

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ”

Николина Михайлова Михайлова

Имуномодулираща активност на нови експериментални IgM и IgG препарати

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен “Доктор”
(научна специалност 01.06.23 - Имунология)

Научен ръководител: ст.н.с. I ст. д-р Чавдар Л. Василев, дмн

Рецензенти: ст. н. с. I ст. д-р Станимир Д. Кюркчиев, дмн

ст. н. с. I ст. д-р Снежинка Н. Маринова, дмн

София 2009

Използвани съкращения

ИВИг	интравенозен имуноглобулин Г препарат
ИВИгМ	интравенозен имуноглобулин М препарат
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
двДНК	двойноверижна ДНК
IgM	имуноглобулин М
IgG	имуноглобулин Г
HLA	human leukocyte antigen
ITAM	имунорецепторен тирозин-базиран активационен мотив
ITIM	имунорецепторен тирозин-базиран инхибиторен мотив
SCID	Severe combined immunodeficiency
MLR	Mixed lymphocyte reaction
PHA	phytohamagglutinin activation
PBS	фосфатно-буфериран физиологичен разтвор
HPLC	високоразделителна течна хроматография
CFA	пълен адювант на Фройнд
ICA	непълен адювант на Фройнд
FITC	флуоресцеин изотиоцианат
PE	Phycoerythrin
APC	Allophycocyanin
ELISA	ензимо-свързан имуносорбентен анализ
ELISPOT	ензимо-свързан имуносорбентен точков анализ
CD	клъстер на диференциация

УВОД

Антителата играят важна биологична роля като първа линия на защита срещу различни патогени. Те осигуряват неутрализирането на попадналите в организма бактерии, вируси и техни продукти, както и отстраняването на променени собствени молекули, клетки и тумори. Вече 110 години се търсят подходи за лечение на инфекциозни, възпалителни и автоимунни заболявания, като се използват препарати, съдържащи имуноглобулинови молекули. В множество експериментални и клинични наблюдения се доказва имуномодулиращата активност на имуноглобулинови препарати, получени при фракциониране на човешка плазма от здрави донори. Изследванията са насочени към изясняване на ефектите от действието само на препаратите, съдържащи IgG, както и на техни фрагменти. В настоящата дисертация изпитваме и доказваме имуномодулиращите активности на имуноглобулинов препарат, съдържащ имуноглобулини от клас IgM.

Прилаганите понастоящем подходи за лечение на автоимунните болести са неспецифични, тъй като въздействат не само на патологичните клетки, но и на множество други клетъчни популации и органи. Съвременните имunosупресивни средства и цитостатици често водят до тежки странични реакции. В много изследователски лаборатории се разработват нови, специфични средства за селективно повлияване само на свързаните с болеста клетки.

Втора насока на настоящата работа е търсене на принципно нов, клинично приложим подход за подтискане активността само на автореактивните клетки на имунната система. Този подход се базира на основния механизъм, по който имунната система ограничава силата и продължителността на специфичните IgG имунни отговори. За целта бяха конструирани серии от химерни антитялови молекули, съдържащи в структурата си IgG, към които са прикачени различни авто-антигени. Тези хибридни молекули се свързват едновременно с антиген-специфичните и с един или повече инхибиращи рецептори на повърхността на прицелните В-лимфоцити.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е охарактеризиране на имуномодулиращата активност на нови експериментални IgM- и IgG-съдържащи имуноглобулинови препарати.

За изпълнението на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Сравняване ефектите на действие на ИВИг и на ИВИгМ върху имунни клетки.
2. Конструирание на химерна молекула, съставена от антитяло срещу инхибиращия В клетъчен рецептор FcγRIIb и пептид, който е част от молекулата на Хистон 1 (би-специфични молекули).
3. Изследване ефекта на същата химерна молекула *in vitro* върху автореактивни В-клетки и *in vivo* върху миша линия, развиваща спонтанно лупусо-подобно заболяване.
4. Конструирание на химерна молекула, ангажираща едновременно два инхибиращи В клетъчни рецептора (FcγRIIb и CD22) и пептид, който имитира в антигенно отношение двойноверижна ДНК (три-специфични молекули).
5. Анализиране на ефекта на същата химерна молекула *in vitro* върху автореактивни В-клетки и *in vivo* върху миша линия, развиваща спонтанно лупусоподобно заболяване.
6. Охарактеризиране на сигналните пътища в автореактивни В-клетки от лупусни мишки, подложени на въздействието на три-специфичната химерна антитялова молекула.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали:

1. Експериментални животни – мишки от линиите SCID и MRL/lpr.
2. Антитела и Антигени.
3. Имуноглобулинови препарати - Нормален терапевтичен интравенозен имуноглобулин Г (ИВИг – търговски препарат „Сандоглобулин“) беше любезно предоставен от Новартис, Швейцария. Експериментален препарат от сборен човешки IgM (ИВИгМ) бе произведен от Laboratoire Francaise du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB, Les Ulis, Франция).
4. Клетъчни линии - M061, CEM, Raji, MM6, HL60.

Методи:

1. Смесена лимфоцитна реакция (MLR).
2. Фитохемаглутининова (РНА) стимулация на периферни Т-лимфоцити.
3. Тест за апоптоза.
4. Флоуцитометричен анализ.
5. Стандартен протокол за твърдофазов синтез (Fmoc) на пептиди.

- 6.Конструирането на Би-специфични и Три-специфични антители химери по класически кръстосано-свързан метод.
- 7.Мас-спектрометричен анализ.
- 8.Крос-блот.
- 9.FITC конюгиране на антитяло.
- 10.Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA).
- 11.Ензимно-свързан имуноточков анализ (ELISPOT).
- 12.Имунопреципитация.
- 13.Патохистологични изследвания - имунофлуоресцентен тест и оцветяване с хематоксилин/еозин.
14. Статистически анализи.

РЕЗУЛТАТИ

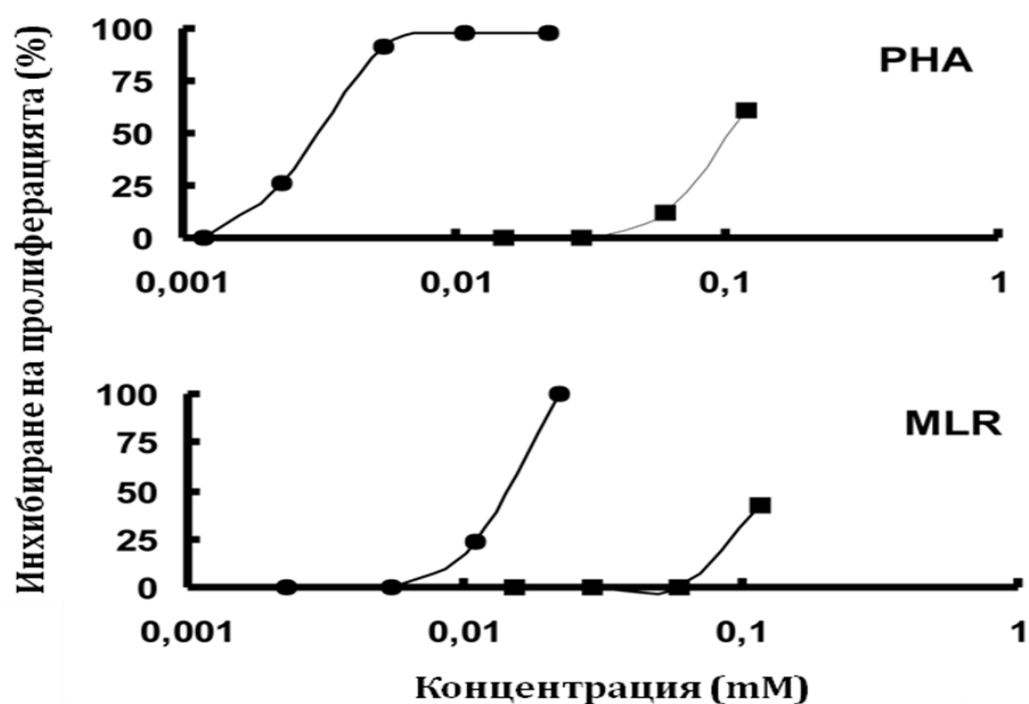
1. Обогатени на IgM имуноглобулинови препарати

1.1. Анти-пролиферативно действие на ИВИгМ върху човешки клетъчни линии и върху периферни Т-лимфоцити

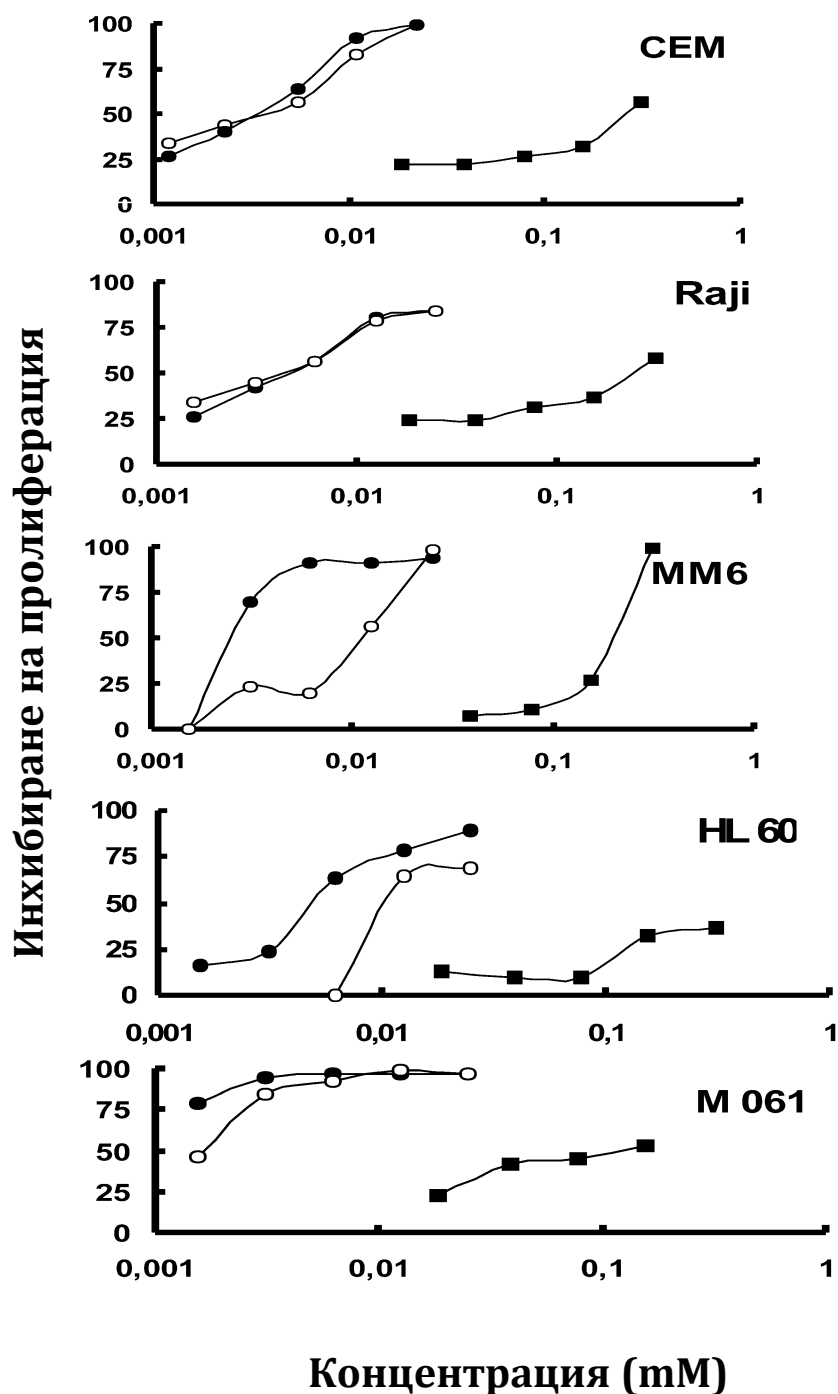
Кръвни моноклеарни клетки, получени от здрави възрастни донори, бяха стимулирани *in vitro* (1×10^5 клетки в 1 мл/среда на ямка) с фитохемаглутинин (1 мкг/мл) в 96-ямкови плаки за клетъчни култури при 37 °C и при 5% CO₂. Беше извършена и смесената лимфоцитна реакция чрез култивирането на 1×10^5 свежо изолирани периферни моноклеарни клетки от един донор със същия брой облъчени (2000 rad) клетки от друг донор. В последствие бяха добавени нарастващи концентрации от разредените в RPMI-1640 среда имуноглобулинови препарати и клетките бяха инкубирани за още 92 часа.

