протеин беше значително по-висока в сравнение с други имунизирани групи.



Фигура 25. Имунизация с pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos и реимунизация с експресиран фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, индуцира CTL активност в хуманизирани NSG мишки. CTL активност на човешки клетки, изолирани на 14-ия ден след последната имунизация (същата схема на третиране, както е описана във фиг. 39). Клетките бяха изолирани от слезките и лимфните възли на всички третирани и контролни групи животни. 3T3 клетки, заразени с грипен вирус, бяха култивирани с изолирани ефекторни клетки в съотношение 1:40 за 4 часа при 37 °C. Концентрацията на LDH в супернатантите беше определена в три повторения чрез търговски CytoTox анализ. Резултатите бяха изразени като средна стойност +/- SD от три повторения. p-стойностите бяха изчислени чрез two-way ANOVA тест(* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001) в сравнение с контролите, третирани с pTriEx.

Дискусия

Използването на инженерни и генно-инженерни химерни молекули за насочване на антигени към Fc γ или CR- рецептори дават възможност за модулиране на имунният отговор в желаната посока. При този подход се използват антитела (или техни фрагменти) които, насочени към естествените си лиганди транспортират антигени или техни епитопи до прицелните клетки.

Вирусът на грип тип А е важен патоген, причиняващ остри респираторни заболявания в човешката популация (3, 5, 7). Вирусът е отговорен за периодични сезонни огнища, но някои щамове показват потенциал за достигане на глобална пандемия. Засега ваксинацията се счита за най-ефективния начин за предотвратяване на инфекция и намаляване на усложненията, причинени от грипни вируси (9).

Ваксините са имунизирани агенти, които служат за целите на активната имунопрофилактика. Ваксините ни позволяват да ангажираме нашата адаптивна имунна система да произвежда високо-специфични антитела и имунологична памет срещу потенциална бъдеща инфекция. Счита се, че Едуард Дженър, английски лекар е създал първата ваксина срещу едра шарка през 1796 г. Така Дженър поставя началото на предпазните ваксинации, които наред с лечението с антибиотици и успехите на диагностичната и противоепидемичната дейност водят до ликвидирането на едни и ограничаването на други заразни болести. Едно от най-големите постижения в тази посока е ликвидирането на многовековното епидемично заболяване едра шарка. Заболяването изчезва благодарение на ваксините и стриктните политики за приложението им. През 1798 г. Дженър пръв употребява думата „ваксина“. Отдавайки своето признание към Дженър, великият френски микробиолог Луи Пастър през 1880 г. разпространява термина “ваксини”, като го използва за всички микробни препарати, които предизвикват изработване в организма на активен имунитет, т.е. на собствени антитела срещу съответния болестотворен микроб (399).

Множество класически вирусни и бактериални ваксини не отговарят на съвременните изисквания за сигурност и защита при употреба. Напредването на съвременните технологии в областта на молекулярната биология и методите за ДНК-рекомбинация позволи конструирането на ново поколение ваксини.

Обвивката на вирусите на грип от тип А съдържа повърхностен НА, който е хомотримерен гликопротеин, отговорен за първоначалното свързване на вириона към сиаловата киселина на рецепторите на повърхността на клетката гостоприемник. Това свързване води до навлизането на вирусния генетичен материал в клетката (12). НА молекулата също е основната мишена за специфичните защитни антитела, индуцирани от инфекция или имунизация (13, 20). Както живите, така и субединичните (пречистен гликопротеин) ваксини срещу грип предизвикват високи титри на серумни анти-НА антитела, които директно неутрализират вирусната инфекция, блокирайки възможността на вируса да се прикрепя към клетъчната повърхност. Способността за бързи мутации на имунодоминантните вирусни антигени НА и NA, известни като антигенен дрифт и антигенен шифт може да направи всеки съществуващ имунитет безполезен (65).

