



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“

Никола Ралчев Ралчев

*Потискане на антиген-специфични В лимфоцити чрез
протеинови инженерни молекули при реакции на
свърхчувствителност*

Автореферат

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление 4.3. „Биологически науки“,
научна специалност „Имунология“

Научен ръководител: Проф. Андрей Иванов Чорбанов, дб

София 2025

Настоящата дисертация е разработена в Департамент по имунология, Лаборатория по експериментална имунология, Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ БАН.

Дисертационният труд съдържа 106 страници, 2 таблици и е илюстриран с 29 фигури. Библиографската справка включва 211 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния семинар по „Имунология“ на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури нагод. от часа в залата на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София. Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София, както и са публикувани съгласно ЗРАСРБ на адрес www.microbio.bas.bg

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“

Никола Ралчев Ралчев

*Потискане на антиген-специфични В лимфоцити чрез
протеинови инженерни молекули при реакции на
свръхчувствителност*

Автореферат

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление 4.3. „Биологически науки“,
научна специалност „Имунология“

Научен ръководител:

Проф. Андрей Иванов Чорбанов, дб

Научно жури:

Доц. д-р Петя Димитрова

Проф. д-р Красимира Тодорова-Хайрабедян

Доц. д-р Николина Михайлова

Доц. д-р Екатерина Иванова

Доц. д-р Иванка Цачева

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity	Антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност
AIT	Allergen immunotherapy	Алерген-специфична имунотерапия
Alum	Aluminium hydroxide, Al(OH) ₃	Алуминиев хидроксид, Al(OH) ₃
APC	Allophycocyanin	Алофикоцианин
BAD	BCL-2 associated agonist of cell death	BCL-2 свързан агонист на клетъчната смърт
BAL	bronchoalveolar lavage	бронхоалвеоларен лаваж
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	супернатанта от бронхоалвеоларен лаваж
BCL	B-cell lymphoma	В-клетъчен лимфом
BCR	B-cell receptor	В-клетъчен рецептор
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist	BH3-взаимодействащ домейн агонист на клетъчна смърт
BSA	bovine serum albumin	говежди серумен албумин
CR1	Complement receptor 1, CD35	Комплемент рецептор тип 1
DC-SIGN	dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non-integrin	специфичен за дендритни клетки ICAM-3-свързващ неинтегрин
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	ензимно-свързан имуносорбентен анализ
FACS	fluorescence-activated cell sorting	флуоресцентно-активирано клетъчно сортиране
FcγRIIb	Fc fragment of IgG receptor IIb	рецептор за Fc фрагмента на IgG IIb
FcεRI	high-affinity Fc receptor for IgE	високо-афинитетен Fc рецептор за IgE
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Флуоресцеин изотиоцианат
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	гранулоцит-макрофагов колонии-стимулиращ фактор
H&E	Hematoxylin and Eosin	хематоксилин и еозин
HDM	house dust mites	акари на домашния прах
HRP	Horseradish Peroxidase	пероксидаза от хрян
i.n.	intranasal	интраназален
i.p.	intraperitoneal	интраперитонеален
i.v.	intravenous	интравенозен
IgE	Immunoglobulin E	имуноглобулин E
IL	interleukin	интерлевкин
IL4R	Interleukin 4 Receptor	рецептор за IL-4

ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif	имунорецепторен тирозин-базиран активиращ мотив
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif	имунорецепторен тирозин-базиран инхибиращ мотив
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-терминална киназа
LPS	lipopolysaccharides	липополизахариди
MAPKs	mitogen-activated protein kinases	митоген-активирани протеин кинази
MBP	major basic protein	главен базисен (катионен) протеин
MHCII	major histocompatibility complex class II	главен комплекс за тъканна съвместимост от клас II
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88	Протеин на първичния отговор на миелоидна диференциация 88
NF-κB	Nuclear factor kappa B	ядрен фактор κB
NK клетки	natural killer cells	клетки естествени убийци
NLRs	nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors	NOD-подобни рецептори
NOD	nucleotide-binding and oligomerization domain	нуклеотид-свързващ и олигомеризационен домен
NOD-SCID	Nonobese diabetic - severe combined immunodeficiency	Диабет без затлъстяване - тежка комбинирана имунна недостатъчност
ON	overnight	за през нощта, 12-19 часа
PAF	platelet-activating factor	тромбоцит-активиращ фактор
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	патоген-асоциирани молекулни мотиви
PARs	protease-activated receptors	протеаза-активирани рецептори
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	мононуклеарни клетки от периферна кръв
PBS	phosphate-buffered saline	фосфатно-буфериран физиологичен разтвор
PE	phycoerythrin	фикоеритрин
PeCy7	phycoerythrin-cyanine7	фикоеритрин-цианин7
PRRs	Pattern Recognition Receptors	Рецептори за разпознаване на молекулни мотиви
rpm	revolutions per minute	обороти в минута
RT	room temperature	стайна температура
SCF	stem cell factor	фактор на стволовите клетки
SCID	severe combined immunodeficiency	тежка комбинирана имунна недостатъчност

SCIT	subcutaneous immunotherapy	подкожна алерген-специфична имунотерапия
SHIP	SH2 domain-containing inositol phosphatase	SH2-домен-съдържаща инозитол фосфатаза
SLIT	sublingual immunotherapy	подезична алерген-специфична имунотерапия
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	единичен нуклеотиден полиморфизъм
SPF	specific pathogen-free	условия без специфични патогени
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6	сигнален трансдюсер и активатор на транскрипция 6
Th2	T helper 2 cells	T хелперни клетки от тип 2
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
TNF- α , β	tumor necrosis factor α and β	тумор некротизиращ фактор α и β
T-PBS	0.05% Tween 20 in PBS	0.05% Tween 20 в PBS
TSLP	thymic stromal lymphopoietin	тимусен стромален лимфопоетин
VDBP	Vitamin D Binding Protein	витамин D-свързващ протеин
VDR	Vitamin D Receptor	рецептор за витамин D

I. УВОД

Реакциите на свръхчувствителност от тип I, познати като алергични реакции се развиват в резултат на имунен отговор към безвредни за организма антигени от околната среда, наречени алергени. Този тип реакции са от бърз тип и се медиират от алерген-специфични IgE антитела, които се свързват с рецептори по повърхността на ефektorни клетки. Последващо свързване на алерген към тези IgE антитела води до дегрануляция и освобождаване на хистамин и други биоактивни молекули от ефektorните клетки.

Алергичните реакции са широко разпространени, а патологията на тези заболявания зависи от мястото на навлизане на алергена. Акарите на домашния прах (HDM) са най-честите причинители на респираторни алергии, причинявайки алергичен ринит и алергична астма. Алергичното възпаление при тези пациенти води до цялостно увреждане на тяхната работоспособност и благосъстояние, свързани с високи публични разходи и необходимост от скъпа и продължителна терапия.

Контролирането на алергичните заболявания обикновено включва избягване на алергените и фармакологично лечение, насочено към облекчаване на симптомите на заболяването. Въпреки това, симптоматичното облекчаване на алергията към HDM приключва, след като лечението бъде прекратено или пациентът се сблъска с алергена. Алерген-специфичната имунотерапия (AIT) е единственото установено лечение, което е насочено директно към основните алергични механизми и осигурява дългосрочни ползи. Въпреки това, AIT изисква дълги протоколи, обикновено с продължителност 3–4 години и има несигурност по отношение на рентабилността и дългосрочната ефикасност. Поради това са необходими иновативни подходи за лечение, които могат да повлияят на дългосрочното управление на HDM алергиите.

Der p 1 е един от основните алергени, причиняващи алергия към HDM. Важната роля на IgE антителата очертава Der p 1-специфичните B клетки като логична цел за лечение на HDM алергията. Нов терапевтичен подход, водещ до селективно елиминиране на алерген-специфични B клетки може да се счита като потенциален за терапия на заболяването. Потенциални мишени за подобна селективна терапия са B-клетъчният рецептор (BCR) в комбинация с инхибиращи рецептори по повърхността на B клетките, като човешкият комплемент рецептор 1 (CR1) и мишият рецептор FcγRIIb.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се потисне селективно продукцията на алерген-специфични антитела в миши и хуманизиран модел на алергия към домашен прах чрез терапията с химерни молекули, съдържащи моноклонално антитяло срещу инхибиращ рецептор (човешки CR1 или миши FcγRIIb), конюгирано с епитоп-носителен пептид p52-71 от *Dermatophagoides pteronyssinus*.

За осъществяването на целта бяха поставени следните задачи.

1. Конструирание и охарактеризиране на миша Dp52-71 химера.
2. Разработване на експериментални модели на алергия към домашен прах:
 - 2.1. Хуманизиран Rag2- γс- модел.
 - 2.2. Миши BALB/с модел на хронично алергично възпаление.
3. Прилагане на химерни молекули при експерименталните модели на алергия и изследване на ефекта им върху нивата на алерген-специфичните антитела.
4. Изследване на терапевтичния ефект на химерите върху увреждането в белия дроб и характеристиките на имунния отговор, медиран от алергичното възпаление при двата експериментални модела.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Хуманизиран миши модел на алергия към домашен прах

1.1. Моноклонални антитела и химерни молекули

В предишни изследвания бяха конструирани и охарактеризирани анти-човешки химерни молекули. Тяхната способност да се свързват с прицелните рецептори бе доказана. Тези химерни молекули съдържат мише 3D9 IgG1 моноклонално антитяло, специфично за човешки CR1, конюгирано с пептид p52-71 (Ac-NQSLDLAEQELVDCASQHGC-Ahx-K-NH₂) от Der p 1 (Dp52-71 химера) или с контролен пептид (Ac-DEACLQCGSEHDHQA VQNLLS-Ahx-K-NH₂) (контролна химера), съдържащ същите аминокиселини, но в различна последователност [174].