При направените експерименти беше потвърден дозозависимият подтискащ ефект на сборен IgG върху фитохемаглутинин-индуцираното активиране (РНА) на човешки Т клетки. ИВИгМ има подтискащ ефект върху пролиферацията, както на митоген-стимулираните и на алогенно-стимулираните човешки Т лимфоцити (Фигура 1), така и върху пролиферацията на всички останали изследвани от нас човешки туморни хемопоеични клетъчни линии (Фигура 2). Беше установено също така, че подтискащият ефект на ИВИгМ е 100 пъти по-силен в моларно отношение от този на ИВИг. За да установим дали двата имуноглобулинови препарата са със синергично действие, клетъчните линии бяха култивирани в присъствието на нарастващи концентрации едновременно от двата препарата - ИВИг и ИВИгМ. Анти-пролиферативният ефект на

комбинацията от двата препарата не бе по-голям от самостоятелния ефект на ИВИгМ (Фигура 2).



Фигура 1. Дозо-зависимо подтискане от ИВИгМ (черни кръгчета) и от ИВИг (черни квадрати) на PHA- и на MLR- индуцираната пролиферация на човешки периферни клетки *in vitro*. Имуноглобулиновите препарати бяха добавяни 4 часа след прибавянето на облъчените алогенни периферни клетки или след началото на култивирането в присъствието на фитохеагмутинин. 96 часа по-късно към клетките беше добавен тимидин и включването му беше отчетено на 18ия час. Пролиферацията на клетки, стимулирани в присъствието на 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ човешки серумен албумин (отрицателна контрола) беше приета за 100%. Представените резултати са от най-малко трикратно повторени опити. Всяка точка от графиката представлява средната радиоактивност на четири ямки. Стойностите на стандартните отклонения на средните стойности са по-малки от 10%.

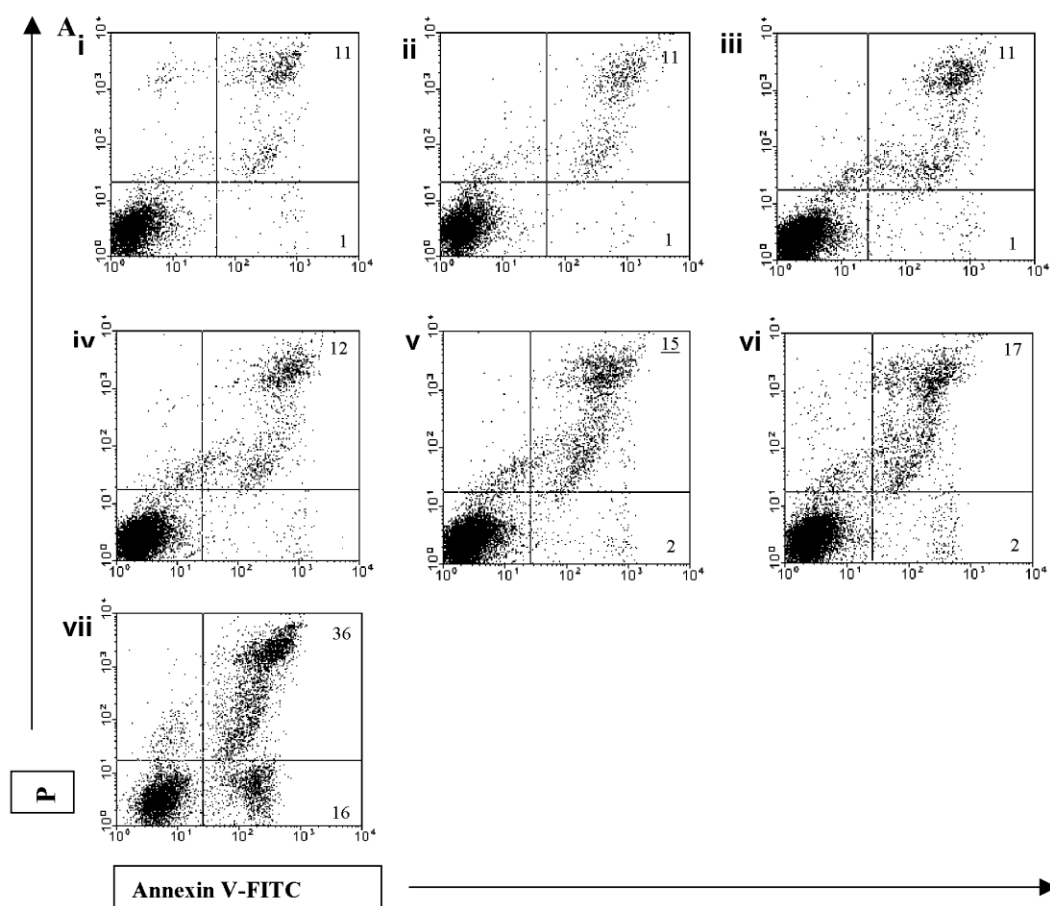


Фигура 2. Ефект на ИВИг (черни квадрати), на ИВИгМ (черни кръгчета), както и на смес от ИВИг и ИВИгМ (бели кръгчета) върху пролиферацията на четири човешки туморни клетъчни линии - CEM (Т-клетки), Raji (В лимфобласти), MM6 (промоноцити) и HL60 (миеломоноцити), както и на човешко/мишата хетерохибридома M061. ^3H -тимидинът беше прибавен 72 часа след началото на култивирането.

1.2. Ефект на ИВИгМ върху апоптозата на СЕМ клетки

Клетки от линията СЕМ, бяха култивирани за 24 часа в присъствието на нарастващи концентрации на ИВИгМ или на IgM фракция, изолирана от серум на пациент с болестта на Валденщром. След това клетките бяха промити със свързващ буфер и оцветени с Анексин V, конюгиран с FITC, както и с пропидиев йодид.

Беше установено, че култивирането на СЕМ клетките в присъствието на 0.0125 mM или на по-високи концентрации на сборен IgM предизвиква апоптоза (Фигура 3 v, vi, vii), докато такъв ефект не се наблюдава при по-ниските концентрации от препарата (Фигура 3 iii, iv). При култивиране на същите клетки с по-ниски концентрации на ИВИгМ или на IgM фракция, изолирана от серум на пациент със синдром на Валденщром, беше установено подтискане на пролиферацията им, но не беше повлияна апоптозата им (Резултатите не са показани).



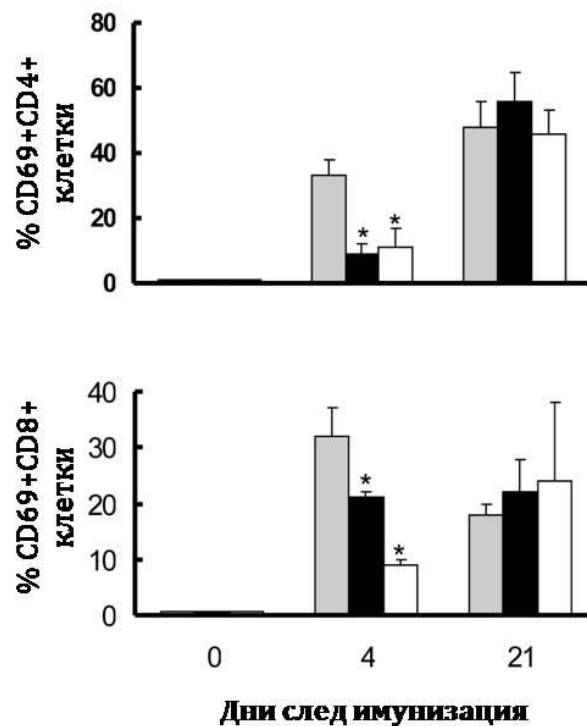
Фигура 3. Оцветяване на СЕМ T клетки с Анексин V-FITC. Същите бяха култивирани за 24 часа само в среда (i); с 20 $\mu\text{g/ml}$ 0.03 mM човешки

серумен албумин (ii); с 0.003 mM ИВИгМ (iii); 0.006 mM ИВИгМ (iv); 0.0125 mM ИВИгМ (v); 0.025 mM ИВИгМ (vi) или с 0.05 mM ИВИгМ (vii). Клетките бяха оцветени с Анексин V-FITC и с пропидиев йодид.

1.3. Ефект на ИВИгМ върху Т клетъчното активиране *in vivo*

Групи от женски SCID мишки бяха инжектирани интраперитонеално с 1×10^8 периферни кръвни мононуклеарни клетки, получени от кръв на здрави възрастни донори. На следващия ден животните бяха инжектирани с единична доза (400 мг/kg) от ИВИг, с еквимоларни количества от изследвания препарат ИВИгМ (2100 мг/kg) или с човешки серумен албумин (170 мг/kg). Групи от опитните животни бяха убити на 4, 7, 14 и 21 ден след третирането. Беше взета кръв и перитонеални клетки, а също така бяха приготвени и клетъчни суспензии от слезка, тимус и периферни лимфни възли от отделните животни. Успешното „хуманизиране“ на животните беше потвърдено от измерването на нивата на човешките имуноглобулини в серумите им – над 2 мг/мл серум.

Беше отчетено много голямо повишение в експресията на всички изследвани активационни маркери върху Т-лимфоцитите през първата седмица след интраперитонеалното инжектиране на човешките клетки. На четвъртия ден бе отчетено драматично понижение на процента CD69+CD8 и на CD69+CD4 - положителните Т клетки при животните, третирани и ИВИг или с ИВИгМ (Фигура 4). Нямаше разлика в експресията на другите активационни маркери (CD25, HLA-DR и CD45RO) (Резултатите не са показани).



Фигура 4. Третирането на „хуманизирани“ SCID мишки с ИВИг или с ИВИгМ забавя експресията на ранния активационен маркер CD69 върху човешките CD4+ и CD8+ Т клетки. Този ефект беше отчетен след въвеждане на единична доза от 400 mg/kg ИВИг (черни стълбчета) или на еквимоларно количество от ИВИгМ (бели стълбчета). Човешкият серумен албумин (сиви стълбчета) беше използван като отрицателна коинтрола.