Превенцията или намаляването на патогенните заболявания чрез ваксинация е едно от най-важните постижения на медицината. Грипните епидемии се очертаха като световен здравен проблем със сериозно социално въздействие през последните десетилетия. Разработването на ефективна ваксина срещу грип все още е спешно предизвикателство за биомедицинската индустрия през последните десетилетия (67). Заедно с хората, широк набор животински видове като прасета, птици и коне са естествени гостоприемници на грип А вирусите, като осигуряват голямо разнообразие от антигенни структури за потенциални мишени на ваксините. Доказано е, че НА протеините съставляват 80% от всички протеини на вирусната повърхност. Логично, повечето стратегии за разработване на ваксини са насочени към тази молекула. Тъй като субединичните ваксини, които съдържат рекомбинантен НА компонент не предоставят защитен ефект при хора е необходимо разработването на алтернативни подходи за разработване на ваксини. Допълнително предизвикателство за успешното прилагане на тези ваксини е антигенният дрифт в НА епитопите, които променят идентифицираната рамка. Различни изследвания сочат, че основните вирусни НА епитопи мутират по-бързо от останалите участъци на протеина (72). От друга страна, различни консервативни епитопи на хемаглутинаина при грипа са възможни мишени за ваксини, но те са твърде къси и с ниска имуногенност и предизвикват основно хуморален имунен отговор. Сред тях е и къс пептид от 25 аминокиселини HA317-41, който съдържа I-E^d-ограничен Т-клетъчен епитоп и

конформационно-зависим В-клетъчен епитоп (22-24). В настоящето изследване пептидът НА317-41 е използван като част от рекомбинантна ДНК молекула.

Инженерните протеинови или генно-инженерните химерни молекули, насочващи антигени към не-антиген-свързващите повърхностни рецептори са инструмент за насочена модулация на имунния отговор. И в двата случая се използват антитела (или техните фрагменти), които транспортират епитопи до интересуващите ги клетки, когато са насочени към техните естествени лиганди и могат да модулират имунния отговор към желания курс. Възможен начин за повишаване на имуногенността на антигенните субединици и малките пептиди, носещи рекомбинантни епитопи е доставянето им до професионални антиген представящи клетки (APC), като дендритните клетки (DCs) и макрофаги. И двата клетъчни типа играят основна роля при естествения имунен отговор срещу патогени и притежават множество рецептори за разпознаване на чуждеродни субстанции или модулиране на APC чрез сигнали от придобитата имунна система. Посредством използването на генетичен конструкт, насочващ рекомбинантен НА към МНС клас 2 или хемокиновите рецептори (XCR1 и CCR1/3/5) по повърхността на APCs, в имунизирани животни са били наблюдавани повишен Th2 или Th1 отговори (263). Друго изследване показва повишени нива на CD8⁺ Т-клетъчен отговор към ваксини, насочени към дендритни клетки (400).

Ваксинирането с ДНК е новаторски подход за генериране на имунен отговор срещу патогенни бактерии и вируси. Анти-грипните ДНК ваксини са иновативна стратегия, която основно се състои в прилагането на експресионни вектори, кодиращи антигенни последователности в клетките на гостоприемника (128, 133). Генът (ите), кодиран от плазмид, след това се експресира от механизмите за транскрипция/транслация на клетките-гостоприемници, като се имитира естествената вирусна инфекция (135). Когато се произвеждат в естествени условия, антигените, кодирани в ДНК ваксините се обработват и представят в контекста на МНС молекули клас I и II и предизвикват ефективен цитотоксичен и хуморален отговор (141).

ДНК ваксините са много стабилни, евтини за производство, неинфекциозни и неспособни за разпространение в обкръжаващите клетки. Интрамускулната имунизация на мишки с плазмидна ДНК, която кодира вирусни протеини или техни епитопи индуцира CD8⁺ цитотоксични CTL, производството на антитела, отделяне на IFN-gamma, IL-6 и

TNF-alpha (130). Има различни сценарии или молекулярни събития, възможни след мускулното инжектиране на ДНК ваксините: трансфекция на соматични клетки като миоцити, последвано от кръстосано активиране на CD8+ Т-клетки; директна трансфекция на професионални APCs, като DC; кръстосано активиране от обработен от APCs протеин, представен на Т-клетки; и стимулиране на TLR9 от бактериалния ДНК плазмид чрез неметирирани CpG нуклеотидни последователности (126).

Много проучвания потвърждават, че грипната HA-кодираща ДНК ваксина предизвиква силен и дълготраен имунен отговор и осигурява защита срещу летални дози грипен вирус при животни (143, 153). Тези ваксинални препарати индуцират особено ефективен цитотоксичен Т клетъчен отговор, като същевременно предизвикват по-ограничен хуморален отговор (163). ДНК ваксините могат да бъдат използвани заедно с протеинови ваксини за комбиниране на предимствата на двете техники. Такива ваксини могат потенциално да разширят имунния отговор, осигурявайки по-ефективна защита срещу силно променливи и неуловими патогени (162, 166).