Флуоресцеин изотиоцианат (FITC)–конюгирано анти-човешко CD45 (Cat# 0782, клон J.33, Immunotech), анти-човешко CD3-PerCy7 (Cat# 60-0036-T100, клон SK7, Tonbo Biosciences), анти-човешко CD4-APC (Cat# 17-0048-42, клон ОКТ4, eBiosciences), анти-човешко CD19-eFlour450 (Cat# 48-0198-42, клон SJ25C1, eBiosciences) и фикоеритрин (PE)-конюгирано анти-човешко CD8a (Cat# 12-0088-42, клон RPA-T8, eBiosciences) бяха използвани за експериментите свързани с проточна цитометрия (FACS).

1.2. Алергични пациенти

Проучването включва 4 наскоро диагностицирани нелекувани пациенти с бронхиална астма и/или алергичен ринит, чувствителни към Dpt (съотношение жени към мъже 1:3; на възраст 16-32 години). Критериите за включване в изследването бяха HDM алергия диагностицирана за първи път най-малко 2 години преди проучването чрез кожен тест за алергия и/или FACS анализ за базофилна дегранулация и наличие на висок титър на алерген-специфични IgE антитела. За всички пациенти беше получено информирано съгласие и проучването беше проведено съгласно Декларацията от Хелзинки. Мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMCs) от алергични пациенти бяха изолирани с помощта на плътностен градиентен разтвор на Pancoll (Cat# P04-60225, PAN Biotech, Aidenbach, Германия). Накратко, трикратно разреждана кръв в PBS от алергични пациенти беше надслоена внимателно върху плътностния градиент без да се позволява смесването на двете фази. След центрофугиране за 20 минути при 800 x g на стайна температура (RT), слой с PBMCs намиращ се между слоя от кръвна плазма и Pancoll беше събран. Изолираните PBMCs бяха допълнително пречистени от останалия серум, тромбоцити и Pancoll чрез двукратно центрофугиране във фосфатно-буфериран

физиологичен разтвор (PBS) при 300 x g за 10 минути, след което живите клетки бяха преброени чрез камера за броене на Бюркер, използвайки 0.25% разтвор на трипаново синьо.

1.3. Rag2- γ - мишки

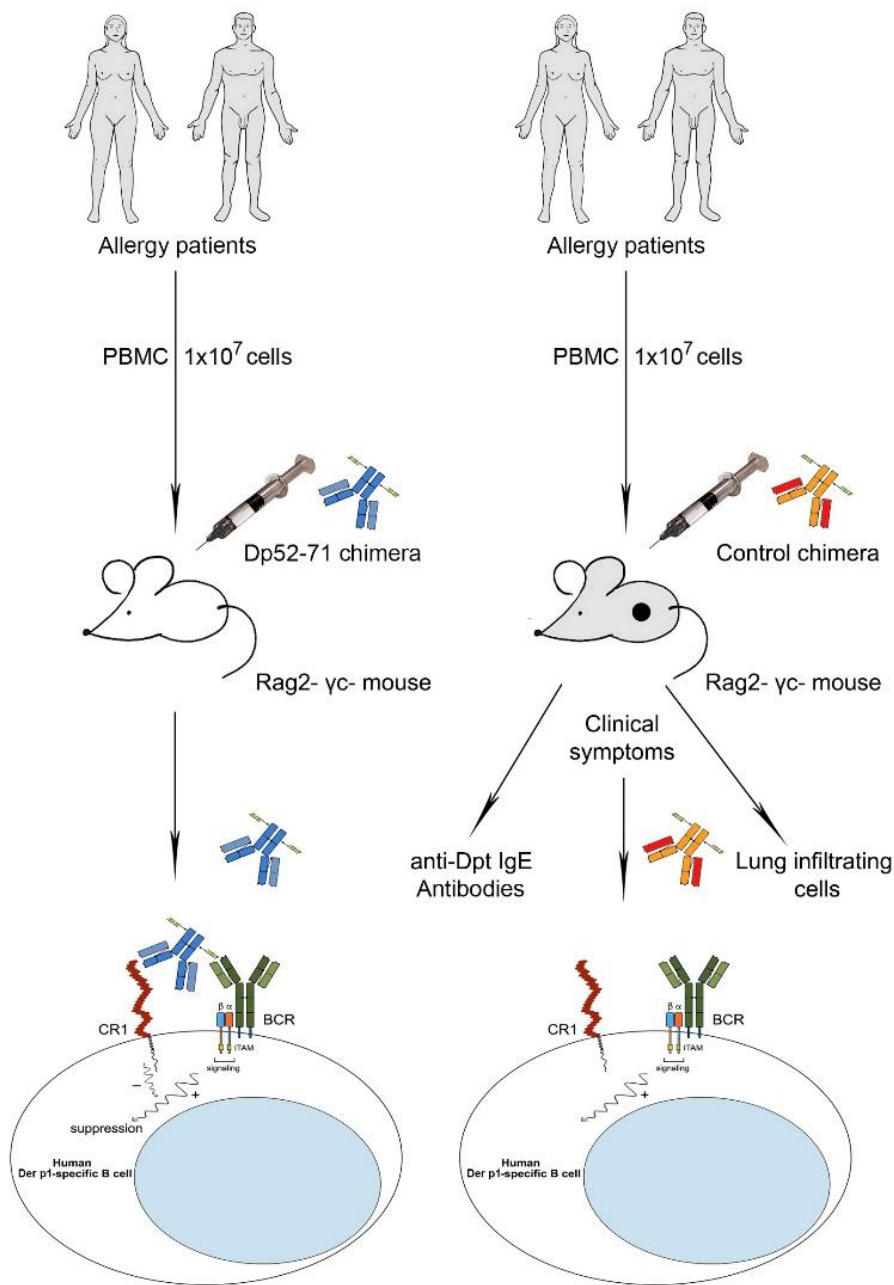
Женски 8-седмични Rag2- γ - (C;129S4-Rag2tm1.1Flv Il2rgtm1.1Flv/J) мишки бяха закупени от The Jackson Laboratory (Cat# 014593, Bar Harbor, ME). Животните бяха отглеждани при условия без специфични патогени (SPF). Всички манипулации бяха в съответствие с Директива 2010/63/ЕС на ЕС за опити с животни и националните разпоредби.

1.4. Клетъчен трансфер

Женски Rag2- γ - мишки (разпределени по 2 мишки на донор, общо 8) бяха използвани за трансфер на човешки клетки. PBMCs, получени от Dpt-чувствителни пациенти бяха изолирани, както е описано по-горе. Клетките от всеки донор бяха разделени на равни части и общо 1×10^7 клетки бяха трансферирани интраперитонеално (*i.p.*) във всяка Rag2- γ - мишка. Подробна схема на третирането е представена на Фигура 1.

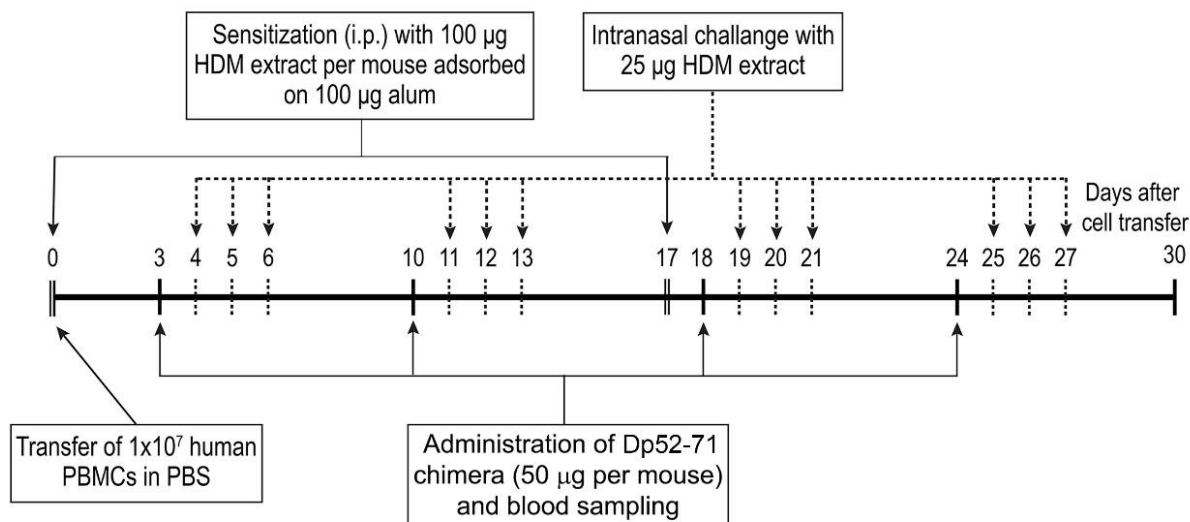
1.5. Схема на третиране при хуманизация Rag2- γ - модел на НДМ алергия

Rag2- γ - мишките бяха хуманизирани с PBMCs от алергични пациенти и бяха разделени на две групи. Първата група беше инжектирана интравенозно (*i.v.*) веднъж седмично в продължение на 4 седмици с 50 μ g на мишка от Dp52-71 химерата, като първото третиране започна на ден 3 след трансфера на PBMCs. Втората група беше инжектирана с контролната химера по същата схема. На дни 0 и 17 след трансфера на човешки PBMCs мишките бяха сенсibiliзирани със 100 μ g/мишка НДМ екстракт (Cat# 02.01.85, Citeq biologics, Groningen, Холандия), адсорбиран върху 100 μ g Alum (Al(OH)₃) (любезно предоставен от Националният център по заразни и паразитни болести, София, България). Три пъти седмично след третирането с химерите животните бяха упоявани и стимулирани чрез интраназално въвеждане на 25 μ g/мишка НДМ екстракт в краен обем от 35 μ l/мишка.



Фигура 1. Схема на трансфер на PBMCs изолирани от пациенти с HDM алергия в Rag2- γ - мишки и експериментален терапевтичен дизайн.