2. Химерни молекули (на основата на IgG препарати)

2.1. Би-специфични химерни молекули

2.1.1. Конструирание и охарактеризиране на би-специфични химерни молекули

При първите експерименти от тази група, бяха конструирани химерни анти тялови молекули, за които се предполагаше, че ще въздействат избирателно върху активността на патологичните Хистон 1-специфични В-клетки. Тези би-специфични молекули съдържаха копия от пептида H1'22-42 (Ac-STDHPKYSDMIVAAIQAЕKNR-NH-(CH₂)₆-NH₂- част от молекулата на Хистон 1), свързани ковалентно към моноклонално анти тяло (2.4G2), специфично към мишия CD32

(FcγIIb рецептор). Използваният пептид е бил елуиран от МНС клас II молекули на антиген-представящи клетки от лупусни мишки. За същия пептид се знае, че стимулира автоимунните Th-клетки, които от своя страна са отговорни за увеличената продукция на патологичните анти-ядрени антитела. Този пептид има в структурата си и B-клетъчен епитоп. Бяха конструирани и две контролни химерни молекули. Първата беше получена чрез свързване на копия от пептид Ас-PDAASRMAЕТYHKDSVQNHK-NH-(CH₂)₆-NH₂, съдържащ същите аминокиселини като H1'22-42, но в различна последователност, към 2.4G2 антитялото (Контролна химера 1). При втората контролна химера, хистоновият пептид Ас-STDHPKYSDMIVAAIQAEKNR-NH-(CH₂)₆-NH₂ беше свързан ковалентно към моноклоналното антитяло I/9 от същия изотип (IgG2b), като 2.4G2, но с различна антигенна специфичност (Контролна химера 2). (Фигура 5).



Фигура 5. Схематично представяне на химерните молекули. При конструирането на 2.4G2-H1'22-42 химерната молекула и на Контролна химера 2 беше използван пептид, който е част от молекулата на Хистон 1, докато при Контролна химера 1 беше използван пептид, изграден от същите аминокиселини, но подредени в различна последователност.

Пептидите, участващи в структурата на химерната молекула 2.4G2-H1'22-42, биха могли да се свържат и към аспаргинова или глутаминова аминокиселини в антиген-свързващите участъци на антитялото и по този начин да попречат на взаимодействието между антитяловата част от химерата и рецептора FcγRIIb. Тази възможност беше отхвърлена при експеримент, при който беше подтиснато по дозо-зависим начин свързването на търговско 2.4G2 антитяло, конюгирано с FITC от конструираната химерна молекула 2.4G2-H1'22-42.

Резултатите показват, че антиген-свързващите участъци на антитялото не са променени и тяхната антиген-свързваща активност не е повлияна в резултат на конюгирането. Беше доказано, че антитялото, изграждащо химерата 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂, е запазило способността си да се свързва съответно с FcγRIIb рецептора върху прицелните автореактивни клетки (Резултатите не са показани).

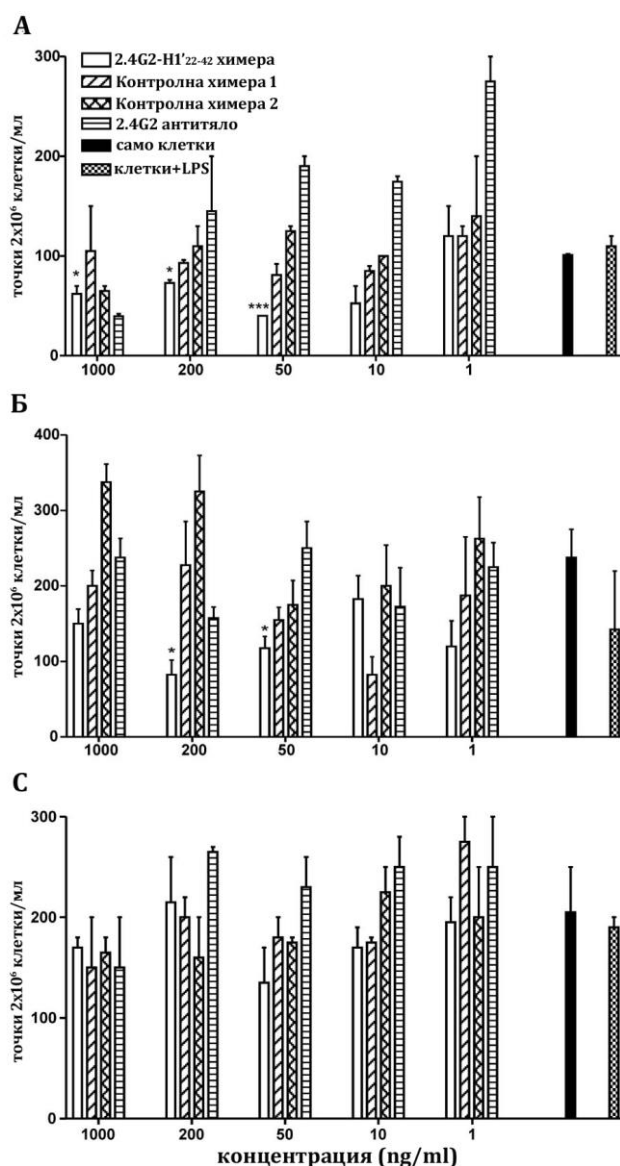
За доказване присъствието на пептида H1'₂₂₋₄₂ със запазени антигенни свойства в антитяловата химера, сборен серум от зайци, имунизирани и трикратно реимунизирани със същия пептид, беше подложен на крос-блот анали. Беше доказано, че пептидите, участващи в структурата на химерната молекула, са запазили В-клетъчния си епитоп и следователно могат да се разпознаят от специфичните към Хистон 1 В-клетъчни рецептори (Резултатите не са показани).

За да охарактеризираме клетъчната популация, която е прицелна за действието на конструираната химерна молекула, MRL/lpr миши спленоцити бяха инкубирани с химерата и свързването и към CD19+ и CD3+ клетки беше проследено чрез проточна цитометрия. Беше установено, че тя се свързва само с В-клетъчната популация от спленоцитната суспензия (Резултатите не са показани).

2.1.2. Ефект на би-специфичните химерни молекули върху Хистон 1- и върху двДНК-специфични В лимфоцити

Анализът на ефекта на химерните антитялови молекули върху диференцирането на В клетките, специфични към Хистон 1 и към двойноверижна ДНК, беше проведен *in vitro* върху спленоцити от лупусни MLR/lpr мишки, имунизирани двукратно с ваксина срещу дифтерия и тетанус. Клетките, изолирани 10 дни след реимунизацията, бяха култивирани за 5 дни в присъствието на различни концентрации на отделните химери. Броят на плазмоцитите, синтезиращи анти-Хистон 1, анти-дв ДНК и анти-дифтерийни IgG антитела, беше определен чрез ензимно-свързан имуноточков (ELISPOT) тест. Култивирането в присъствието на бактериален LPS (мощен поликлонален активатор на мишите В-лимфоцити) не увеличи допълнително броя на антитяло-продуциращите В клетки, което показва, че повечето от В лимфоцитите с изследваните специфичности са били вече активирани. Никоя от прибавените по време на култивирането химери не повлия броя на клетките, синтезиращи анти-дифтерийни антитела. Наблюдавано беше обаче, че добавянето на химерата 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂ към средата за култивиране, доведе до дозо-зависимо

понижение броя на плазмоцитите, синтезиращи антитела от клас IgG срещу Хистон 1 и срещу двДНК (Фигура 6).



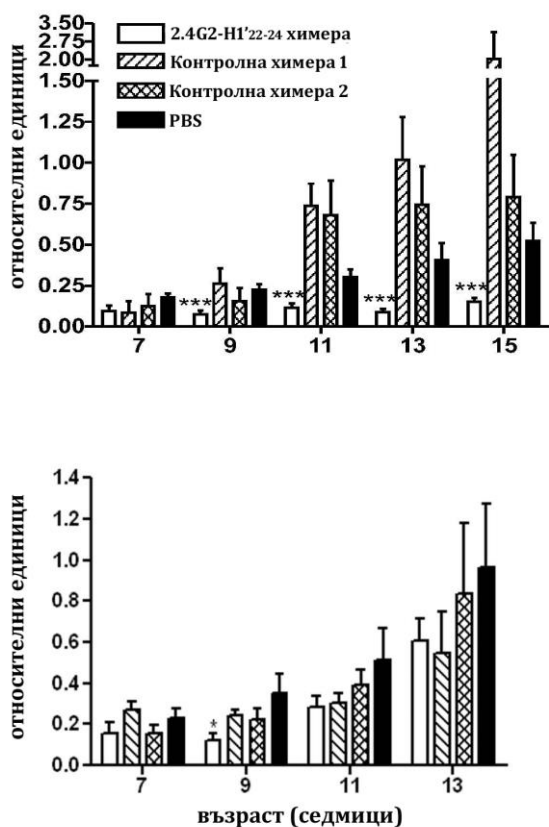
Фигура 6. Ефектът на химерното антитяло 2.4G2-H1'22-42 е специфичен само за прицелните патологични В клетки. Броят на анти-Хистон 1 (А), на анти-двДНК (Б) и на анти-дифтериен токсид-специфични (В) IgG антитяло-продуциращи клетки беше определен чрез ELISPOT. Достоверността на наблюдаваните разлики беше определена с *t*-тест на Стюдънт, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ спрямо контролата – култивиране само на клетки.

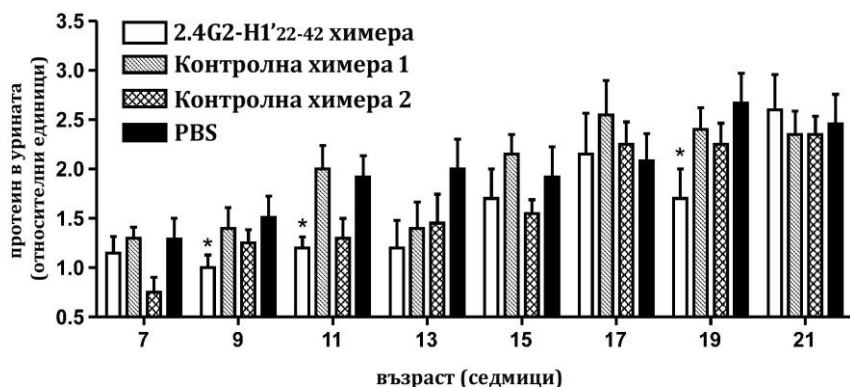
2.1.3. Ефект от прилагането на би-специфичните химерни молекули върху нивата на антителата от клас IgG срещу Хистон 1 и двДНК, както и върху нивата на протеинурия при MRL/lpr мишки

Ефектът от въвеждането на химерните молекули беше изследван върху групи от MRL/lpr мишки, спонтанно развиващи лупусо-подобно заболяване. Първата група включваше животни на възраст 7 седмици,

които са все още здрави, но появата на лабораторните показатели на болестта е предстояща. Животните от втората група бяха на възраст 18 седмици, с висок титър на анти-Хистон 1 и анти-двДНК IgG антитела и с протеинурия. Групите бяха третирани с химерните антитела (20 мкг/мишка) или само с PBS в продължение на 8 седмици. Беше използван ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) за определяне нивата на анти-Хистон 1 и анти-двДНК антитела и стандартен лентов тест за определяне нивото на протеинурията.

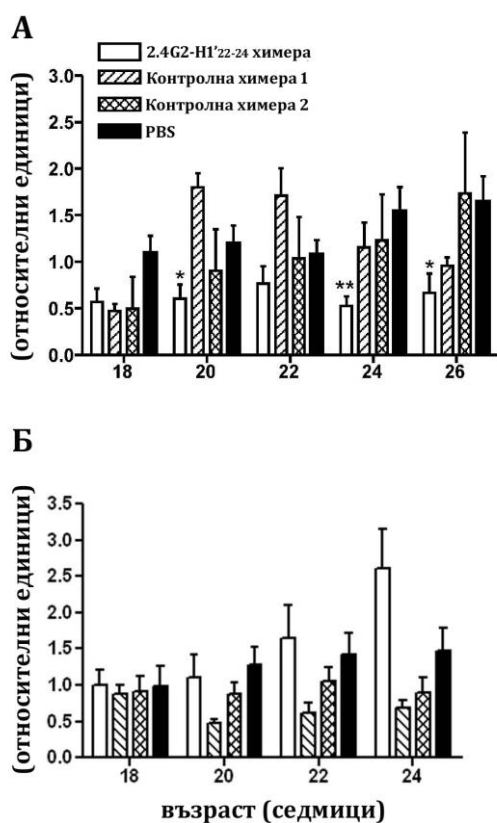
В резултат на инжектирането на химерата 2.4G2-H1'22-42 при групата от млади животни беше предотвратена появата на антитела срещу Хистон 1 за 8 седмици. Също така беше отчетен ефект върху нивата на двДНК (Фигура 7). Наблюдаваше се и понижение на протеинурията при третираните мишки (Фигура 8).