Изненадващо е, че малкото количество протеин, произведено след ДНК ваксиниране е способно да предизвика защитна имунна реакция (230). Вградените адювантни свойства могат да подобрят ефикасността на антигенното доставяне, чрез насочване на антигените или епитопите към желаните клетки. Химерни молекули, продукт на инженерство и генно инженерство, служещи за насочване на антигени към активиращи рецептори на повърхността, са възможен подход за стимулиране посредством насочен имунен отговор.

Дискусия – част I

Ролята на костимулиращите повърхностни рецептори в усилването на имунния отговор е добре призната (242, 249). Комплемент рецептори 1 и 2 (CD35 и CD21), се експресират върху В-лимфоцитите и регулират активирането на В клетките. Съвместното омрежване на BCR и комплемент рецепторите намалява прага за активиране на В клетки, което води до засилено представяне на антиген от В-клетките (246, 396).

ДНК-базираните ваксини осигуряват защитен имунитет, като задействат експресията на вектор-кодиран антиген и предизвикват ефективен имунен отговор. Подобно на протеиновите субединични ваксини ДНК-базираните ваксини представят само

необходимия антиген за имунизация и в допълнение полза от *in vivo* синтеза на антиген. ДНК ваксините съдържат мощен промотор за еукариотна експресия и неметилирани CpG мотиви, действащи като адюванти. Тези CpG последователности активират целевите клетки чрез TLR9 разпознаване и засилват експресията на кодираните с ваксина протеини. По този начин, след като ДНК навлиза в клетките на гостоприемника, кодираният антиген се експресира и се представя на имунната система по начин, имитиращ естествена инфекция (44).

Най-важното предимство на генетичните ваксини е предизвикването както на хуморален, така и на клетъчен имунен отговор без рисковете, свързани с живи атенюирани ваксини. Като цяло ДНК ваксините предимно предизвикват генериране на CTL, докато протеиновите субеденични ваксини предизвикват хуморален отговор (126, 130).

Редица ДНК ваксини, кодиращи основните грипни антигени (HA и NA) индуцират защитен имунитет срещу вирусна инфекция (165-167, 184, 188). В настоящото проучване обаче използвахме малък пептид с 25-аминокиселини като част от вирусен HA, който може да модифицира имунния отговор в сравнение с целия HA.

Генерирането на генетични или протеинови химерни молекули чрез използване на антицяло-носител е алтернативен начин за доставяне на антиген до интересувашите ни клетки (142, 161). scFv с включен антиген запазва свойствата на естествените антитела, но може да се използва и като гола ДНК ваксина. В настоящото изследване ние конструирахме протеинова реплика на генетичния конструктор чрез ковалентното свързване на IP пептидите с нативно анти-CR1/2 антицяло. Химерната молекула се използва за първично стимулиране след двойна ДНК ваксинация или за имунизация самостоятелно.

Бяха конструирани химерни ДНК молекули, съдържащи последователност кодираща IP пептид, изолиран от хемоглутинин на грипен вирус и scFv антицялов фрагмент, който да свързва миши костимулиращ В-клетъчен рецептор за комплемент 1 и 2 (CR1/2) върху антиген-специфични В-клетки. Тази химерна ДНК молекула беше включена в експресионен вектор pNut и приложена интрамускулно (*i.m.*) в мишки с див фенотип и мишки с блокиран CR1/2 (CR1/2 нокаут мишки). Прилагането на описания ДНК конструктор и стимулирането с инженерната протеинова реплика на химерата

предизвика силен анти-грипен цитотоксичен отговор срещу вирус-инфектирани клетки, промяна на цитокиновия профил и слаб антительен отговор в интактни Balb/c мишки. Същата схема на имунизирание не доведе до грип-специфичен имунен отговор в мишки, при които липсва прицелният рецептор (22, 23). Освен омрежващия ефект на CR1/2 и BCR върху IP-специфични В-клетки, което води до провеждане на вътреклетъчен сигнал, взаимодействието между анти-CR1/2-IP и CR1/2 на повърхността на IP-неспецифични В-клетки може допълнително да засили антигенното представяне и да стимулира произвеждане на анти-НА антитела (249). В сравнение със свободния пептид, ефективността на представяне на конструкта може да бъде подобрена чрез увеличаване на локалното количество пептид върху клетъчната повърхност чрез свързване на CR1/CR2.