Подробната схема на третирането е представена на Фигура 2. На ден 30 от трансфера бе извършен бронхоалвеоларен лаваж през трахеята. Супернатантите от бронхоалвеоларния лаваж (BALF) бяха събирани чрез промиване с 1 ml ледено студен PBS, последвано от центрофугиране при 600 x g, 4 °C, след което бяха съхранявани при -80 °C.



Фигура 2. Разработване на хуманизиран Rag2- γс- модел на HDM алергия и схема на третиране с химерни протеинови молекули.

1.6. Изследване на анти-Dpt IgE, IgA, IgG и общи IgE антитела

Нивата на анти-Dpt IgE антителата в BALF бяха определени чрез флуоресцентен ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) с висока чувствителност. Непрозрачни 96-ямкови плаки с плоско дъно (Cat# 675076, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) бяха натоварени със 100 μg/mL Dpt екстракт, разреден в 50 mM карбонатен буфер (pH 9.6) и инкубирани за една нощ при 4 °C. Плаките бяха блокирани с 1% говежди серумен албумин (BSA) в 0.05% Tween 20 в PBS (T-PBS) за 2 часа при RT, след което бяха инкубирани с BALF за 2 часа при RT. След това, плаките бяха промити и инкубирани за още 2 часа с биотин-конюгирано анти-човешко IgE антитяло (разредено 1000x) (Cat# 16-10-04, Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, US), последвано от инкубиране с HRP-конюгиран стрептавидин (разреден 1000x) (Cat# S5512, Sigma-Aldrich) за 40 минути при RT. Реакцията беше проявена със свръхчувствителен ADHP (10-ацетил-3, 7-дихидроксифеноксазин) SensoLyte субстрат за пероксидаза (Cat# AS-71111, Anaspec, Fremont, САЩ). Полученият флуоресцентен продукт беше анализиран на автоматичен флуоресцентен четец (BMG Labtech, Offenburg, Германия) при дължина на вълната на възбуждане от 530 nm, а полученият флуоресцентен сигнал беше детектиран при 590 nm.

Нивата на анти-Dpt IgA и анти-Dpt IgG антителата в BALF бяха определени чрез ELISA, използвайки същият подход за натоварване на антигена и блокиране, описани по-горе.

След инкубиране за 2 часа на пробите от BALF последва инкубиране с анти-човешки IgA (разредено 1000x) (Cat# 2050-04, Southern Biotech, Birmingham, AL) или IgG (разредено 10000x) (Cat# A-1543, Sigma-Aldrich) антитела, конюгирани с алкална фосфатаза. Реакцията беше проявена използвайки 1 mg/ml субстрат pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt) (Cat# 4876, Calbiochem, Сан Диего, Калифорния, САЩ) и измерена при 405 nm.

Нивата на общите човешки IgE антитела в BALF бяха измерени с помощта на ELISA кит за IgE (Cat# EV 3840-9601 E, Euroimmun, Lübeck, Германия), следвайки протокола на производителя. Накратко, предварително натоварени ямки с анти-човешки IgE антитела бяха инкубирани с по 100 µl/ямка от пробите за 30 минути при RT. След трикратно промиване ямките бяха инкубирани с по 100 µl анти-човешко IgE антитяло конюгирано с ензима пероксидаза за 30 минути при RT. След трикратно промиване ямките бяха инкубирани със субстрат за 15 минути при RT без пряк достъп на слънчева светлина. След това реакцията беше спряна и абсорбцията беше измерена при 450 nm с референтна дължина на вълната от 620 nm.

Всички стъпки на инкубация при ELISA анализите бяха последвани от най-малко 3 стъпки на промиване с по 200 µl/ямка T-PBS.

1.7. Определяне на β -хексозаминидазна активност и обща протеинова концентрация в BALF

Активността на β -хексозаминидазата в BALF беше изследвана като маркер за дегранулацията на мастоцитите в белите дробове. Ензимната реакция беше стартирана чрез смесване на 50 µl BALF и 50 µl 5 mM p-нитрофенил N-ацетил-b-d-глюкозаминид (Cat# 4062.2, Carl Roth, Karlsruhe, Германия) разтворен в буфер съдържащ 50 mM тринатриев цитрат, pH 4.5 (Cat# S1804, Sigma-Aldrich). След инкубиране за 2 часа при 37 °C реакцията беше спряна чрез добавяне на 200 µl 0.2 M глицин-NaOH (pH 10.6), (Cat# 15527, Riedel-de-Haën; Cat# S5881, Sigma-Aldrich). Оптичната плътност беше измерена при 405 nm.

Общата протеинова концентрация в BALF беше измерена използвайки реактив на Брадфорд (Cat# B6916, Sigma-Aldrich), следвайки протокола на производителя. Накратко, пробите от BALF бяха смесени с реактив на Брадфорд в съотношение 1:30 при краен обем от 200 µl/ямка в 96-ямкова плака. Абсорбцията беше измерена при 595 nm. Намаляващи разреждания на BSA (1.4 mg/ml до 0.0625 mg/ml) бяха използвани за определяне на протеиновата концентрация.

1.8. Фенотипизиране на белодробни инфилтрати

Десните лобове на белите дробове на хуманизирани Rag2- γ c- мишки бяха анализирани за наличие на популации човешки лимфоцити чрез FACS анализ. Клетките бяха изолирани от белите дробове използвайки буфер съдържащ 2 mg/ml колагеназа D (Cat# 11088858001, Sigma-Aldrich) и 0.1 mg/ml DNase I (Cat# 10104159001, Sigma-Aldrich) при 37 °C за 45 минути. След това беше получена суспензия от единични клетки чрез преминаване на белодробната тъкан през 70 μ m клетъчна мрежичка. Живите клетки бяха преброени чрез камера на Бюркер и 2×10^5 клетки/епруветка бяха разпределени в епруветки за FACS анализ. След две стъпки на центрофугиране с по 1 ml/епруветка FACS буфер (2.5% фетален телешки серум в PBS) за 10 минути при 1200 rpm при 4 °C, лимфоцитите бяха инкубирани с коктейл от антитела за фенотипизиране. Човешките лимфоцити бяха позитивирани при маркиране с анти-човешко CD45-FITC антитяло, а Т-клетките бяха установени чрез маркиране с анти-човешки CD3-PerCy7, CD4-APC и CD8a-PE антитела. В-клетките бяха идентифицирани с анти-човешко CD19-eFlour450 антитяло. Тридесет хиляди CD45-положителни клетки от всяка проба бяха анализирани чрез проточен цитометър BD LSR II с помощта на Diva 6.1.1. софтуер (BD Biosciences, Сан Хосе, Калифорния).

1.9. Хистопатологичен анализ на бели дробове

Левият лоб на белите дробове от всяка хуманизирана Rag2- γ c- мишка беше отпрепариран и фиксиран в 10% формалин (Cat# HT501128, Sigma-Aldrich) за една нощ. Фиксираните бели дробове бяха дехидратирани в увеличаващи се концентрации на етанол (70%, 80%, 95%, и 100%) и заместител на ксилен (Cat# 1426, Tissue-clear, Sakura Finetek Europe), последвано от включване в парафин (Cat# P3558, Paraplast, Sigma-Aldrich). Парафинови срезове с дебелина 5 μ m бяха анализирани със стандартна техника на оцветяване с хематоксилин и еозин (H&E) (Cat# GHS216; Cat# HT110, Sigma-Aldrich). Микроскопските препарати бяха наблюдавани с помощта на светлинен микроскоп (40 \times , Nikon Eclipse E100, Melville, NY). Периваскуларното и перибронхиалното възпаление бяха оценени (*histological inflammatory score*) чрез софтуера ImageJ. Данните бяха изчислени по формулата: *площ на клетъчните инфилтрати около съдовете / площ на съдовете*.

1.10. Статистически анализ

Всички статистически анализи бяха извършени със софтуер GraphPad Prism 5 (Сан Диего, Калифорния). Несдвоен (*unpaired t-test*) или сдвоен т-тест (*paired t-test*) беше използван за определяне на разликите между групите. Данните са представени като средната аритметична стойност \pm SD. Стойност $p < 0,05$ беше считана за статистически значима.

2. Хроничен миши модел на алергия към домашен прах

2.1. Антитела

Плъща хибридома 2.4G2, продуцираща моноклонално IgG2b антитяло, специфично за миши Fc γ RII (CD32) (ATCC HB-197), беше култивирана в среда CHO без серум (Gibco, Gaithersburg, MD). Антителата бяха изолирани и пречистени от супернатантата [167].

Флуоресцеин изотиоцианат (FITC)-конюгирано анти-мише CD16/32 антитяло (Cat# 35-0161-U100, клон 2.4G2, Tonbo Bioscience, San Diego, CA, USA), анти-плъше IgG-FITC антитяло (Cat# 405404, BioLegend, San Diego, CA, USA), анти-мише FITC-конюгирано CD11c (Cat# 117306, клон N418, BioLegend), CD25 (Cat# 102006, клон PC61, BioLegend), CD45R (B220) (Cat# 103206, клон RA3-6B2, BioLegend); Фикоеритрин (PE)-конюгирано CD19 (Cat# 115508, клон 6D5, BioLegend), SiglecF (Cat# 12-1702-80, клон 1RNM44N, eBioscience, Frankfurt, Germany), CD69 (Cat# 104508, клон H1.2F3, BioLegend), и CD138 (Cat# FAB2966P, клон 300506, R&D Systems, Minneapolis, MN); PE-Сyanine 7 (PE-Cy7)–конюгирано CD3 (Cat# 100320, клон 145-2C11, BioLegend) и CD8 (Cat# 100722, клон 53-6.7, BioLegend); Pacific Blue-конюгирано Ly6G (Cat# 127612, клон 1A8, BioLegend), CD3 (Cat# 100334, клон 145-2C11, BioLegend), и CD80 (Cat# 104724, клон 16-10A1, BioLegend); PE-Сyanine 5 (PE-Cy5)–конюгирано CD4 (Cat# 100410, клон GK1.5, BioLegend) и стрептавидин (Cat# 15-4317-82, eBioscience); биотин-конюгирано IgE (Cat# 13-5992-85, клон 23G3, eBioscience) моноклонални антитела бяха използвани за експериментите, свързани с FACS анализ. Съответстващи изотипни контролни IgG антитела бяха използвани за компенсация и валидиране на сигнала от антителата.