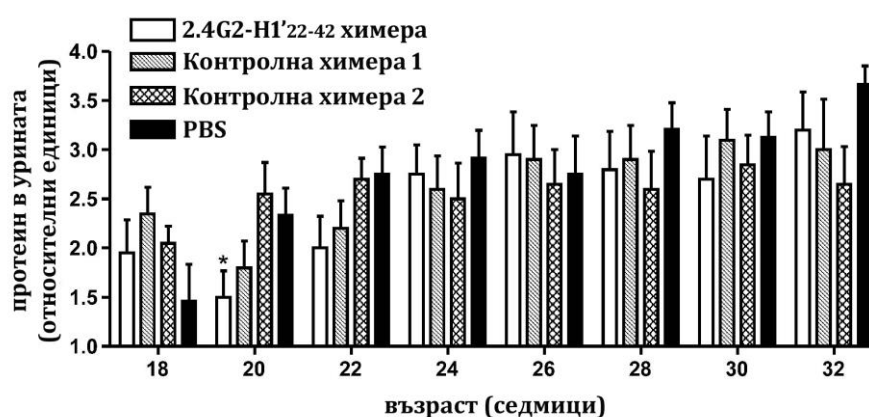


Фигура 8. Ефект от прилагането на конструираните химерни антитела върху нивата на протеинурията при 7 седмични MRL/lpr мишки. * $p < 0.05$ спрямо контролната група от мишки третирани с PBS, *t*-тест на Стюдънт.

При започване инжектирането на химерната молекула 2.4G2-H1'22-42 на групата от 18 седмични мишки, беше предотвратено покачването на нивата на антителата срещу Хистон 1 (Фигура 9А) и се наблюдаваше леко понижение на протеинурията (Фигура 10). Не беше отчетен ефект от третирането върху нивата на анти-двДНК антитела (Фигура 9В).



Фигура 9. Влияние на конструираните химерни антитела върху нивата анти-Хистон 1 (А) и анти-двДНК антитела (Б) при болни 18-седмични MRL/lpr мишки ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ изчислена спрямо контролната група от мишки третирани с PBS, *t*-тест на Стюдънт.

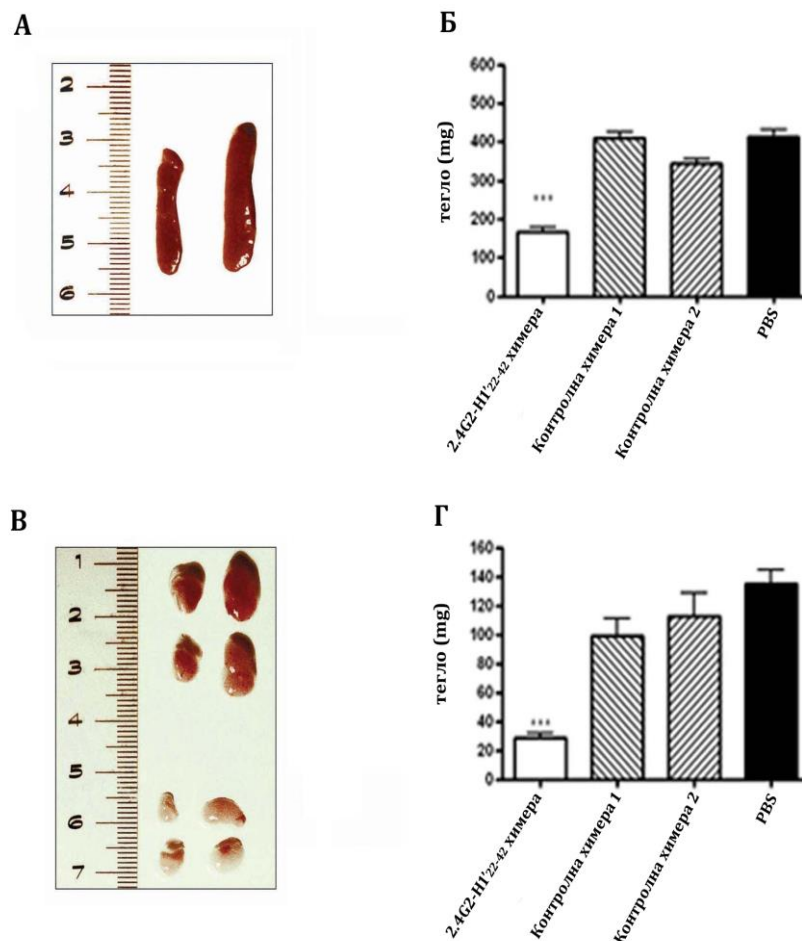


Фигура 10. Ефект на конструираните химерни антитела върху нивата на протеинурията при 18 седмични MRL/lpr мишки. * $p < 0,05$ изчислена спрямо контролната група от мишки третирани с PBS, *t*-тест на Стюдънт.

Периодът на третиране беше ограничен до 8 седмици, тъй като по-късно при животните и от двете възрастови групи се появяваха анти-плъши имуноглобулинови антитела. Това се дължи на факта, че моноклоналните антитела, изграждащи химерните молекули, са плъши. Наличието на миши анти-плъши антитела в серумите на опитните животни, беше доказано чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (Резултатът не е показан).

2.1.4. Ефект на би-специфичната химерната молекула 2.4G2-H1'22-42 върху размерите на лимфните органи и върху развитието на кожни лезии при лупусни мишки.

Групи от по 10 женски животни на възраст 7 седмици, бяха третирани два пъти седмично, в продължение на 8 седмици с по 20мкг от 2.4G2-H1'22-42 химерата, от Контролната химера 1, от Контролната химера 2 или само с PBS. След края на третирането, всички животни от контролните групи, имаха увеличени размери на слезките и лимфните възли, докато същите при третираните животни с 2.4G2-H1'22-42 химерата бяха с достоверно по-малки размери (Фигура 11).



Фигура 11. Третирането на експерименталните животни с химерата 2.4G2-H1'22-42 води до намаляване размерите на лимфните органи. (А) – типична слезка от мишка, третирана с химерното антитяло (в ляво) и от PBS-инжектирана мишк (в дясно). (Б) – тегло на слезки от животни, третиран с 2.4G2-H1'22-42 химера, с Контролна химера 1, с Контролна химера 2, или само с PBS. (В) – типични аксиларни и ингвинални лимфни възли от третирано с 2.4G2-H1'22-42 химера животно (долна група) и от контролно животно (горна група). (Г) – тегло на аксиларни и ингвинални лимфни възли от животни, инжектирани с 2.4G2-H1'22-42 химера, с Контролна химера 1, с Контролна химера 2, или само с PBS. Достоверността на наблюдаваните разлики беше определена с t-тест на Стюдънт, *** $p < 0.001$ спрямо контролата.

Характерно за мишките от линията MRL/lpr е, че спонтанно развиват възпалителни кожни лезии. Тези прояви на болестта отсъстваха при групата, третирана с химерата 2.4G2-H1'22-42 докато на

20 седмична възраст всички контролни животни ги развиха (Фигура 12; Таблица 1).



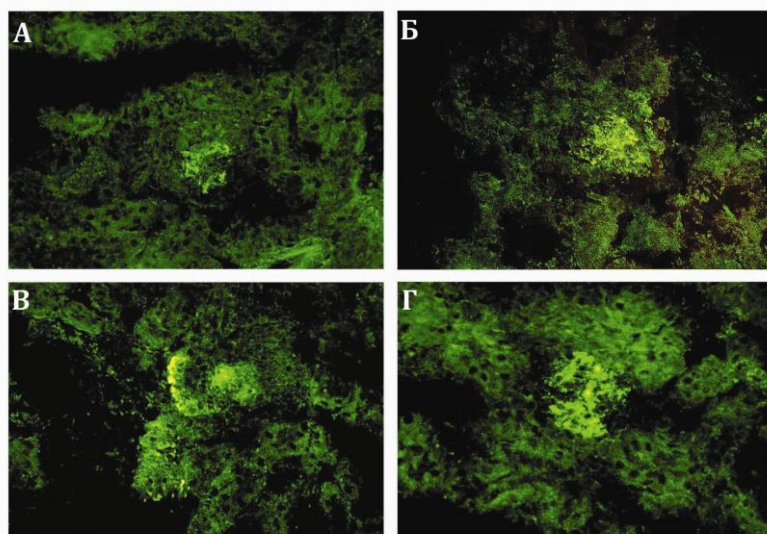
Фигура 12. Третирането с химерата 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂ предпазва от развитието на кожни лезии. **А** – животно, при което, лечението е започнало на 7-седмична възраст; **Б** – животно, при което третирането е започнало на 18-седмична възраст; **В** и **Г** контролни животни на 7 и на 18 седмична възраст, третиран с PBS.

Третиране	животни третиран с 2.4G2-H1' ₂₂₋₄₂ химера	животни третиран с Контролна химера 1	животни третиран с Контролна химера 2	животни третиран само с PBS
Брой животни с кожни лезии	0/10	10/10	9/10	12/12

Таблица 1. Брой животни, развили кожни лезии, в зависимост от приложеното лечение.

2.1.5. Ефект от третирането на лупусни мишки с химерата 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂ върху бъбречното увреждане

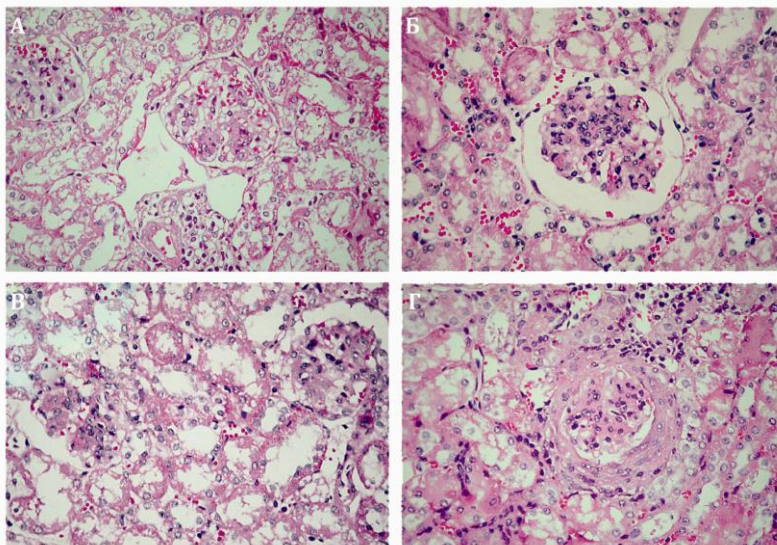
Бяха изследвани чрез имунофлуоресцентен тест криостатни срези от бъбреци на MRL/lpr мишки, третирани с химерните антители и с PBS за наличие на гломерулно отлагане на IgG. При срезите от мишки, лекувани с химерата 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂, се наблюдаваше сегментно мезангиално отлагане на IgG (Фигура 13 А). При останалите животни, третирани с Контролна химера 1, Контролна химера 2 и PBS, беше наблюдавано глобално мезангиално отлагане (Фигура 13 Б, В и Г).