След-експресионната активност на ДНК химерните молекули е рискова, което изисква доказване на активността на протеиновите химерни молекули *in vitro*. Способността на 7G6-IP химера да се свързва с CR1/2 върху миши В клетки бе демонстрирана чрез проточен цитометричен анализ. Доказано беше също, че IP пептидът запазва своите В и Т клетъчни епитопи след конюгиране с антительо-носител и може да бъде разпознат от IP-специфични В и Т клетки. Аранжирането на IP пептид с насочващо антитяло беше в състояние да предизвика предаване на сигнала през CR1/2 при CR1/2-позитивна В-клетъчна линия. Очаквахме да засилим хуморалния отговор срещу IP пептида *in vivo*, тъй като 7G6-IP химерата, конструирана от нас, ще свърже с приоритет целевите налични IP-специфични В клетки. В действителност, прилагането и реимунизацията с протеиновата химерна молекула 7G6-IP при Balb/C мишки повиши нивото на анти-IP IgG антитела в сравнение с имунизацията със свободен IP пептид. IP приложен самостоятелно провокира високи титри на антитела, когато се прилага с CFA, докато голата pNut-IP-7G6scFv-Fos/Jun ДНК ваксина дава умерени титри дълго след второто прилагане на ДНК. Интересно е, че групата с животни, двойно имунизирани с pNut-IP-7G6scFv-Fos/Jun и реимунизирани с протеиновата химера 7G6-IP, показва много ниско ниво на анти-IP IgG в сравнение с животните, имунизирани със свободен IP пептид. Това не беше неочаквано, като се има предвид, че химерата pNut-IP-7G6scFv не кодира цялата НА молекула, а само малък вирусен пептид (130, 184, 229, 232). Дори реимунизацията с протеиновата химера 7G6-IP не може да насочи имунния отговор към

хуморалния курс, докато самостоятелната протеинова химера 7G6-IP генерира високи нива на специфични антитела.

Има няколко възможни механизма, чрез които 7G6-зависимото насочване на IP пептида към CR1/2 би могло да доведе до засилен антитялов отговор. Свързването на 7G6-IP химерни молекули с CR1/2 може да увеличи локалната концентрация на антигена на повърхността на вирус-специфични В клетки, като по този начин осигурява взаимодействието между IP пептида и неговия специфичен BCR. Друга възможност е омрежването на CR1/2 и BCR върху IP-специфични В клетки, което да доведе до вътреклетъчна сигнална трансдукция. Дори взаимодействието между 7G6-IP и CR1/2 върху IP-неспецифични В клетки може да премине към представяне на антигена, спомагайки производството на анти-IP антитела (249). Имунизацията на CR1/2 КО мишки с 7G6-IP химерна молекула не доведе до получаване на анти-IP антитела, потвърждавайки съществената роля на CR1/2 за нормален хуморален имунен отговор.

Продукцията на цитокини подкрепя получените резултати. Не наблюдавахме значителни разлики в синтеза на IL-4 и IL-10 между имунизираните групи животни, но нивата на IFN- γ показват генерирането на Th1 имунен отговор в групите, ваксинирани с протеинова химера 7G6-IP и с pNut- IP-7G6scFv ДНК ваксина с или без реимунизация с протеина. Както се очакваше, в IP-CFA групата бяха измерени високи нива на IFN- γ , но той не беше свързан със значителен анти-IP специфичен CTL отговор.

Най-обещаващото качество на ДНК ваксините е ефективното генериране на дълготрайна CTL памет. В предишни проучвания съобщавахме за наличието на CD8+ цитотоксични Т-лимфоцити, присъстващи поне 6 месеца след еднократна или повторна имунизация с pNut-IP-7G6scFv. В настоящото проучване получихме дори по-висока CTL активност след първоначалната реимунизация с протеиновия конструкт 7G6-IP. Умерена CTL анти-грипна активност също беше открита в животинските групи, имунизирани с ДНК, кодираща pNut-IP и свободен IP пептид в CFA. Тези резултати са в съответствие с данните, че конвенционална ваксина, комбинирана с CFA, може да повиши CD8+ цитотоксичните Т клетки и да индуцира цитотоксичен имунитет (23).

Получените резултати показват, че съвместната имунизация с химерната ДНК молекула pNut-IP-7G6scFv и протеиновата версия на ваксината допълнително повишава

интензивността на CTL отговора срещу грипния вирус. Самостоятелно протеиновата химера индуцираше високи титри на анти-грипни IgG антитела. Присъединяването на последователност, кодираща scFv фрагмент на антитяло към стимулиращ ко-рецептор и грипния пептиден епитоп усилва CTL отговора, докато реимунизацията с протеиновите химери не може да превключи имунния отговор към хуморалния курс.