Конюгирани с хрянова пероксидаза (HRP) анти-миши IgG (Cat# 405306, BioLegend), биотин-конюгирани анти-миши IgG1 (Cat# 406604, клон RMG1-1, BioLegend), IgM (Cat# 406504, клон RMM-1, BioLegend) и IgA антитела (Cat# 407004, клон RMA-1, BioLegend), и стрептавидин-конюгиран HRP (Cat# S5512, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Германия) бяха използвани при ELISA анализите.

2.2. Конструирание на протеин-инженерни химерни молекули

Два синтетични пептида и моноклонално антитяло 2.4G2, специфично за миши CD32 бяха използвани за конструирането на химерни молекули чрез протеиново инженерство. Избрани епитоп-носещи пептиди p52-71 от Der p 1 (Ac-NQSLDLAEQELVDCASQHGC-Ahx-K-NH₂) и контролни (*irrelevant*) пептиди (Ac-DEACLQCGSEDHQAVQNLLS-Ahx-K-NH₂), съдържащи същите аминокиселини, но в произволен ред, бяха закупени от лаборатория Caslo (Lyngby, Дания). По време на пептидният синтез чрез Fmoc базирана реакция върху смола с >96% чистота, беше въведен Ahx линкер с лизин в С-края на пептидите. Dp52-71 химерата беше конструирана чрез свързване на 2.4G2 антитялото с Der p 1 пептиди. Генерирана беше и *irrelevant* (контролна) химера, състояща се от същото антитяло, конюгирано с контролни пептиди. Химическото конюгиране при протеиновото инженерство беше извършено, както е описано преди [175]. Накратко, класическа EDC (1-ethyl-3(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide.HCl) (Cat# E6383, Sigma-Aldrich) техника на кръстосано свързване беше приложена за конюгиране на пептидите при 20-кратен моларен излишък спрямо 2.4G2 антитялото и 60-кратен моларен излишък на омрежващия агент с нулева дължина карбодиимид. Реакцията протече във фосфатен буфер за конюгиране (pH 6.0) за една нощ (ON) при 4 °C. След това реакционната смес беше пречистена от неконюгираните пептиди чрез трикратна диализа на магнитна бъркалка срещу PBS при съотношение *PBS : реакционна смес - 50:1*, ON, 4 °C и два пъти по два часа при RT. След това химерните молекули бяха концентрирани чрез ултрафилтрация (мембрана Amicon XM50) и стерилизирани през 0.20 µm филтър. Концентрацията на химерните молекули беше измерена при 280 nm.

2.3. Характеризиране на химерните молекули

2.3.1. Установяване свързването на химерните молекули към FcγRIIb чрез FACS анализ

Слезките от здрави мишки и мишки с HDM алергия бяха отпрепарирани, след което беше получена суспензия от единични клетки чрез филтрация през 70 µm клетъчна мрежичка. След лизиране на еритроцитите в хипотоничен буфер, клетките бяха промити в PBS, преброени в камера на Бюркер и разпределени във FACS епруветки (2 x 10⁵/епруветка). В последствие клетките бяха двукратно промити с 1 ml/епруветка FACS

buffer (2.5% FBS/PBS) при 1200 rpm, 4 °C, след което бяха използвани за последващи анализи.

Свързването на химерните молекули към В и Т клетки беше изследвано използвайки следния протокол: клетките бяха инкубирани в продължение на 20 минути с 2.4G2 антитяло върху лед, Dp52-71 химера или *irrelevant* химера (0.8 µg/епруветка) и промити. След това беше използвано анти-плъше IgG-FITC антитяло при същите условия за детектиране на антитялото с плъши произход 2.4G2 и химерите. След промиване клетките бяха инкубирани с CD3-PE-Cy7 и CD19-PE антители.

За да изследваме дали химерите се свързват към FcγRIIb приложихме конкурентен FACS анализ. Спленоцитите бяха инкубирани с двукратни разреждания на 2.4G2 антитялото, Dp52-71 химера или *irrelevant* химера (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 µg/епруветка) върху лед за 20 минути. След промиване бяха добавени анти-CD16/CD32 (2.4G2)-FITC, CD3-PE-Cy7 и CD19-PE антители.

Тридесет хиляди клетки в лимфоцитната популация бяха анализирани с помощта на проточен цитометър BD LSR II (BD Biosciences, Mountain View, CA) и софтуер FlowJo (Ashland, OR).

2.3.2. Разпознаване на химерните молекули от серумни IgG1 антители

Dp52-71 или *irrelevant* химера (100 µl/ямка, 10 µg/ml), разредени в буфер за натопарване (0.015 M Na₂CO₃, 0.035 M NaHCO₃, рН 9.6) бяха инкубирани в 96-ямкова плака за една нощ при 4 °C. Ямките бяха блокирани с 200 µl 1% BSA в Т-PBS в продължение на 2 часа, RT. Плаките бяха инкубирани с трикратни разреждания (10x, 30x, 90x, 270x) на серуми от здрави BALB/с мишки, както и от животни, инжектирани четири пъти подкожно (дни 0, 21, 35, 49) с 100 µg/мишка HDM екстракт, адсорбиран върху 100 µg Al(OH)₃ (Alum) за 2 часа при RT. След това беше добавено биотин-конюгирано анти-мише IgG1 антитяло (разредено 1000x) за инкубация от 1 час при RT, последвано от инкубиране със стрептавидин, конюгиран с HRP (разреден 500x) при същите условия. След интензивно промиване, ензимната реакция беше развита с 0,1 mg/ml 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) субстрат (100 µl/ямка, Cat# 87748, Sigma-Aldrich) в 0.05 M фосфатно-цитратен буфер (рН 5.0) и 1.96 mM H₂O₂. Реакцията беше спряна чрез добавяне на 2 N H₂SO₄ (50 µl/ямка) и беше измерена при 450 nm с корекция при 570 nm (CLARIOstar Plus, BMG LABTECH).

2.4. BALB/c мишки

Женски BALB/c мишки на възраст 8 седмици бяха закупени от The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) и бяха отглеждани при SPF условия във вивариума на Институт по микробиология при стриктно спазване на насоките на Директива на ЕС 2010/63/ЕС) и в съответствие с националните разпоредби.

2.5. Генериране на хроничен миши модел на алергия към HDM и схема на третиране

BALB/c мишки бяха разделени на случаен принцип в 4 групи (9 животни на група). Мишките бяха анестезирани и 25 µg HDM екстракт в 35 µl PBS беше въведен интраназално (*i.n.*) при три от групите. Сенситизацията с екстракт от HDM беше извършена два пъти седмично (с интервал от един ден между третиранията) в продължение на две седмици (дни 0, 2, 7 и 9), последвано от пет допълнителни *i.n.* стимулирания веднъж седмично (дни 14, 22, 29, 36, и 43). През последните четири седмици мишките бяха инжектирани интравенозно веднъж седмично с 50 µg Dp52-71 химера или *irrelevant* химера, или с PBS в обем от 100 µl един ден преди *i.n.* стимулиране с HDM (дни 21, 28, 35, 42). Контролната група мишки (PBS група) беше третирана с PBS *i.n.* и *i.v.* по същата схема. Мишките бяха кръвопускани през ретроорбиталния синус 24 часа след последното стимулиране с HDM екстракт и събраните миши серуми бяха съхранявани при -80 °C. Животните бяха жертвани, след което бяха изолирани BAL, белите дробове и слезките.

2.6. Изолиране на BALF и диференциално преброяване на клетки

Три обема от 1 ml ледено студен PBS бяха въведени през трахеята в белите дробове на всяка мишка и обемът на възстановената течност беше измерен. Пробите бяха центрофугирани в продължение на 10 минути при 600 x g, 4 °C, като супернатантата от първия инжекционен обем беше събрана и съхранена при -80 °C за последващ анализ на BALF. Клетъчните утайки от трите белодробни промивки на всяка мишка бяха събрани и центрофугирани при същите условия. След това еритроцитите бяха лизирани с 200 µl хипотоничен буфер, последвано от центрофугиране. Утайките бяха ресуспендирани в 500 µl PBS, след което клетките бяха преброени чрез хемоцитометър. Петдесет хиляди клетки бяха поставени върху предметни стъкла за цитоспин и бяха центрофугирани за 10 минути при 700 rpm. Предметните стъкла бяха изсушени на въздух и бяха оцветени с Differential Quik Stain Kit (Cat# 24606, Polysciences, Niles, IL) съгласно инструкциите на производителя. Клетките бяха наблюдавани с помощта на

микроскоп (200x увеличение, Leica DM2000, Leica Microsystems). Шест визуални полета на предметно стъкло бяха анализирани чрез софтуер ImageJ (200-400 клетки на мишка). Накрая, резултатите бяха изчислени като клетки на милилитър възстановена течност и проценти.

2.7. Определяне на анти-HDM IgG, IgG1, IgM и IgA в серум и BALF

HDM екстракт (10 µg/ml в буфер за натопарване, рН 9.6) беше инкубиран в 96-ямкови плаки (50 µl/ямка) за една нощ при 4 °C. Ямките бяха промити с Т-PBS и блокирани с 200 µl/ямка 1% BSA в Т-PBS за 2 часа при RT. След това бяха добавени 50x разредени миши серуми или 3x разредени проби от BALF в 1% BSA в Т-PBS (50 µl на ямка) и бяха инкубирани в продължение на 2 часа при RT. Плаките бяха промити, след което бяха инкубирани с 2000x разредено HRP-конюгирано анти-мише IgG антитяло (50 µl/ямка) или с 1000x разредени биотин-конюгирано анти-миши IgG1, IgM или IgA антитела за 1 час, RT. Пробите с биотинови конюгати бяха инкубирани за още 1 час с 500x разреден стрептавидин конюгиран с HRP. Ензимната реакция беше развита чрез добавяне на TMB субстрат, както е описано по-горе, и отчетена.