Фигура 13. Отлагане на IgG в бъбречни срезове от MRL/lpr мишки, третирани с 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂ химера (А); Контролна химера 1 (Б); Контролна химера 2 (В) или с PBS (Г).

Парафинови срези от същите бъбреци бяха оцветени с хематоксилин/еозин. При мишките, третирани с химерата 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂, се наблюдаваше интерстициален инфилтрат при запазена хистологична структура на органа (Фигура 14А). При тези, третирани с Контролна химера 1, с Контролна химера 2 и с PBS, беше наблюдаван обилен периваскуларен възпалителен клетъчен инфилтрат, некротични и склеротични участъци и обилна мезангиална клетъчна пролиферация в голяма част от гломерулите (Фигура 14 Б, В, Г).

Тези изследвания бяха направени с любезното съдействие на д-р Тодор Тодоров (от Катедра по патология, Медицински университет, София).



Фигура 14. Бъбречни срези от MRL/lpr мишки, третирани с 2.4G2-H1'²²⁻⁴² химера (А); с Контролната химера 1 (Б); с Контролната химера 2 (В); с PBS (Г), оцветени с хематоксилин/еозин.

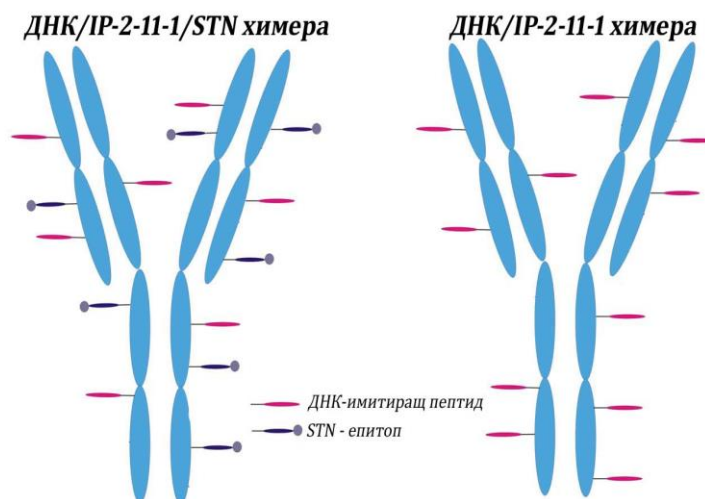
2.2. Три-специфични химерни молекули

Наблюдаваният ефект от конструираните от нас би-специфични химерни молекули беше ограничен от появата на анти-плъщи имуноглобулинови антитела в серумите на опитните животни. Това се очакваше, тъй като антитялото, изграждащо структурата на химерите, е плъще. В опит да избегнем този нежелателен ефект и да повишим ефективността на подобен тип модифицирани антитела, конструирахме и друга серия от три-специфични химерни молекули.

2.2.1. Конструирание и охарактеризиране на три-специфични химерни молекули

Тази серия от химерни молекули се очаква да бъде селективно насочена към ДНК-специфични В-клетки и да ангажира едновременно два техни инхибиращи рецептори – FcγRIIb и CD22. Три-специфичните молекули бяха конструирани от мише моноклонално антитяло (IP-2-11-1), разпознаващо пептид на хемаглутинаина на грипни вируси от тип А, към което, бяха свързани ковалентно копия от ДНК-имитиращ пептид (DWEYSVWLSN) и от гликопротеин (STN-епитоп), съдържащ свободна крайна сиалова. За посочения декапептид е доказано, че се разпознава от патологичните миши IgG антитела, специфични срещу двойноверижната ДНК. Неавтоимунни животните, имунизирани с него, започват да образуват антитела срещу двДНК. STN-епитопът, използван при конструирането на три-специфичните химерни молекули, притежава крайна сиалова киселина – известен лиганд за инхибиращия рецептор CD22.

Беше конструирана и втора химерна молекула, съдържаща същото антительо с прикачен към него ДНК-имитиращ пептид, но без STN-епитоп (Химера ДНК/IP-2-11-1) (Фигура 15).



Фигура 15. Схематично представяне на конструирани химерни молекули.

Беше проведен мас-спектрометричен анализ за установяване на наличието и броя на прикачените пептиди към антительото, изграждащо структурата на химерните молекули. Тези анализи бяха извършени от д-р Павлина Долашка (от Института по Органична химия към БАН) и от Dr Jozef Van Beeumen (Laboratory of Protein Biochemistry and Protein Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium).

След редуциране на дисулфидните мостове, свързващи двете тежки и двете леки вериги на химерното антительо чрез DTT и след пречистването на получените с HPLC фракции, молекулните им маси бяха измерени, с помощта на мас-спектрометър MALDI-TOF-TOF.

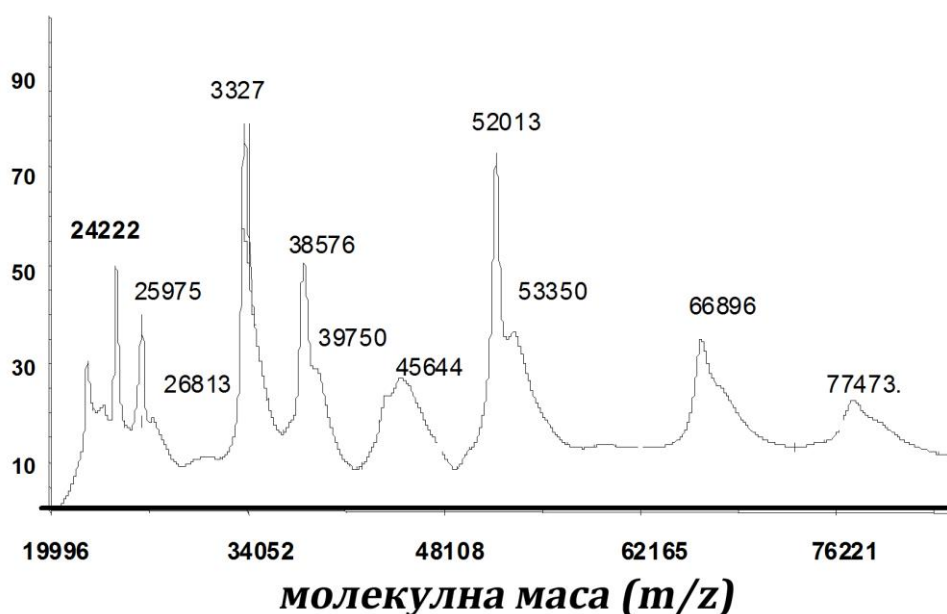
Като контрола беше използвано антительото IP-2-11-1 без прикачени към него пептиди. След пречистването му бяха изолирани две вериги с молекулни маси 24 222 Da и две вериги с молекулни маси 48 229 Da (Резултатите не са показани).

Подобни хроматограми бяха получени и за антителата с прикачени пептиди, като бяха определени точно молекулните им маси.

При пробата, съдържаща моноклонално антительо и прикачени за него копия от ДНК-имитиращия пептид (Химера ДНК - IP-2-11-1), бе изолирана още една фракция с молекулна маса 38 613 Da. След извършване на серия от изчисления, беше установено, че към едната

лека верига на антитялото има прикачени средно **8.05** ДНК-имитиращи пептида ($38613-24126 = 14487:1800 = 8.05$ пептида) или към антитялото при конюгацията на химерната молекула се закачат общо около 16 ДНК-имитиращи пептида. Не са изолирани фракции от тежката верига, към които да са прикачени пептиди.

При пробата, съдържаща двата пептида – (Химера ДНК - IP-2-11-1- STN) с молекулна маса 1300 Da за STN-епитопа и 1800 Da за ДНК-имитиращия пептид, бяха изолирани следните фракции от леките и тежките вериги на антитялото (Фигура 16).



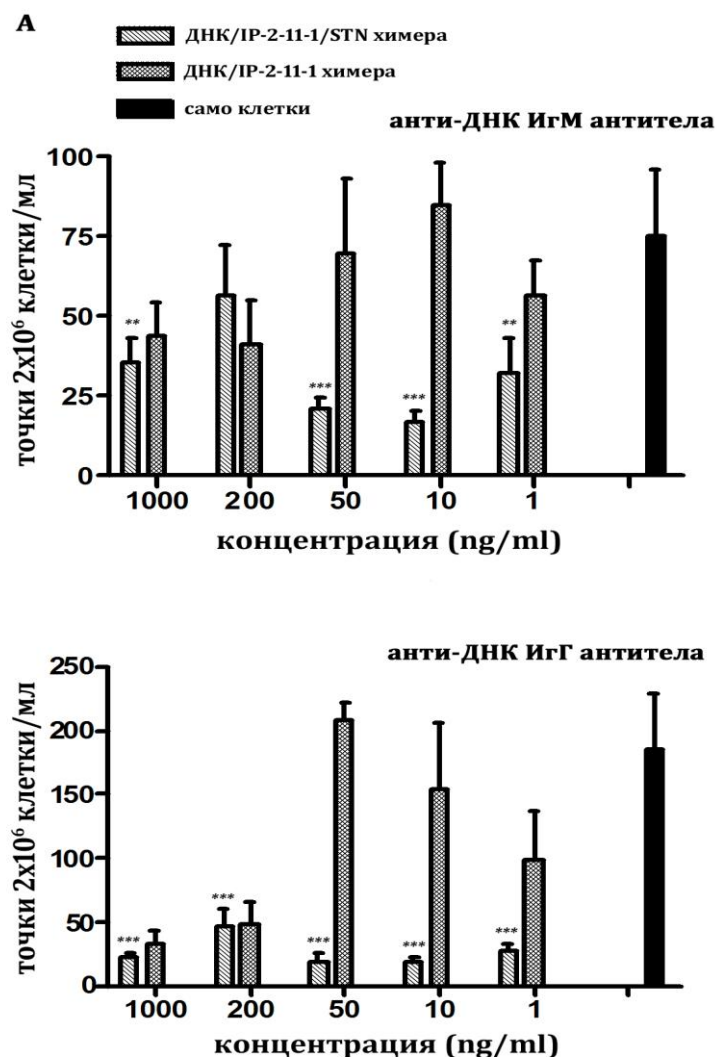
Фигура 16. МАЛДИ-спектър на получените фракции от тривалентното химерно антитяло IP-2-11-1. Същият позволява определяне на броя пептиди с молекулна маса 1300 и с 1800 Da ковалентно свързани към имуноглобулиновата молекула.

След съответните изчисления бе установено, че при конюгирането към леките вериги на антитялото се свързват между 5 и 7 гликопептида и между 3 и 5 ДНК-имитиращи пептида, а към тежките- между 4 и 5 копия на гликопептида. За да охарактеризираме клетъчната популация, която е прицелна за действието на конструираните химерни молекули, спленоцити от линията MRL/lpr мишки бяха инкубирани с химерата и свързването и към CD19+ и CD3+ клетки беше проследено чрез проточна цитометрия. Беше установено, че химерата ДНК - IP-2-11-1- STN се свързва основно към В-клетъчната популация от спленоцитната суспензия. Беше наблюдавано свързване на химерата и към Т-клетки, но то може да се обясни с факта, че и те експресират слабо CD22.

Способността на химерната молекула ДНК/IP-2-11-1/STN да ангажира двата инхибиращи рецептора FcγRIIb и CD22 на повърхността на патологичните В-клетки беше проверена чрез инхибиращ флуоцитометричен анализ, при който тя предотвратяваше свързването на моноклонално анти-CD32 и на анти-CD22 антитела (Резултатите не са показани).