Дискусия - част II

ДНК ваксините осигуряват достатъчна защита след третиране на малки животни, но обикновено се провалят в клиничните проучвания при хора. Възможни стратегии за подобряване на потентността им е директното насочване на антигени към APCs и стимулирането с протеинови реплики след ДНК ваксинирането (130). За тази цел направихме ДНК конструктор, кодиращ scFv фрагменти от антитяло, специфично за Fc-gammaRI, свързани с HA317-41 грипен вирусен епитоп и въведени в еукариотната експресионна векторна система pTriEx, която има вирусен промотор за експресия на чуждеродни протеини. Тези генетични конструктори могат да бъдат имунизирани в експериментални хуманизирани мишки.

Генерирането на едноверижни вариабилни фрагменти на антитела (scFv) позволява изграждането на напълно функционален антиген-свързващ имуноглобулинов фрагмент, съдържащ тежките и леки вериги на антитялото. Инженерните scFv антитела могат да бъдат генетично свързани с точно определени пептидни епитопи. Получената бифункционална химерна молекула, вкарана в експресионен вектор, може да се използва като гола ДНК ваксина за доставяне на вирусни епитопи към антиген-специфичните клетки (299).

Беше важно да бъде доказано *in vitro* пост-експресионната активност и афинитетът на генерираните химерни ДНК молекули към Fc-gammaRI, както и способността им да предизвикват предаване на сигнали в клетката. Способността на фюжън протеините pTriEx-L-sc22-IP-Jun/pTriEx-Lsc22-IP3-Fos да се свързват към Fc-gammaRI на повърхността на човешката лимфмна клетъчна линия U937 или PBMC от здрави донори беше доказана посредством проточна цитометрия. Фюжън протеините запазиха и IP B-клетъчния епитоп след експресия, както беше доказано чрез инкубиране с IP-специфично моноклонално антитяло.

За провеждане на сигнал и активиране на фагоцитозата посредством Fc-gammaRI по повърхността на APC, които го експресират, е необходимо агрегирането на множество рецептори. Подобно агрегиране е необходимото начално условие за активиране на киназите от семейството Src и последващото аранжиране на каскадата от сигнални молекули, отговарящи за клетъчните функции, осъществявани посредством Fc-gammaRI (260). Моновалентния конструкт scFv няма способността да активира рецептора, докато повишение на валентността може да подобри агрегационната ефективност спрямо Fc-gammaRI. Fos и Jun, протеиновите продукти на ядрените протоонкогени *c-fos* и *c-jun*, модулират транскрипционният процес, като формират левцинов цип чрез Fos-Jun хетеродимер, посредством добре описано протеин-протеиново взаимодействие (401). Тук, левциновите ципове от протеинови домени са използвани за генериране на димерни рекомбинантни протеини, включващи scFv антиядловите фрагменти. За да направим това, Fos и Jun последователностите на човешките онкогени бяха добавени към ДНК конструкта sc22-IP и след експресията scFv фрагментите, които съдържат Fos се свързваха спонтанно с scFv фрагментите, които съдържат Jun. Димеризираните домени, които произлизаха от транскрипционните фактори Fos и Jun бяха интегрирани с цел да повишим валентността и като следствие способността за омережаване и, за да повишим полу-живота на конструкта, което може да е ограничаващ фактор в тези условия.

Образуването на химерни, бивалентни scFv антители, които носят IP доведе до повишена способност за захващане за Fc-gammaRI и до провеждане на сигнал посредством сигнални молекули, които съдържат ITAM-участъци. Този ефект беше доказан чрез фосфорилиране на тирозинови участъци, след инкубиране на човешка лимфомна клетъчна линия U937 с sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos фюзън протеините и имунопреципитация на рецепторите. Протеинът, който се появява под формата на 25 kDa ивица с фосфорилиран тирозин отговаря на ITAM фрагмента на гама веригата на FcR (261).

След инкубиране на човешки ТМС с фюзън протеините беше установен повишен брой плазмоцити, секретирани анти-IP пептид специфични IgG антители, което доведе до повишена APC стимулация и Ag-представящи функции. В сравнение със свободните пептиди, фюзън протеините подобриха ефикасността на представянето чрез повишаване

на локалната пептидна концентрация по клетъчната повърхност, следствие от свързване с Fc-gammaRI.