2.8. Изследване на общи IgE антитела, IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13

Концентрацията на общите IgE антитела беше изследвана в проби от BALF (10x разредени) и серуми (800x разредени) с ELISA MAX™ Deluxe Set, следвайки инструкциите на производителя (Cat# 432404, BioLegend).

Концентрациите на IL-4 (Cat# 431104, BioLegend), IL-5 (Cat# 431204, BioLegend), IL-9 (Cat# 88-8092, Invitrogen) и IL-13 (Cat# 88-7137, Invitrogen, Waltham, MA) в BALF бяха изследвани спрямо протоколът на производителя с леки модификации. Обемите на първичното антитяло, пробите от BALF (2.15x разредени), антитялото за детекция и ензимния субстрат бяха модифицирани за 50 µl/ямка.

Накратко, процедурата по детекция на общите IgE антитела, IL-4 и IL-5 включваше следните стъпки. Антитела специфични за миши IgE антитела, IL-4 или IL-5 бяха инкубирани за 16-18 часа при 4 °C в 96-ямкова плака. След това, плаките бяха измити 4 пъти с 300 µl/ямка *Wash Buffer* и неспецифичното свързване беше блокирано с по 200 µl/ямка *Assay Diluent A* за 1 час, RT. Плаките бяха промити както е описано по-горе, след което бяха инкубирани с разредени в *Assay Diluent A* проби от BALF или серуми за 2 часа, RT. След промиване, плаките бяха инкубирани с *Detection Antibody* за 1 час, RT. Плаките бяха промити и инкубирани с *Avidin-HRP* за 30 минути, RT. След старателно промиване плаките бяха инкубирани с *TMB Substrate* на тъмно за 20 минути,

след което ензимната реакция беше спряна с *Stop Solution* и абсорбцията беше измерена при 450 nm с корекция на сигнала при 570 nm. Концентрацията на изследваните протеини беше изчислена използвайки стандартна крива.

За изследването на цитокините IL-9 и IL-13 беше използван следния протокол. Анти-IL-9 и анти-IL-13 антитела бяха инкубирани в 96-ямкова плака при 4 °C, ON. Плаките бяха промити 3 пъти с 250 µl/ямка *Wash Buffer* и бяха блокирани с 200 µl/ямка *IX ELISA/ELISPOT Diluent* за 1 час, RT. След еднократно промиване, ямките бяха инкубирани с пробите от BALF разредени в *IX ELISA/ELISPOT Diluent* за 2 часа, RT. Плаките бяха промити 5 пъти и бяха инкубирани с *Detection Antibody* разредено в *IX ELISA/ELISPOT Diluent* за 1 час, RT. След петкратно промиване беше добавен *Avidin-HRP* за 30 минути, RT. Плаките бяха промити 7 пъти, след което последва инкубиране с *IX TMB Substrate* за 15 минути, RT. Реакцията беше спряна с *Stop Solution* и абсорбцията беше измерена при 450 nm с корекция на сигнала при 570 nm. Концентрацията на изследваните протеини беше изчислена използвайки стандартна цитокинова крива.

2.9. Изследване на общата протеинова концентрация и активността на β-хексозаминидаза в BALF

Ензимната активност на β-хексозаминидазата и общата протеинова концентрация в проби от BALF бяха измерени както е описано в **раздел III. 1.7.**

2.10. Фенотипизиране на белодробни клетъчни инфилтрати

Десните лобове на белите дробове бяха нарязани на малки парчета, след което бяха инкубирани с буфер съдържащ 0,1 mg/ml DNase I (Cat# 10104159001, Sigma-Aldrich) и 2 mg/ml колагеназа D (Cat# 11088858001, Sigma-Aldrich) за 45 минути при 37 °C. Беше получена суспензия от единични клетки чрез филтрация на стритите хомогенизирани бели дробове през 70 µm клетъчна мрежичка. Изолираните клетки бяха центрофугирани за 10 минути при 1200 rpm, 4 °C, след което еритроцитите бяха лизирани чрез хипотоничен буфер. След това клетките бяха центрофугирани, преброени, разпределени в FACS епруветки (2 x 10⁵/епруветка) и центрофугирани два пъти с FACS буфер. Фенотипизирането на имунните клетки беше извършено чрез инкубиране със следните четири коктейла анти-миши антитела за 20 минути върху лед: миелоидни клетки - Ly6G-Pacific Blue, CD11c-FITC, SiglecF-PE; В клетки - CD19-PE, CD80-Pacific blue, CD16/CD32-FITC, IgE-биотин и втора инкубация със Streptavidin-PE-Cy5; антияло-секретиращи клетки - CD138-PE, CD45R (B220)-FITC; Т клетки - CD3-

Pacific blue, CD4-PE-Cy5, CD8-PE-Cy7, CD25-FITC, CD69-PE. След това епруветките бяха промити два пъти и 30 000 клетки бяха анализирани от всяка проба с проточен цитометър BD LSR II, събрани и експортирани със софтуер DIVA и анализирани използвайки софтуер FlowJo.

2.11. Хистология

Левите лобове на белите дробове от всяка мишка бяха фиксирани в 10% неутрално буфериран формалин (Cat# 3800598, Leica Biosystems). Фиксираната тъкан беше обработена чрез автоматичен тъканен процесор (Leica TP1020, Leica Biosystems) в нарастващи концентрации на етанол (30 минути в 70%, 80%, 95% и 2 пъти по 30 минути в 100%) и *Waxsol Cleaning Solution* (2 пъти по 45 минути) (Cat# S26.0390, Leica Biosystems). След това белите дробове бяха включени (Leica HistoCore Arcadia H and C, Leica Biosystems) в парафин (Cat# P3558, Paraplast, Sigma-Aldrich) и нарязани на 5 µm срезове (Leica RM2125 RTS, Leica Biosystems). Парафиновите срези бяха депарафинирани в *Waxsol Cleaning Solution* (10 минути) и намаляващи концентрации на етанол (6 минути в 100%, 3 минути в 95%, 1 минута в 80% и 70%), след което бяха оцветени с хематоксилин и еозин (Cat# 1.05175; Cat# 1.09844, Sigma-Aldrich) и *Periodic acid-Schiff* (PAS) (Cat# PAS5-K-100, Biognost).

Оцветяването с хематоксилин и еозин беше извършено по следния протокол. Депарафинираните белодробни срези бяха хидратирани в дестилирана вода за 2 минути. Препаратите бяха оцветени с *Hematoxylin Solution, Gill.2*, за 3 минути последвано от трикратно промиване с чешмяна вода. След това, срезите бяха оцветени с подкислен разтвор на *Eosin Y* за 1 минута и промити един път с чешмяна вода. Накрая срезите бяха дехидратирани чрез нарастващи концентрации на етанол (1 минута в 70% и 80%, 2 минути в 95% и 6 минути в 100%) и *Waxsol Cleaning Solution* (5 минути), след което бяха поставени покривни стъкла.

Оцветяването с PAS беше извършено по следната схема. Депарафинираните белодробни срези бяха хидратирани в дестилирана вода за 2 минути. След това срезите бяха инкубирани с 0.8% разтвор на перйодна киселина за 10 минути, последвано от промиване с чешмяна вода за 3 минути и потапяне в дестилирана вода. Белодробните срези бяха инкубирани с *BioSchiff* реагент за 15 минути, последвано от инкубиране със сулфитен разтвор за 6 минути. Пробите бяха промити с чешмяна вода за 3 минути, след което последва оцветяване с *Hematoxylin ML* за 3 минути. Накрая, срезите бяха промити

за 3 минути с чешмяна вода и потопени в дестилирана вода, последвано от дехидратация и поставяне на покривни стъкла.

Предметните стъкла бяха наблюдавани и заснети с микроскоп Leica DM2000 (Leica Microsystems) при 200X увеличение. Периваскуларното и перибронхиалното възпаление бяха оценени (*histological inflammatory score*) чрез софтуера ImageJ. Данните бяха изчислени по формулата: *площ на клетъчните инфилтрати около съдовете / площ на съдовете* [176]. Използвана беше петточкова система за оценяване на *PAS score*: 0, <0,5% PAS-положителни клетки; 1, <25%; 2, 25–50%; 3, 50–75%; и 4, >75% [177]. Анализирани бяха шест до тринадесет бронхиоли на мишка.

2.12. Статистически анализ

Повечето статистически анализи бяха извършени чрез софтуера GraphPad Prism 9. Данните са представени като средна аритметична стойност \pm SD, като стойност на $p < 0.05$ беше считана за статистически значима. ELISA и цитокиновите проби бяха извършени в две повторения. Проверка за нормалността на разпределението на данните беше извършена чрез тестовете на *Shapiro-Wilk* и *Kolmogorov-Smirnov*. Според нормалността на разпределението на данните, статистическата значимост беше оценена чрез *one-way* или *two-way ANOVA* тестове, последвани от *Tukey's multiple comparisons*, или чрез *Kruskal-Wallis* тест последван от *Dunn's multiple comparisons* тест. Корелационните анализи бяха извършени с помощта на тестовете на *Spearman* и *Pearson*. Корелационната матрица на *Spearman* беше генерирана с помощта на софтуер SRplot достъпен на сайта bioinformatics.com.cn [178].