2.2.2. Ефект на три-специфичните химерни молекули върху броя на IgM и IgG анти- двДНК антитяло-секретиращите клетки

Беше използван ELISPOT анализ за доказване избирателността на въздействието на химерните антитялови молекули върху диференцирането на двДНК-специфичните В клетки. Спленоцити от мишки, развиващи лупусоподобно заболяване, бяха култивирани за 5 дни в присъствието на нарастващи концентрации на химерната молекула ДНК/IP-2-11-1/STN и на химерната молекула ДНК/IP-2-11-1. Броят на клетките, секретиращи IgM и IgG анти-двДНК антитела, беше определян с метода ELISPOT. Наблюдавано беше, че прибавянето на химерата ДНК/IP-2-11-1/STN към клетките доведе до дозо-зависимо понижение на броя на тези, синтезиращи анти-двДНК IgM и IgG антитела (Фигура 17). Такова понижение на броя на клетките, синтезиращи анти-дифтерийни IgM и IgG антитела, не беше наблюдавано при никоя от прибавените по време на култивирането химери (Резултатите не са показани).



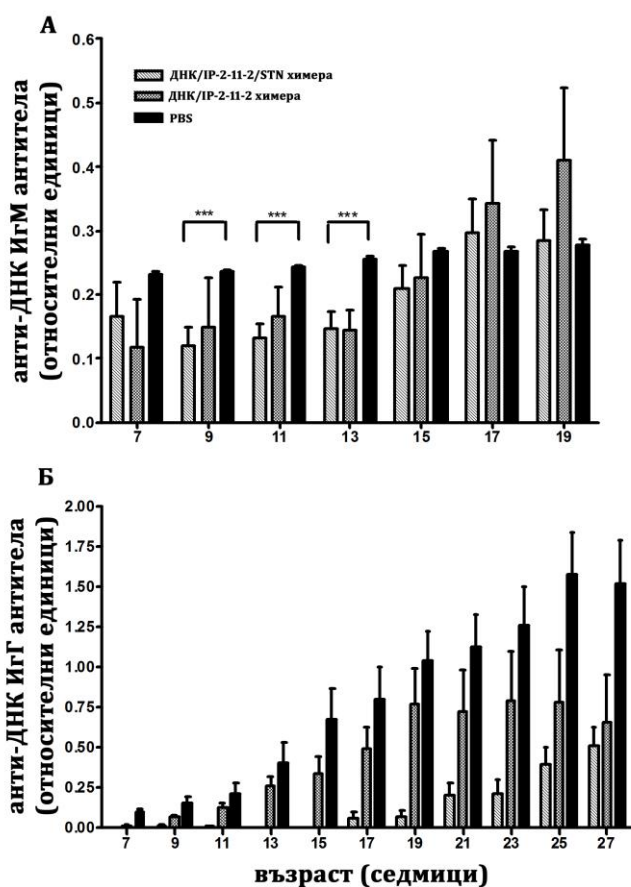
Фигура 17. Химерната молекула ДНК/IP-2-11-1/STN, добавена към средата за култивиране, води до понижение в броя на IgM- и на IgG-синтезиращите В-клетки.

2.2.3. Ефект от въвеждането на три-специфичните химерни молекули на MRL/lpr мишки върху нивата на антителата от клас IgM и от клас IgG срещу двДНК

Бяха проведени и *in vivo* експерименти за установяване ефекта на химерните конструкти върху развитието на болестта. Бяха използвани групи от женски мишки от линията MRL/lpr на 7- и 18-седмична възраст. Животните бяха инжектирани интравенозно, два пъти в седмицата с по 20 μ g от протеиновите комплекси или само с PBS. На всеки две седмици мишките бяха кръвопускани и нивата на анти-ДНК антитела в получените серуми бяха определяни с ензимно-свързан имуносорбентен метод.

В резултат на инжектирането на химерата ДНК/IP-2-11-1/STN, при групата от млади животни имаше задържане нарастването на нивата на IgM антителата и предотвратяване появата на IgG антитела срещу двДНК за продължителен период от време (Фигура 18).

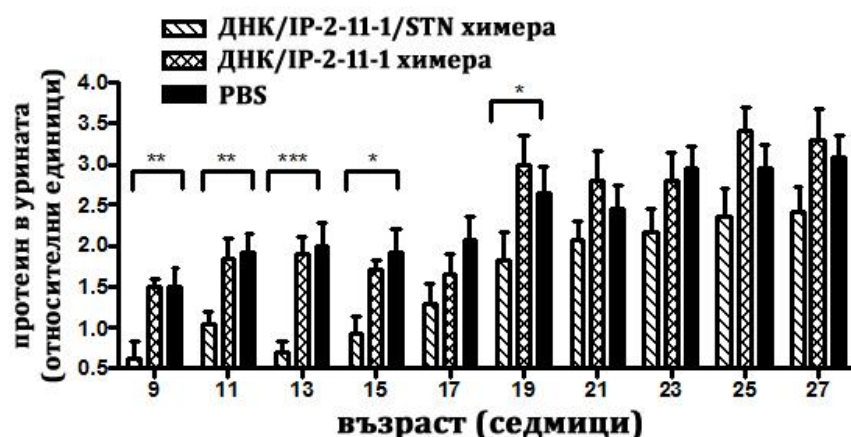
Не се наблюдаваше ефект на химерите върху нивата на същите антитела в случаите, когато лечението беше започнато на 18-седмична възраст (Резултатите не са показани).



Фигура 18. Ефект на конструираните химерни антитела върху нивата на IgM (А) и IgG (Б) анти-ДНК антитела при 7 седмични MRL/lpr мишки *** $p < 0.001$ изчислена спрямо контролната група от мишки третирани с PBS, *t*-тест на Стюдът.

2.2.4. Ефект от прилагането на три-специфичните химерни молекули върху нивата на протеинурията

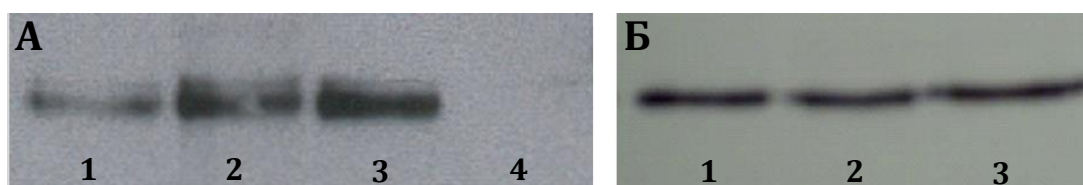
Беше проследено и влиянието на химерните антитялови молекули върху нивата на протеинурия при групите от животни, инжектирани с химерата ДНК/IP-2-11-1/STN, с химерата ДНК/IP-2-11-1 или само с PBS. Ефект беше наблюдаван само при животните при които третирането е започнало на 7 седмична възраст (Фигура 19).



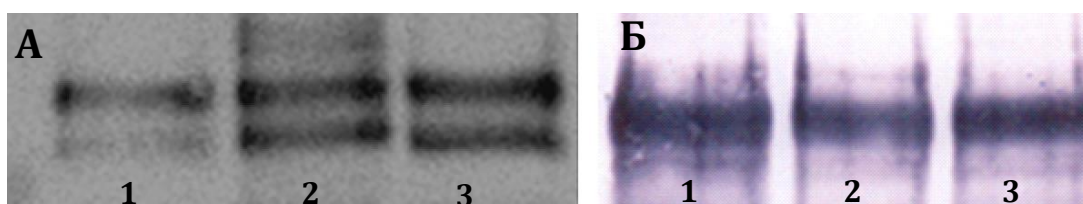
Фигура 19. Нива на албуминурията в групата от млади животни, третирани с химерата ДНК/IP-2-11-1/STN, с химерата ДНК/IP-2-11-1 или само с PBS.

2.2.5. Вътреклетъчно сигнализиране

На следващия етап от изследванията трябваше да се провери дали три-специфичната химерна молекула предизвиква фосфорилиране на тирозина в ITIM-мотивите и на двата инхибиращи рецептора - FcγIIb и CD22. За тази цел спленоцити от лупусни MRL/lpr мишки бяха инкубирани с химерното антитяло (10μg/ml) за 20 мин. на лед, след което за още 3 мин. на 37 °C. След спиране на реакцията, клетките бяха лизирани и беше извършена имунопреципитация на FcγIIb и на CD22. Като положителна контрола за наличието на фосфорилиране бяха използвани клетки, инкубирани с перванадат. Беше наблюдавано силно фосфорилиране на тирозиновите остатъци в ITIM мотивите и на двата инхибиращи рецептора (Фигура 20А и Фигура 21А). Същите проби бяха анализирани и за доказване наличието на FcγIIb (Фигура 20Б) както и на CD22 (Фигура 21Б).



Фигура 20. Фосфорилиране на $Fc\gamma IIb$. **(А)** Спленоцити от MRL/lpr мишки бяха инкубирани с три-специфичната химерна молекула, бяха лизирани и беше извършена имунопреципитация на инхибиращия $Fc\gamma IIb$ рецептор; 1. само клетки; 2. клетки стимулирани с перванадат; 3. клетки инкубирани с химерното антитяло ($10\mu g/ml$); 4. клетъчна линия не-експресираща $Fc\gamma IIb$; **(Б)** Същите преципитати бяха подложени на SDS-гел електрофореза и беше извършен блот за анти- $Fc\gamma IIb$; 1. само клетки; 2. клетки стимулирани с перванадат; 3. клетки инкубирани с химерното антитяло ($10\mu g/ml$);



Фигура 21. Фосфорилиране на CD22. **(А)** Спленоцити от MRL/lpr мишки бяха инкубирани с три-специфичната химерна молекула, бяха лизирани и беше извършена имунопреципитация на инхибиращия CD22 рецептор; 1. само клетки; 2. клетки стимулирани с перванадат; 3. клетки инкубирани с химерното антитяло ($10\mu g/ml$); **(Б)** Същите преципитати бяха подложени на SDS-гел електрофореза и беше извършен блот за анти-CD22; 1. само клетки; 2. клетки стимулирани с перванадат; 3. клетки инкубирани с химерното антитяло ($10\mu g/ml$);

ОБСЪЖДАНЕ

Основна цел на дисертационния труд беше да се охарактеризира имуномодулиращата активност на нови експериментални IgM- и IgG-съдържащи имуноглобулинови препарати.

В представените резултати се обсъждат ефектите на сборен човешки имуноглобулин М препарат върху клетки на имунната система и се сравняват с вече добре извесните ефекти на сборния

човешки терапевтичен IgG препарат, който се използва в клиниката повече от 20 години. Получените резултати показват, че ИВИгМ качествено наподобява вече извесните *in vitro* ефекти на ИВИг. Основно различие между двата препарата е в това, че ИВИгМ подтиска пролиферацията на нормални Т-клетки и на хематопоеични клетъчни линии в моларни концентрации до сто пъти по-ниски от тези на ИВИг.

Известно е, че при инжектирането на човешки периферни кръвни клетки в имунодефицитни SCID мишки, те преживяват като се извършва селекция и активиране на тези с анти-миша специфичност (Tary-Lehmann M, et al., 1995). Инжектирането на еднократна доза ИВИг (400 mg/kg; еквивалентна на прилаганата при автоимунно болни), както и на еквимоларна доза ИВИгМ, доведе до понижаване експресията на ранния активационен маркер CD69 върху човешките Т-клетки, въведени в SCID мишките. Такова подтискане не бе наблюдавано при стимулиране с РНА на периферни кръвни клетки *in vitro* в присъствието на ИВИг и ИВИгМ.

Сходните биологични активности на ИВИг и ИВИгМ се изразяват и в индуциране на апоптоза при нормални човешки кръвни клетки и при туморни клетъчни линии (Varambally S, et al., 2004; Prasad NK, et al., 1998). Докато ИВИгМ индуцира апоптоза при човешки клетки в концентрации по-високи от 0.0125 mM (Varambally S, et al., 2004), при по-ниски концентрации има анти-пролиферативен ефект.