През последните години различни хуманизирани миши модели за изследване на анти-вирусни ваксини бяха представени на научната общност. Мишки с остър комбиниран имунодефицит (SCID), които нямат В- и Т-клетки са трансферирани с човешки PBMC, за да бъде предизвикан анти-грипен имунен отговор (402). Трансферирани имунодефицитни NSG мишки са следващото поколение модели за имунологични изследвания. При тях липсват зрели Т, В, и NK клетки, което ги прави подобри приемници при трансфера на чуждородни клетки с човешки произход без естествена съпротива (260). NSG мишките са тествани в редица антивирусни експерименти за изследване на ваксини (403). Независимо, че реакция на присадката към гостоприемника (GVHD), медирана от трансферираните човешки Т клетки е възможен недостатък, за момента този модел е най-подходящ за възпроизвеждане на имунен-отговор с човешки клетки. Трансферираните човешки имунни клетки остават в организма на мишката близо 3 месеца и В-клетки на имунната памет продължават да секретират антитела след стимул с антигени.

Допуснахме, че е възможно да бъде генериран анти-грипен IgG антительов отговор, както и CTL активност срещу клетки, заразени с грипен вирус в хуманизиран NSG модел след третиране с генерираните химерни scFv-IP ДНК молекули. При хуманизирането бяха използвани ТМС от здрави донори. Остава неясно дали Т и В-клетките, които остават в мишките са представителни за пълния репертоар на донора или са част от клетки с ограничена антигенна специфичност. За да бъде установено това, използвахме мишки трансферирани с ТМС от IP-позитивни донори, доказани посредством ELISpot.

Участък 317-341 от човешки хемаглутинин на грипен А вирус (серотип H1N1) провокира неутрализиращи пептид-специфични антитела, Т-хелперен клетъчен отговор и индуцира защита срещу летални вирусни инфекции (404, 405). Групите хуманизирани мишки, инжектирани с ДНК конструкта pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos и реимунизирани със същия ДНК-вектор показаха високи нива на анти-IP IgG антитела след последната имунизация. Бяха използвани различни подходи, за да се повиши антительовия отговор при използването на рекомбинантни протеини (126). В нашето изследване животни

трансферирани с ТМС и ваксинирани с ДНК химерната молекула pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, и реимунизирани с рекомбинантен фюжън протеин sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos развиха високи нива на анти-IP антитела. Подобен ефект беше постигнат след множество имунизации на хуманизирани NSG мишки само с фюжън протеина sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos, докато инжектиране с IP-носещия конструкт pTriEx-IP без насочване от едноверижното антитяло доведе до много ниски нива на анти-IP IgG антителата. В същност, повишеният хуморален имунен отговор в групите имунизирани с пълната ДНК ваксина и реимунизирани с фюжън протеина беше усилен след реимунизацията. Независимо от това, самостоятелното приложение на ДНК ваксината pTriExsc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos без реимунизация доведе до по-висок титър на анти-IP антителата в последните етапи сравнено с имунизацията с pTriEx-IP, което се дължи на повишената ефикасност при свързване чрез Fos и Jun.

От друга страна, неколкостратното ДНК реимунизирание с pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos доведе до силен CTL отговор срещу клетки, инфектирани с грипен вирус. Реимунизацията с протеин след имунизация с ДНК не доведе до повишаване на клетъчната цитотоксичност, но комбинираното имунизирание с ДНК и протеин доведе до най-добър балансиран хуморален и CTL анти-грипен имунен отговор.

В други експерименти бяха тествани всички варианти на реимунизация с sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos фюжън протеина при хетероложна система, последвайки pTriEx-sc22 (с липсващи IP и Fos/Jun), pTriEx-IP (с липсващи sc22 и Fos/Jun) и празен плазмид pTriEx (с липсващи sc22-IP-Jun или sc22-IP3-Fos) ДНК имунизации (резултатите не са показани). Нивата на анти-IP IgG антителата след имунизирание с pTriEx-sc22, pTriEx-IP, и празния плазмид pTriEx, и реимунизация с фюжън протеина sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos бяха сходни с нивата, получени след самостоятелно инжектиране с фюжън протеина sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos. Имунизирането с ДНК конструкт, в който липсва димерния мотив Fos/Jun без реимунизация никога не достигна нивата на анти-IP IgG антителата, получени посредством самостоятелно ваксиниране с ДНК ваксината pTriEx-sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos. Не беше наблюдавано повишаване на CTL имунния отговор, а бяха получени само сходни нива при имунизирание с pTriEx-sc22, pTriEx-IP и празния плазмид pTriEx без реимунизация.

Настоящото изследване доказва пост-експресионният потенциал на конструираната химерна ДНК молекула pTriEx-sc22-IPJun/sc22-IP3-Fos да се свързват с човешки моноцити и индуцирането на активиращ сигнал, посредством насочено взаимодействие с прицелни рецептори, предизвикващо силен хуморален и CTL отговор в хуманизирани NSG мишки.