IV. РЕЗУЛТАТИ

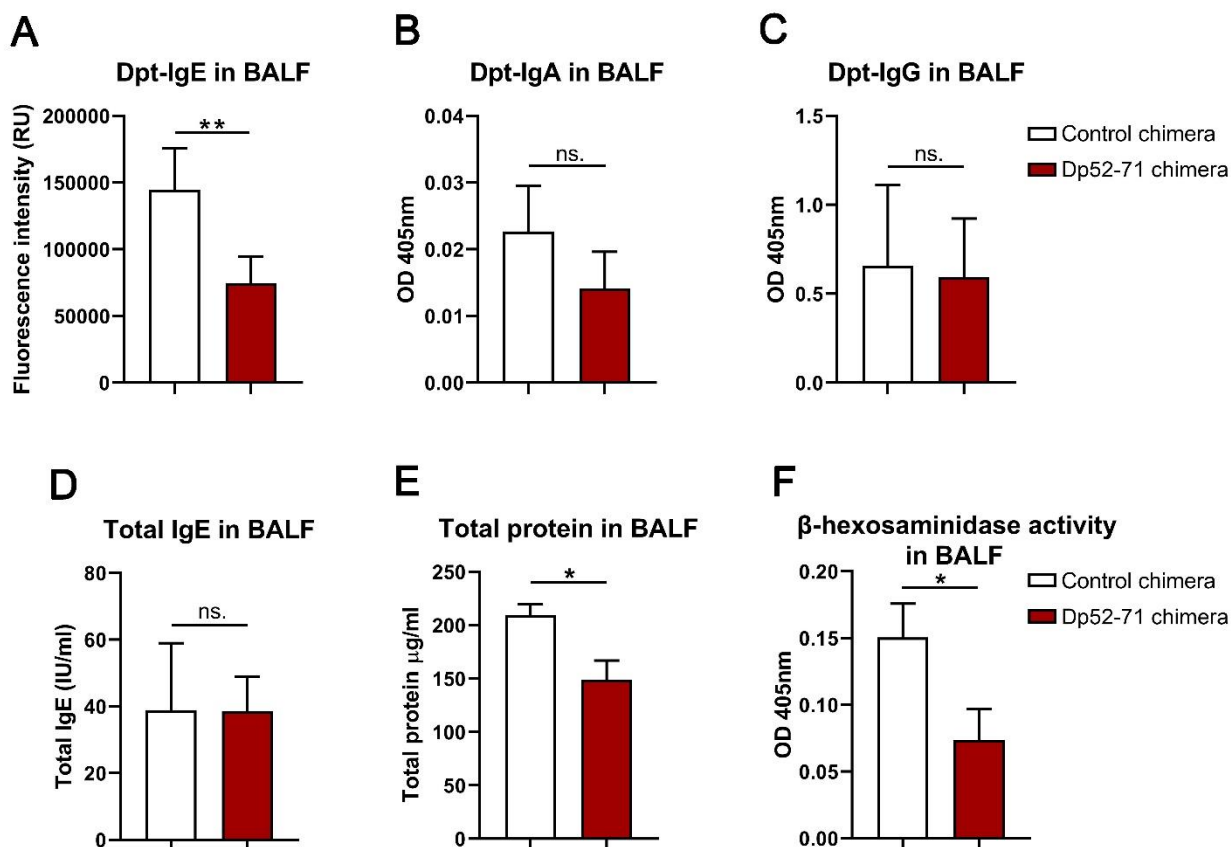
1. Хуманизиран миши модел на алергия към домашен прах

1.1. Третирането с човешка Dp52-71 химера понижава нивата на анти-Dpt IgE, общият протеин и β -хексозаминидазата в BALF

PBMCs, изолирани от диагностицирани нелекувани алергични пациенти, чувствителни към Dpt с високи нива на анти-Dpt IgE антитела бяха трансферирани в женски Rag2- γ c- мишки. Хуманизираните Rag2- γ c- мишки бяха третирани с Dp52-71 или контролната химера за да бъде оценен *in vivo* ефекта от Dpt-специфичното В-клетъчно потискане (Фигура 1 и 2). Животните бяха претеглени и наблюдавани по време на експеримента, като не бяха наблюдавани признаци на реакция на присадката срещу гостоприемника (graft-versus-host reaction) (данните не са показани).

Супернатантите от BAL бяха анализирани за да бъде определен локалният имунен отговор в хуманизирания модел на HDM алергия, тъй като допълнителното стимулиране с алерген беше извършено интраназално. Поради факта, че повишаването на нивата на анти-Dpt IgE антителата е отличителна черта при алергията към HDM, ние определихме нивата на алерген-специфичните IgE в BALF на третираните животни. Резултатите показаха, че терапията с Dp52-71 химерата значително намалява нивата на човешките анти-Dpt IgE антитела в сравнение с контролната химера (Фигура 3A). Въпреки това, промяна в нивата на алерген-специфичните IgA, IgG, както и на общите IgE антитела не бе установена (Фигура 3B–D).

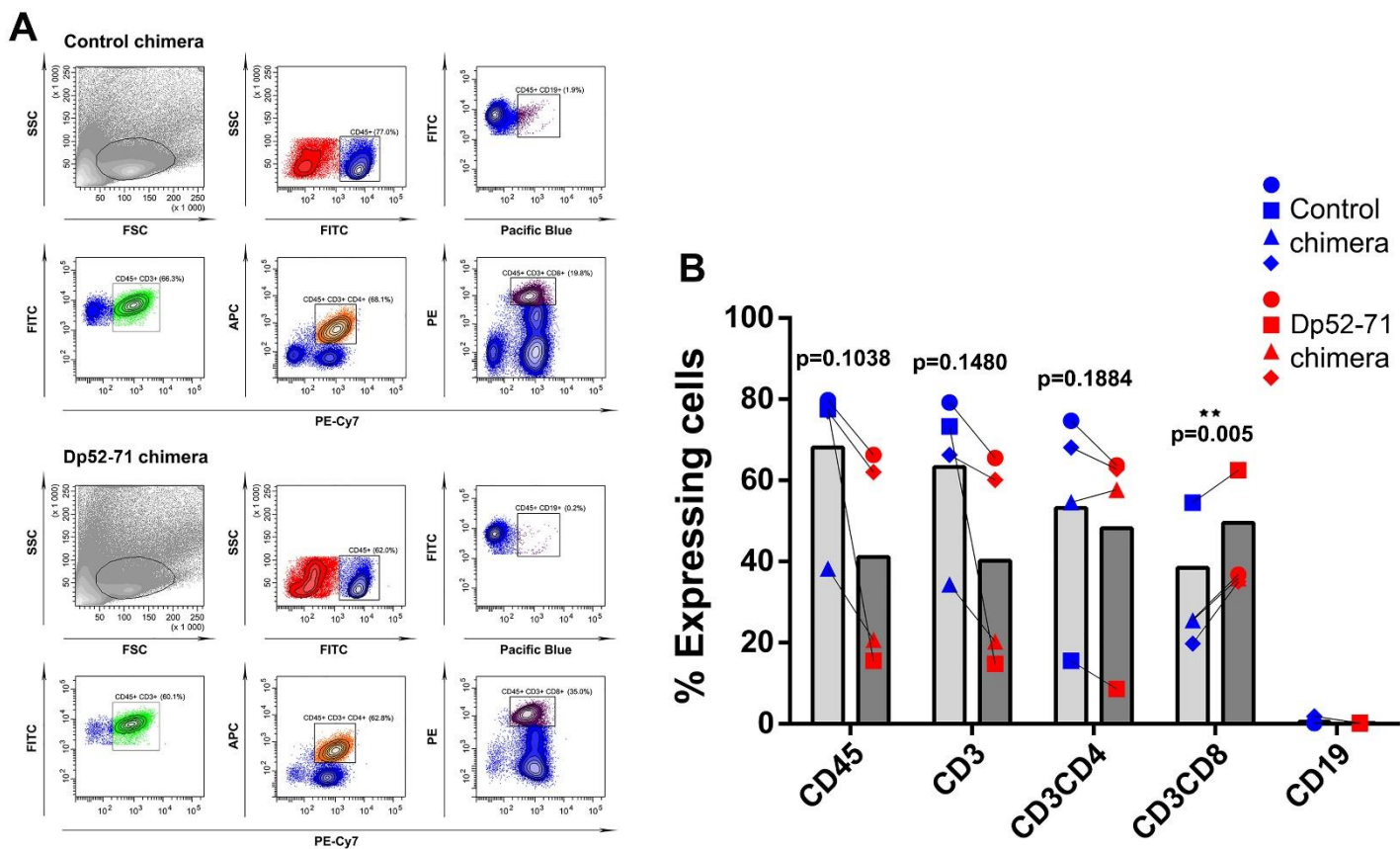
Концентрацията на общите протеини в BALF се използва като маркер за пропускливостта на кръвоносните съдове в белите дробове. Третирането с Dp52-71 химерата води до намаляване нивата на протеини в ексудата в BALF (Фигура 3E). Дегранулацията на мастоцитите в белите дробове беше оценена чрез измерване на активността на ензима β -хексозаминидаза в BALF. Отделянето на β -хексозаминидаза в дихателните пътища беше значително инхибирано в групата инжектирана с Dp52-71 химерата (Фигура 3F).



Фигура 3. Анализ на проби от BALF. PBMCs от всеки пациент с HDM алергия ($n = 4$) бяха инжектирани в две Rag2- γ s- мишки, след което експерименталните животни бяха третирани с контролна химера или с Dp52-71 химера. Всяка проба представлява BALF от индивидуално животно. (A) Нивата на анти-Dpt IgE в BALF бяха измерени чрез флуоресцентен ELISA анализ. Нивата на анти-Dpt IgA (B) и анти-Dpt IgG (C) в BALF бяха измерени чрез ELISA. Концентрацията на общите IgE антитела (D) и общия протеин (E) в BALF беше оценена. Активността на β -хексозаминидазата в BALF беше измерена и използвана като индикация за мастоцитна дегранулация (F). Данните са представени като средна стойност \pm SEM от 4 мишки на група; p -стойностите са изчислени с помощта на сдвоен t -тест (*paired t-test*) за да се определят разликите между групата, третирана с Dp52-71 химера ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) в сравнение с мишките инжектирани с контролна химера.