Способността на ИВИгМ да повлиява по дозо-зависим начин човешки Т- и В-клетъчни функции може да предполага, че пациенти с Валденстром, страдащи от макроглобулинемия, страдат и от различни вторични имуномедиирани заболявания (Pilarski LM, et al., 1989; Jonsson V, et al., 1999; Jonsson V, et al., 1999; Owen RG, et al., 2001). Въпреки, че етапите от клетъчния цикъл, при които ИВИгМ оказва антипролиферативен и проапоптичен ефект остават неясни, изглежда, че препаратът действа на повече от една фаза. Кръстосаното свързване на BCR от страна на IgM антителата отключва каскада от сигнали, които могат да имат за резултат блокиране на пролиферацията и клетъчната смърт на В-лимфоцитите (Marches R, et al., 2001). IgM-индуцираната клетъчна смърт води до понижаване на трансмембранный потенциал на митохондриите по време на ранните фази на апоптозата. Такъв широк спектър на действие на ИВИгМ може да е свързан и със способността му да разпознава фактори на растежа и цитокини. Установено е, че взаимодействието на ИВИгМ с Fas води до индуциране на апоптоза при някои клетъчни типове (Varambally S, et al., 2004). Има

доказателства, че ИВИгМ може да разпознава различни цитокини подобно на терапевтичния ИВИг (Bendtzen K, et al., 2003). Способността на ИВИгМ да проявява анти-пролиферативен ефект и едновременно с това да има и про-апоптично действие, може да се окаже от голямо значение за вероятното му бъдещо клинично приложение.

Наблюдаваните ефекти на ИВИгМ може да се държат на взаимодействия опосредствани от неговите Fc μ или F(ab) $_2$ фрагменти, както това вече е доказано и за ефектите на сборния терапевтичен IgG (Mouthon L, et al., 1996). Извесно е, че анти-пролиферативното действие на терапевтичния ИВИг се дължи отчасти на свързването му с инхибиращия Fc γ RIIb рецептор върху макрофагите (Samuelsson A, et al., 2001; Bruhns P, et al., 2003). Друго възможно обяснение на наблюдаваните ефекти на ИВИгМ е образуването на комплекси с комплемента и последстващото им свързване към инхибиращите CR1 (CD35) рецептори върху човешките В-клетки (Jozsi M, et al., 2002). Този механизъм не може да обясни резултатите, получени при *in vitro* култивиране на човешки клетки в присъствие на ИВИгМ, тъй като комплемент в средата липсва. Наблюдаваните ефекти може да са свързани и с F(ab) $_2$ -зависими взаимодействия с прицелни молекула върху повърхността на Т- или на В-лимфоцитите. Сборният IgM може да съдържа антитела с неочаквани специфичности. Например, доказано е, че ИВИгМ съдържа антитела, които се свързват към антигена NB-p260 на повърхността на човешки необластомни клетки и предизвикват апоптозата им (David K, et al., 1999).

Получените в настоящата дисертационна работа данни за способността на високо пречистен ИВИгМ препарат да модулира Т - и В - клетъчните функции представляват допълнителен аргумент за неговия лечебен потенциал. Вливането на големи дози ИВИг се използва от години като стандартно имуномодулиращо средство при голям брой органно-специфични и системни автоимунни и възпалителни заболявания. Ефектът на ИВИгМ върху В- и Т-клетъчните функции е сходен в качествено отношение, но значително по-мощен от този на ИВИг. Това ни позволява да предположим, че при някои имунопатологични състояния, ИВИгМ би имал по-добър лечебен ефект, отколкото ИВИг.

Все още не съществуват ефективни лечебни подходи при пациенти с автоимунни заболявания, насочени специфично срещу свързаните с болестта автореактивни В-клетки.

В настоящата дисертационна работа доказахме, че е възможно селективно подтискане на автореактивните В-лимфоцити, като се използват химерни антитялови молекули, свързващи кръстосано един или повече инхибиращи рецептора с автоантиген-специфичните рецептори по повърхността на една и съща В-клетка. Бяха конструирани няколко серии антитялови химери. Една част от тях ангажират едновременно инхибиращия FcγIIb рецептор и Хистон 1-специфичен В-клетъчен рецептор на повърхността на прицелните патологични клетки (би-специфични химерни антитялови молекули). Другата част от конструираните хибридни антитела, ангажират едновременно два инхибиращи рецептора (FcγIIb и CD22) и ДНК-специфичен В-клетъчен рецептор на повърхността на прицелната клетка (три-специфични химерни антитялови молекули).

Интравенозното третиране на млади мишки от линията MRL/lpr с конструираните химерни молекули, предотвратява появата на свързаните с болестта авто-антитела и забавя за определен период бъбречните изменения.

В своята структура, синтезираните химерни молекули съдържат IgG антитялова молекула, която е или специфична към FcγIIb рецептора или се свързва с него чрез Fc-часта си. Следователно, химерните молекули неизбежно ще се свързват и към други клетки, освен към прицелните Хистон 1- и ДНК-специфични В-лимфоцити. След инжектирането им, обаче, химерните антитела би трябвало да се свързват предимно с последните. Общият авидитет на това взаимодействие е произведение от афинитетите на свързване на антитялото към FcγIIb и на пептидите към останалите прицелни рецептори (Хистон 1- и ДНК-специфични В-клетъчни рецептори, CD22). Дори и тези афинитети на взаимодействие да са ниски, произведението им, т.е. стойността, характеризираща авидитета е неизбежно значима.

При част от конструираните молекули като автоантиген беше използван естествен пептид от молекулата на Хистон 1 (H1'₂₂₋₄₂ пептид). Той е бил елуиран от молекулите на ГКТС от втори клас на антиген-представящи клетки от лупусни SNF1 мишки. Доказано е, че стимулира автоимунните Th клетки, които, от своя страна усилват производството на патологичните анти-ядрени антитела. Също така, беше доказано, че имунизацията на тези животни с пептида H1'₂₂₋₄₂ води до ускоряване развитието на гломерулонефрита им (Kaliyaperumal, A., et al., 2002).

In vitro анализът на ефекта на тези би-специфични молекули върху слезкови клетки от лупусни MRL/lpr мишки доказва, че

прибавянето на химерна молекула 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂ към средата за култивиране, доведе до дозо-зависимо понижение в броя на плазмоцитите, синтезиращи антитела от клас IgG срещу Хистон 1 и срещу двДНК. Никоя от прибавените по време на култивирането химери не повлия върху броя на клетките, синтезиращи анти-дифтерийни IgG антитела. С това беше доказана специфичността на действие на химерната би-специфична антитялова молекула. В резултат от въвеждането на хибридна молекула при *in vivo* експериментите, при групата с млади животни беше подтисната появата на антитела срещу Хистон 1 (за 8 седмици), беше повлияна синтезата на анти-двДНК антителата и беше намалена протеинурията. При лечението на болните (18 седмични) животни, бе предотвратено покачването на нивото на антителата срещу Хистон 1 и се наблюдава леко задържане в нивата на протеинурията. Ефект върху анти-двДНК антителата не беше наблюдаван.

Беше отчетен ефект на би-специфичните химерни молекули и върху развитието на характерните за MRL/lpr линията кожни лезии и върху размерите на лимфните органи. При животните от двете възрастови групи, третирани с хибридните молекули 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂, беше подтисната появата на кожни лезии в областта на врата, около очите и носа и беше наблюдавано намаление в размерите на лимфните органи. При бъбречните срези от мишките, третирани с химерата 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂, се наблюдаваше само сегментно мезангиално отлагане на IgG, докато при контролните групи беше наблюдавано глобално мезангиално отлагане. Същите бъбреци бяха подложени и на стандартно хистологично изследване. При животните, третирани с би-специфичното антитяло 2.4G2-H1'₂₂₋₄₂, се наблюдаваше интерстициален инфилтрат и запазена хистологична структура, докато при останалите групи беше наблюдаван обилен интерстициален инфилтрат и глобална мезангиална клетъчна пролиферация.

Благоприятният ефект, наблюдаван при третираните животни, не бе продължителен. Една от причините за това е, че моноклоналното антитяло 2.4G2, изграждащо структурата на би-специфичната молекула, е плъще и това неминуемо предизвиква появата на анти-плъши антитела у третираните животни. Това неизбежно предизвиква елиминиране на въвежданите химерни антитялови молекули и до загуба на имуномодулиращото им действие. Друга причина за кратката продължителност на ефекта е наличието на популация от дълго-живуци плазматични клетки, продуциращи анти-Хистон1 и анти-двДНК IgG антитела. Тези клетки не експресират на

повърхността си FcγIIb рецептори и следователно не могат да бъдат подтиснати с конструираната от нас химерна молекула. При помладите MRL/lprg мишки има по-малко патологични плазмоцити, докато при групата възрастни мишки, при които болестта е в напреднал стадий, е на лице по-голям брой. С това може да се обясни и по-слабият лечебен ефект при последните. Въвеждането на би-специфичната химерна молекула очевидно забавя пролиферацията и диференциацията на патологичните В-клетки и забавя попълването на пула от плазмоцити, синтезиращи автоантитела. Наблюдаваното подтискане върху нивата на анти-Хистон 1 IgG антителата и отчасти върху анти-двДНК IgG антителата, както и забавянето на гломерулонефрита, не се отразиха върху преживяемостта на животните.

Във втората част на настоящата дисертация беше доказано, че чрез използване на би-специфични антитялови молекули, е възможно да се подтисне селективно синтезата на анти-Хистон 1 антитела и едновременно с това да се повлияе върху продукцията на анти-ДНК антителата. Това може да се обясни с вече описания феномен на „tolerance spreading”, при който индуцираната толерантност на свързани с болестта лимфоцити с определена специфичност, води и до подтискане на патологични В- и Т- клетки с други специфичности (Kaliyaperumal, A., et al., 1999). Възможна последователност на събитията при действието на би-специфичната химера 2.4G2-H1’₂₂₋₄₂ може да е – подтискане на патологичните Хистон 1-специфични клетки, в резултат на което се подтиска представянето на нуклеозомните антигени към Th-клетките. Като резултат, антитяловият отговор срещу двата нуклеозомни компонента (хистони и ДНК) отслабва (Shlomchik, M. J., et al., 2001; Kang, H.-K., et al., 2005; Steinman, L., 1996).

Нашите резултати показаха, че конструираната би-специфична химера се свързва към В-клетки, но не и към Т-клетки. Въздействието чрез химерата 2.4G2-H1’₂₂₋₄₂ с патологичните Хистон 1-специфични В-лимфоцити води до подтискане активността им, както и до понижаване броя на Т-клетките, разпознаващи нуклеозомите, първите авто-антигени индуциращи заболяването (Mohan, C., et al., 1993).

Хроматинът съдържа множество структурно несвързани епитопи и лупусни антителата могат да са насочени срещу различни негови структури като ДНК, хистони, комплекси хистон-ДНК както и срещу структури от по-висок порядък (Schett, G., et al., 2002). Както вече показвахме (Tchorbanov, A. I., et al., 2007) е възможно да се подтисне

специфично, както *in vitro*, така и *in vivo*, появата на анти-двДНК IgG антитела в резултат на третиране с химерна молекула, съдържаща ДНК-имитиращ пептид (Putterman, C., et al., 2000) и моноклоналното 2.4G2 антителяло. Този ДНК-мимотоп е обаче синтетична, несрещаща се в природата молекула. Съществува, макар и малка вероятност, получените данни да са един вид лабораторен артефакт. За да изключим последното, при експериментите, обобщени в настоящата дисертация, беше използван пептид от автоантиген, който се атакува при лупус. Резултатите позволиха да се докаже валидността на предлагания от нас имуномодулиращ подход с потенциално клинично приложение.