ИЗВОДИ

Част 1.

1. Протеин-конструирани химерни молекули 7G6-IP с мишени в миша имунна система запазват своята антиген-свързваща активност и могат да бъдат използвани за доставяне на вирусни антигени към специфичните В клетки
2. Чрез конструирани химерни молекули е възможно директно повлияване на анти-IP IgG секретиращите плазматични клетки
3. IP пептидът от 7G6-IP химерата запазва своя Т клетъчен епитоп, което обуславя възможността при такъв тип имунизация да се ангажира както хуморалния, така и клетъчният имунитет, давайки много висока ефективност на генерирания имунен отговор.
4. 7G6-IP химерата индуцира сигнал през CR1/2, което доказва реалното ефективно действие на инициацията на имунния отговор
5. Имунизацията с ДНК химерни молекули с последваща реимунизация генерира високи нива на анти-IP антитела и IFN- γ - фактори за ефективна противогрипна защита
6. Същата имунизация предизвиква пролиферацията и стабилното формиране на високо-ефективни вирус-неутрализиращи цитотоксични Т клетки в миши модел

Част 2.

1. Конструираният химерен генетичен молекул с мишен в човешка имунна система могат да бъдат успешно експресирани в еукариотна експресионна система. Експресираният рекомбинантен протеин се свързва ефективно с човешкия FcγRI върху антиген-представящите клетки.
2. Експресираният рекомбинантен протеин стимулира В-клетъчните предшественици на анти-IP IgG секретиралите плазматични клетки, увеличавайки значително техния брой.
3. Рекомбинантните sc22-IP-Jun/sc22-IP3-Fos протеини индуцират силен активизиращ сигнал през FcγRI.
4. Успешно беше генериран хуманизиран NSG миши модел за изследване на новите химерните молекули чрез трансфер на човешки тонзиларни клетки в имунодефицитни мишки.
5. Имунизацията на ДНК химерните молекули с последваща протеинова реимунизация генерира синтеза на високи нива от човешки анти-IP антитела в хуманизираните мишки.
6. Същата имунизация обезпечава клетъчния имунитет чрез генериране на цитотоксични вирус-специфични Т клетки.

ПРИНОСИ

1. Беше успешно конструиран прототип на ДНК ваксина в миши модел, генериращ високи нива на анти-грипен имунитет чрез насочване на моделен антиген към ко-стимулационни В-клетъчни рецептори, даващи основа за бъдещо развитие на алтернативна хуманизирана система.
2. Беше развит хуманизиран NSG трансферен човешки модел чрез прехвърляне на човешки тонзиларни клетки в имунодефицитни мишки, който дава възможност за тестване на нови генерации ваксини за хуманна употреба. Модела дава информация за всякакъв тип пред-клинични тестове.

3. Успешно беше конструиран и тестван прототип на анти-грипна ДНК ваксина за хуманна употреба, генерираща балансиран хуморален и клетъчен имунитет – главно условие за неутрализиране на грипната инфекция. ДНК ваксината беше успешно тествана в развития хуманизиран модел.

Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. Kerekov N., Ivanova I., Mihaylova N., Nikolova M., Prechl J., Tchorbanov A. Built-in adjuvanticity of Genetically and Protein Engineered Chimeric Molecules for Targeting of Influenza A peptide epitopes. Immunol Research 2014, 60(1), 23-34;

DOI 10.1007/s12026-014-8489-0. Q1, IF 3.098

2. Ivanova I., Mihaylova N., Manoylov, I., Makatsori, D., Lolov, S., Nikolova M., Mamalaki, A., Prechl J., Tchorbanov A. Targeting of Influenza viral epitopes to antigen presenting cells by Genetically Engineered Chimeric Molecules in Humanized NSG transfer model. Human Gene Therapy 2018, 29(9), 1056-1070. Q1, IF 4.241

Награди:

Първа награда в конкурс „Най-добра публикация във връзка със 150-та годишната на БАН“ 2019 г.

Участия с постери и доклади на конгреси и конференции:

Molecular Immunology & Immunogenetics Congress – MIMIC 2012, April 27 -29, 2012, Antalya, Turkey - Novel DNA-binding cyanine dyes designed for flow cytometric analyses of apoptosis. **Ivanova I.**, Tchorbanov A.

Workshop “Immune cell interactions: a mechanism for immune system control” – June 8, 2012, Sofia, Bulgaria - Novel DNA-binding cyanine dyes designed for flow cytometric analyses of apoptosis. **Ivanova I.**, Kaloyanova S., Dimitrova P., Deligeorgiev T., Tchorbanov A.