1.2. Влияние на човешка Dp52-71 химера върху инфилтрацията на човешки лимфоцити в белите дробове на хуманизирани мишки

Лимфоцитната инфилтрация в белите дробове на хуманизираните мишки беше изследвана чрез FACS анализ на клетъчни суспензии изолирани от десните лобове на белите дробове от всички животни (Фигура 4).

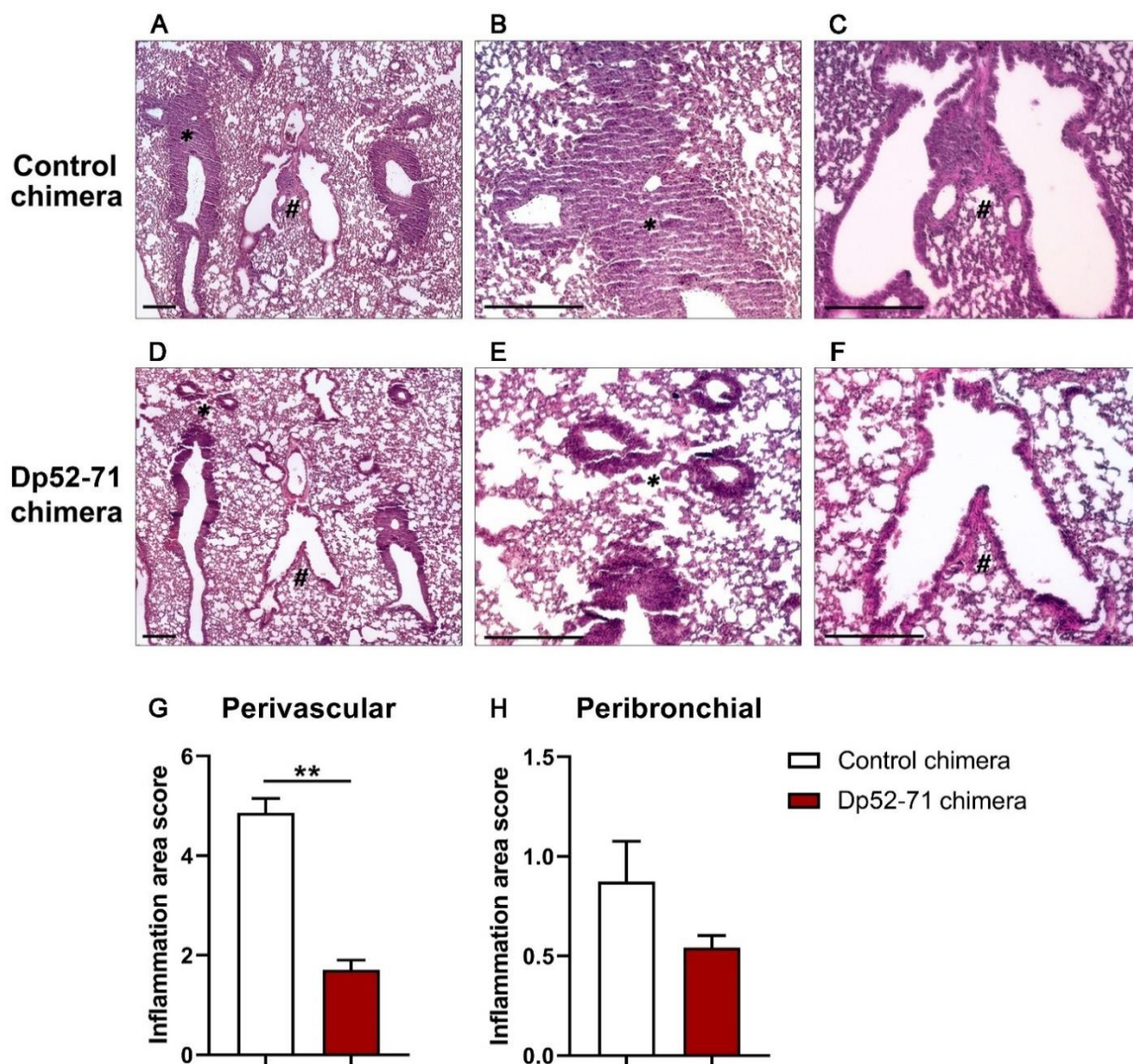


Фигура 4. Фенотипизиране на белодробни инфилтрати. (А) Изолитрани бяха едноклетъчни суспензии от белите дробове на всички животни, след което бяха анализирани спрямо следните комбинации от античовешки антитела заедно с CD45-FITC: CD3-PeCy7, CD3-PeCy7/CD4-APC, CD3-PeCy7/CD8a-PE или CD19-eFlour450. Тридесет хиляди CD45-положителни клетки бяха анализирани от всяка проба чрез проточна цитометрия. (В) Получените резултати са представени графично като процент от общите имунни клетки. Всяка форма (кръг, квадрат, триъгълник и ромб) представлява клетки от единично животно, трансферирано с клетки от пациент с HDM алергия ($n = 4$), третирано с контролна химера (синьо) или с Dp52-71 химера (червено). Данните са представени като стойности от 4 мишки на група; p -стойностите са изчислени с помощта на двоеен t -тест (*paired t-test*) за да се определят разликите между групата, третирана с Dp52-71 химера (** $p < 0.01$) в сравнение с мишките инжектирани с контролна химера.

Установена беше тенденция на намален брой на човешките CD45, CD3 и CD4 клетки в групата третирана с Dp52-71 химера в сравнение с животните третирани с контролна химера. Статистически значимо повишаване в процента на инфилтрираните CD8 Т клетки беше наблюдавано в групата, третирана с Dp52-71 химера в сравнение с контролната група мишки. Малък процент В-клетъчна инфилтрация в белите дробове беше наблюдавана при част от хуманизираните животни (Фигура 4В).

1.3. Третирането с човешка Dp52-71 химера намалява общото възпаление в белите дробове

В края на *in vivo* експериментите, левите лобове на белите дробове от всички животни бяха използвани за хистопатологичен анализ чрез оцветяване с хематоксилин и еозин. Както е илюстрирано на Фигура 5, установени бяха периваскуларни и перибронхиални възпалителни клетъчни инфилтрати в белите дробове на мишките, третиран с контролна химера и хуманизирани с РВМСs от алергични пациенти след интраназално стимулиране с НDM. За разлика от това, подобно силно патологично възпаление не беше открито в белите дробове на третираните с Dp52-71 химера хуманизирани мишки, като беше наблюдавано статистически значимо редуциране на периваскуларните клетъчни инфилтрати.