Би-специфичните химерни антителялови молекули съдържат в състава си плъше антителяло. Това е причината, 8 седмици след началото на третирането, опитните животни да започнат да синтезират анти-плъши антитела. Ефектът от действието на антителяловата химерна молекула не е продължителен и не се повлиява продължителността на живот на третираните животни. Опитвайки се да избегнем този недостатък на молекулата и да повишим ефективността на този тип хибридни антителиавърху прицелните В-лимфоцити, конструирахме серия от химерни молекули, ангажиращи три независими рецептори по клетъчната им повърхност. Два от рецепторите са инхибиращи – FcγRIIb и CD22, а третия е имуноглобулиновият двДНК-специфичен рецептор. Химерната молекула беше конструирана от мише моноклонално антителяло, ангажиращо FcγRIIb рецептора чрез своя Fc участък. Към антителялото бяха прикачени два типа пептиди – първият, наподобяващ в антигенно отношение двДНК (DWEYSVWLSN) (Putterman C, et al., 2000) и ангажиращ ДНК-специфичния В-клетъчен рецептор; вторият с крайна сialова киселина и ангажиращ инхибиращия рецептор CD22. Тъй като експресията на CD22 върху мембраната на В-лимфоцитите е тясно свързана с тази на IgM, в групата от разглеждани експерименти, проследихме и ефекта на химерата върху синтезата на анти-двДНК IgM антитела.

С флоуцитометричен анализ на клетки от лупусни мишки беше доказано, че химерното антителяло се свързва предимно към В-клетките. В отделен експеримент показахме, че три-специфичната химера блокира дозо-зависимо свързването на моноклонални анти – FcγRIIb и анти- CD22 антитела към прицелните им рецептори.

При анализа на ефекта на тази молекула *in vitro*, беше доказано, че тя действа специфично върху ДНК-специфични В-лимфоцити без да повлиява активността на В-клетки с други специфичности. *In vivo*

експериментите бяха проведени върху мишки, спонтанно развиващи лупус. Бяха използвани 7-седмични животни, при които болестта е в най-ранен стадий. Бяха проследени нивата на анти-двДНК IgM и IgG антителата. В резултат от въвеждането на хибридна молекула, бяха отчетени понижени нива на анти-двДНК IgM антителата и почти напълно беше предотвратена появата на анти-двДНК IgG антитела за дълъг период от време. Определено подтискане върху нивата на IgM и IgG антителата беше наблюдавано и при животните, третирани с контролната химера, но то бе значително по-слабо от това при третираните с три-специфичната химера. На същите животни бяха изследвани и нивата на протеин в урината. Бе отчетено значително понижаване на протеинурията при тези, получаващи три-специфичната химера. Не беше наблюдаван ефект върху преживяемостта на лупусните мишки. Поради това, те бяха изследвани за наличието на антитела срещу всеки един от компонентите, изграждащи три-специфичната химерна молекула. Беше установено, че дори животните инжектирани само с PBS, имат антитела срещу всяка една от съставните части на химерата. Това потвърждава поликлоналността и хетерогенността на автоантитяловия отговор при системното заболяване лупус еритематозус.

За да докажем, че конструираната химерна антитялова молекула се свързва и с двата подтискащи повърхности рецептори, проведехме експерименти за проследяване на тяхната вътреклетъчна сигнализация. Спленоцити от MRL/lpr мишки бяха инкубирани с химерното антитяло и бяха лизирани. FcγRIIb и CD22 от получените лизати бяха имунопреципитирани и анализирани за фосфорилиране по тирозин. Резултатите показаха, че създадената три-специфична химерна антитялова молекула се свързва с FcγRIIb, както и със CD22, индуцира фосфорилиране и отключва инхибиращи сигнални пътища, водещи до подтискане на активността на В - клетките.

Сходни на предложените от нас химерни антитялови молекули, насочени към патологични В-клетки биха били особено ефективни при болести, атакуващи един известен автоантиген (например ацетилхолиновият рецептор при миастения гравис). Може да се очаква, че лечебни подходи, насочени изборително към болестните В-лимфоцити и лишени от сериозни странични действия постепенно ще заместят неспецифичните имуно-супресивни и противовъзпалителни терапевтични средства при много пациенти с антитяло-зависими автоимунни заболявания.

ИЗВОДИ:

1. Интравенозният имуноглобулинов препарат, съдържащ IgM (ИВИгМ), притежава ценни биологични активности, които водят до подтискане на пролиферацията на периферни човешки Т-клетки и на човешки туморни хематопоеични клетъчни линии.
2. В зависимост от използваните концентрации, ИВИгМ има апоптотично действие (при високи концентрации над 0.0125 mM) и анти-пролиферативно действие при концентрации по-ниски от 0.0125 mM.
3. ИВИгМ води до подтискане експресията на ранния активиращ маркер CD69 върху човешки Т-клетки при хуманизирани SCID мишки.
4. Би-специфичните химерни молекули, съставени от антитяло срещу инхибиращия В-клетъчен рецептор FcγIIb и от пептид, който е част от молекулата на Хистон 1, подтискат избирателно диференцирането на специфични към Хистон 1 и двДНК В-клетки при лупусни мишки.
5. *In vitro* култивирането на спленоцити от лупусни мишки с нарастващи концентрации от би-специфичните антитялови молекули, води до индуциране на апоптоза като при В-, така и при Т-клетките.
6. Третирането на предразположени към лупус MRL/lpr мишки със същата химера води до подтискане появата на IgG анти-Хистон 1 антитела и до забавяне появата на IgG анти-двДНК антитела; до предотвратяване развитието на кожни и органни изменения характерни за болестта; до намаляване нивата на протеинурия и до забавяне на патоморфологичните промени в бъбреците.
7. Химерната антитялова молекула, ангажираща три В-лимфоцитни рецептора (три-специфични химерни молекули) подтиска диференцирането на ДНК-специфичните В-лимфоцити, секретирани IgM и IgG анти-двДНК антитела.
8. Същите три-специфични химерни молекули, въведени на лупусни MRL/lpr мишки, водят до забавяне появата на IgM анти-двДНК антитела и предотвратяват появата на IgG анти-двДНК антитела за продължителен период от време. Третирането с тези молекули води до намаляване нивата на протеинурията.
9. В резултат от въздействието на три-специфичните химерни антитялови молекули върху клетки от MRL/lpr мишки се активират инхибиращи вътреклетъчни сигнални пътища в

резултат на които, се подтиска активността на прицелните В-лимфоцити.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ:

1. Установена е имуномодулиращата активност на интравенозен имуноглобулинов препарат, съдържащ пул от IgM антитела (ИВИгМ), върху човешки периферни Т-клетки и върху човешки туморни хематопоеични клетъчни линии.
2. Конструирана е химерна молекула, съставена от антитяло срещу инхибиращия В-клетъчен рецептор FcγIIb и от естествен автопептид, който е част от молекулата на Хистон 1. Доказан е е подтискащият ѝ ефект върху нивата на патологичните автоантитела и върху характерни патологични прояви на мишия лупус (протеинурия, бъбречно увреждане, кожни лезии и увеличение на лимфните органи).
3. Конструирана е три-специфична химерна антитялова молекула, която заангажира три повърхности В-клетъчни рецептора, два от които инхибиращи. Показан е благоприятният клиничен ефект от приложението и върху развитието на болестта при мишки, развиващи спонтанно лупус.
4. Доказано е индуцирането на силни вътреклетъчни инхибиращи сигнали при ангажирането с три-специфичната химера и на двата подтискащи рецептора.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:

1. T. Vassilev, N. Mihaylova, E. Voynova, M. Nikolova, M. Kazatchkine and S. Kaveri. IgM-enriched Human Intravenous Immunoglobulin Suppresses T Lymphocyte Functions in vitro and Delays the Activation of T Lymphocytes in hu-SCID mice. Clinical and Experimental Immunology; 2006;145:108–115.
2. Nikolina Mihaylova, Elisaveta Voynova, Andrey Tchorbanov, Maria Nikolova, Antoaneta Michova, Todor Todorov, Luba Srebrevva, Hristo Taskov and Tchavdar Vassilev. Selective silencing of disease-associated B-lymphocytes by chimeric molecules targeting their FcγIIb receptor. International Immunology; 2007;20 (2): pp. 165–175.

ДРУГИ ПУБЛИКАЦИИ:

1. Jordan D. Dimitrov, Lubka T. Roumenina, Virginia R. Doltchinkova, Nikolina M. Mihaylova, Sebastien Lacroix-Desmazes, Srinivas V. Kaveri and Tchavdar L. Vassilev. Antibodies Use Heme as a Cofactor to Extend Their Pathogen Elimination Activity and to Acquire New Effector Functions. The Journal of Biological Chemistry; 2007; Vol. 282, No. 37, pp. 26696–26706.
2. Andrey I. Tchorbanov, Elisaveta N. Voynova, Nikolina M. Mihaylova, Todor A. Todorov, Maria Nikolova, Vihra M. Yomtova, Bor-Luen Chiang and Tchavdar L. Vassilev. Selective silencing of DNA-specific B lymphocytes delays lupus activity in MRL/lpr mice. Eur. J. Immunol.; 2007; 37: 3587–3596.
3. N. M. Mihaylova, J. D. Dimitrov, I. K. Djoumerska-Alexieva and T. L. Vassilev. Inflammation-induced enhancement of IgG immunoreactivity. Inflammation Research; 57; 2008; 1–3.

УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ:

1. The 8th International Congress on SLE; Shanghai, China; May 23-27, 2007- oral presentation. Selective silencing of disease-associated B lymphocytes in lupus mice; Authors: Mihaylova N., Tchorbanov A., Voynova E., Vassilev T.
2. 16th European Congress of Immunology; Paris, France; 6-9 September 2006. A chimeric molecule cross-linking BCR, inhibitory FcγRIIB and CD22 receptors suppresses autoreactive B cells; Authors: Mihaylova N., Tchorbanov A., Voynova E., Vassilev T.
3. 2nd Meeting of Young Rheumatologists Across Europe; Semmering, Austria; 12 – 15 January, 2006 – oral presentation. Selective suppression of histone-specific B cells and affect on DNA-specific B cells in lupus mice leading to decrease of disease activity; Authors: Mihaylova N., Tchorbanov A., Voynova E., Vassilev T.
4. 2nd Conference on Autoimmunity: Mechanisms and Novel Treatments; Santorini, Greece; 25 – 30 September, 2005. Selective suppression of histone-specific B cells and of disease activity in lupus mice using a chimeric antibody; Authors: Mihaylova N., Tchorbanov A., Voynova E., Vassilev T.

5. 1st Meeting of Young Rheumatologists Across Europe; Austria; 20 – 24 January, 2005 – oral presentation. Suppression of an anti-DNA IgG Antibody Production and of Disease Activity in Lupus Mice by a Hybrid Antibody Targeting an Inhibitory B Cell Receptor; Authors: Mihaylova N., Tchorbanov A., Voynova E., Vassilev T.
6. 4th Balkan Congress of Immunology; Istanbul, Turkey; 5 – 8 September, 2004. Selective Suppression of DNA specific B Cells in Murine Lupus; Authors: A. Tchorbanov, E. Voynova, N. Mihaylova, T.Vassilev.
7. 7th Dresden Symposium on Autoantibodies; Dresden, Germany; 1 – 4 September, 2004 – oral presentation. Selective Suppression of DNA-specific B Cells in Lupus Mice by a Chimeric Antibody – peptide Molecule; Authors: A. Tchorbanov, E. Voynova, N. Mihaylova, T.Vassilev.