3rd European Congress of Immunology ECI 2012, September 5 – 8, 2012, Glasgow, Scotland, UK - Flow cytometric analyses of apoptosis by new-synthesized DNA-binding cyanine dyes. **Ivanova I.**, Kaloyanova S., Dimitrova P., Deligeorgiev T., Tchorbanov A.

15th International Congress of Immunology - ICI, August 22 - 27, 2013, Milan, Italy - Genetically Engineered Chimeric Molecules Targeting Influenza A Viral Antigen. **Ivanova I.**, Mihaylova N., Kerekov N., Erdei A., Prechl J., Tchorbanov A.

8th Balkan Congress of Microbiology, October 2 – 5, 2013, Veliko Tarnovo, Bulgaria - Genetically engineered chimeric molecules targeting influenza viral antigen. **Ivanova I.**, Mihaylova N., Kerekov N., Erdei A., Tchorbanov A.

5-та Работна среща „Експериментари модели и методи в биомедицинските изследвания”, 7 – 9 април, 2014, София - Built-in adjuvanticity of Genetically and Protein Engineered Chimeric Molecules for targeting of Influenza A peptide epitopes. Hlebarska D., Kerekov N., **Ivanova I.**, Mihaylova N., Nikolova M., Prechl J., Tchorbanov A.

4th National Congress of Immunology, 2-5 October, 2014, Golden Sands, Varna, Bulgaria. Юбилейна Научна сесия – 68 години Институт по Микробиология „Стефан Ангелов” и десет години от асоциирането му с Институт Пастър - Париж, 16-17 март, 2015, София - Built-in adjuvanticity of Genetically and Protein Engineered Chimeric Molecules for targeting of Influenza A peptide epitopes. Hlebarska D., Kerekov N., **Ivanova I.**, Mihaylova N., Nikolova M., Prechl J., Tchorbanov A.

6-та Работна среща „Експериментари модели и методи в биомедицинските изследвания”, 12–14 май, 2015, София - Targeting of virus epitopes to antigen-presenting cells via chimeric molecules in Humanized SCID mice. Hlebarska D., **Ivanova I.**, Mihaylova N., Manoylov I., Makatsori D., Mamalaki A., Prechl J., Tchorbanov A.

XI Национална конференция по медицинска биология, 15-17 май, 2015, Пловдив - Вградена адювантност на генетично и белтъчно проектирани химерни молекули за насочване на пептидни епитопи от грипен вирус тип А. **Иванова И.**, Кереков Н., Хлебарска Д., Михайлова Н., Николова М., Прехл Й., Чорбанов А.

4th European Congress of Immunology ECI 2015, September 6 – 9, 2015, Vienna, Austria - Built-in adjuvanticity of genetically and protein engineered chimeric molecules for targeting of Influenza A peptide epitopes. Kerekov N., **Ivanova I.**, Mihaylova N., Nikolova M., Prechl J., Tchorbanov A.

7th EFIS – EJI (SEEIS2015), 16 - 19 October 2015, Becici, Montenegro - Targeting of Influenza viral epitopes to human antigen presenting cells by genetically engineered chimeric molecules. **Ivanova I.**, Mihaylova N., Hlebarska D., Manoylov I., Makatsori D., Mamalaki A., Prechl J., Tchorbanov A.

XII Национална конференция по медицинска биология, 8-10 септември 2017 г., Цигов чарк, България - Targeting of Influenza viral epitopes to human antigen presenting cells by genetically engineered chimeric molecules. Tzankova G., **Ivanova I.**, Mihaylova N., Manoylov I., Makatsori D., Mamalaki A., Prechl J., Tchorbanov A.

4th Black Sea International Immunology School (BSIIS2017), 20-22 October 2017, Starosel, Bulgaria - Engineered molecules for targeting of Influenza A epitopes. **Ivanova I.**, Mihaylova N., Manoylov I., Makatsori D., Lolov S., Nikolova M., Mamalaki A., Prechl J., Tchorbanov A.

12та работна среща с международно електронно участие „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти“, 27-29 ноември 2017 г., ИЕМПАМ – БАН, София, България - Engineered molecules for targeting of Influenza A epitopes. **Ivanova I.**, Mihaylova N., Manoylov I., Makatsori D., Lolov S., Nikolova M., Mamalaki A., Prechl J., Tchorbanov A.

EFIS of tour, February 9, 2018, Sofia, Bulgaria - Bulgaria. Selective Immunotherapy by engineered chimeric molecules. **Ivanova I.**, Tchorbanov A.