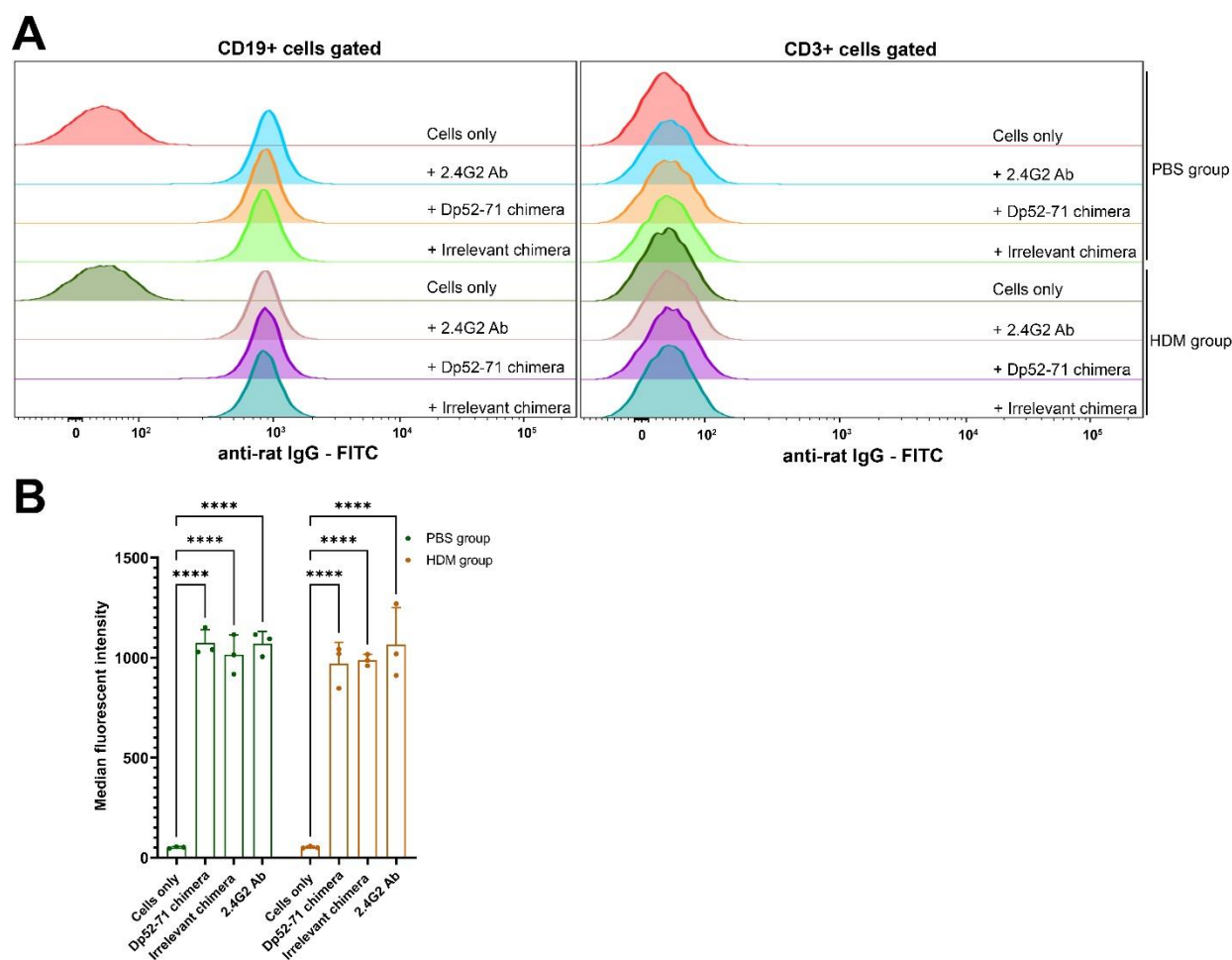


Фигура 5. Хистология на бели дробове от хуманизирани Rag2- γ c- мишки. Хистологично изследване на парафинови срезове от бели дробове на Rag2- γ c- мишки, хуманизирани с PBMCs от пациенти с HDM алергия и третирани с контролна химера (A–C) или с Dp52-71 химера (D–F). Периваскуларни (*) и перибронхиални (#) възпалителни инфилтрати бяха открити в белите дробове на хуманизирани мишки след интраназално стимулиране с HDM (25 μ g/мишка). Използвана е стандартна техника за оцветяване с хематоксилин и еозин. Показани са представителни изображения от 4 животни. Размер на скалата, 250 μ m. Хистологична оценка (*histological inflammatory score*) на периваскуларно (G) и перибронхиално (H) възпаление. Данните са представени като средна стойност \pm SD; *p*-стойностите са изчислени с помощта на сдвоен *t*-тест (*paired t-test*) за да се определят разликите между групата, третирана с Dp52-71 химера (***p*<0.01) в сравнение с мишките инжектирани с контролна химера.

2. Хроничен миши модел на алергия към домашен прах

2.1. Характеризиране на химерни молекули

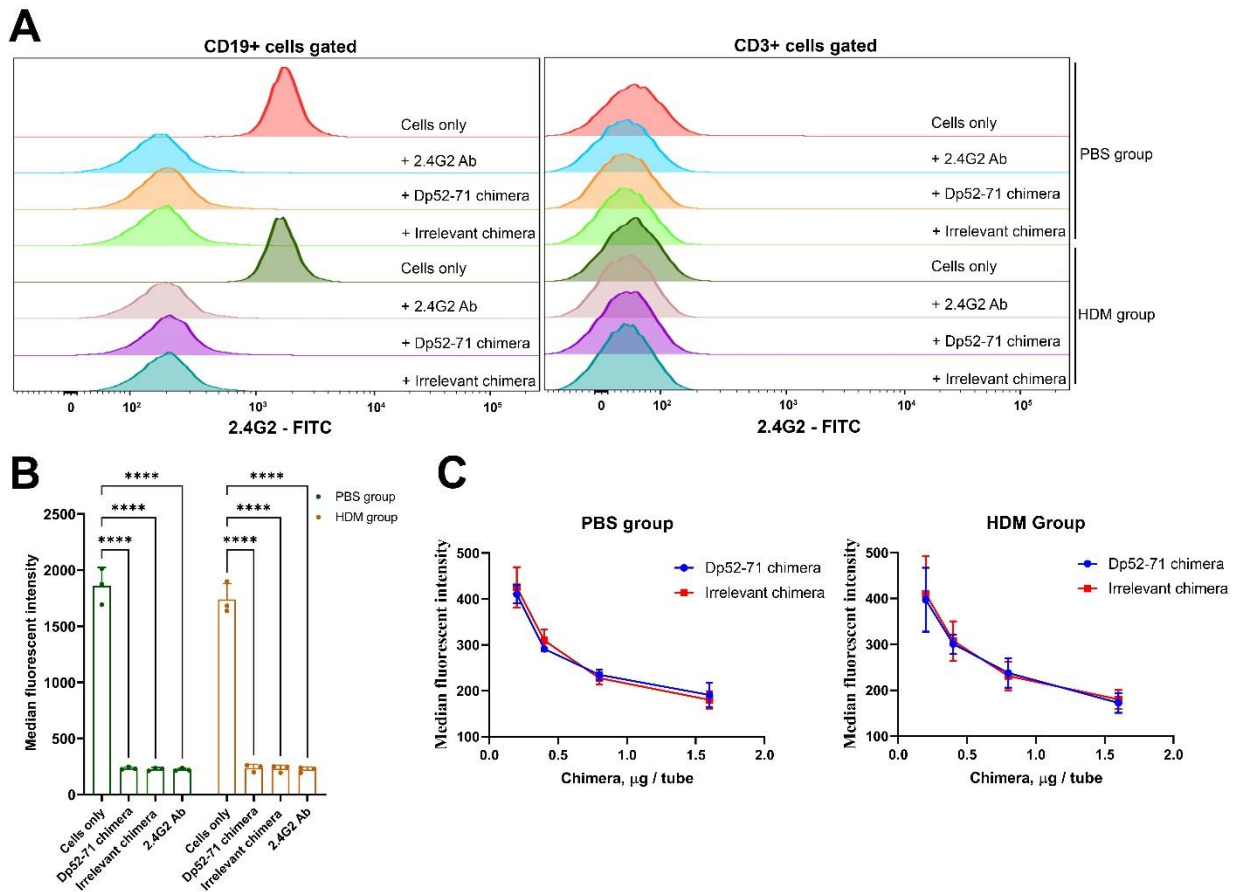
Dp52-71 и *irrelevant* химера бяха конструирани чрез конюгиране на плъше моноклонално антитяло 2.4G2 с пептидни епитопи от алергена Der p 1, или съответно с *irrelevant* пептиди. Способността на химерните молекули да свързват FcγRIIb рецептора беше изследвана чрез FACS анализ, използвайки спленцити от здрави и третирани с HDM мишки (Фигура 6).



Фигура 6. Dp52-71 химерата разпознава FcγRIIb рецептора върху миши В клетки. (А) Свързването на Dp52-71 и *irrelevant* химерата към повърхността на CD19 и CD3 клетките беше установено чрез FACS анализ. Спленцити от здрави и стимулирани с HDM мишки бяха инкубирани с химерите или 2.4G2 антитялото, след което бяха инкубирани с FITC-конюгирано анти-плъше IgG антитяло. (В) Обобщена графика представяща медианния интензитет на флуоресценция на FITC-конюгираното анти-плъше антитяло. Данните са представени като средна стойност ± SD от най-малко 3 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *two-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест; **** $p < 0,0001$.

Dp52-71 и *irrelevant* химерата се свързват към повърхността на CD19 клетки със същата интензивност, както чистото 2.4G2 антитяло както при PBS, така и при стимулирани с HDM мишки (Фигура 6А ляво, В). Не беше наблюдавано подобно свързване в популацията на CD3 положителните клетки (Фигура 6А дясно).

Допълнително анализирахме капацитета на химерните молекули да се конкурират с комерсиално FITC-конюгирано 2.4G2 антитяло за свързването към FcγRIIb рецептора (Фигура 7).

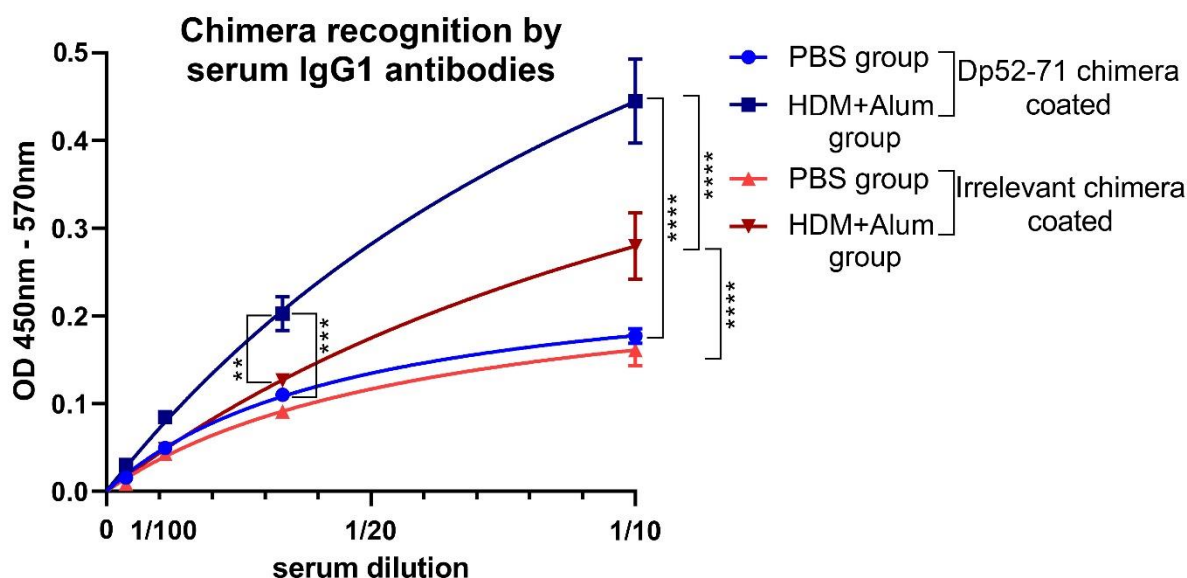


Фигура 7. Dp52-71 химерата се свързва към FcγRIIb рецептора на миши В клетки. (А) Dp52-71 и *irrelevant* химерата се конкурират с комерсиално 2.4G2-FITC антитяло за FcγRIIb рецептора. Спленоцити от здрави и стимулирани с HDM мишки бяха предварително инкубирани с Dp52-71 химера, *irrelevant* химера и чисто 2.4G2 антитяло и бяха вторично инкубирани с 2.4G2-FITC антитяло. Обособените CD19 и CD3 клетъчни популации бяха анализирани чрез FACS. (В) Обобщени данни за свързването на 2.4G2-FITC към FcγRIIb рецептора върху В клетки. (С) Дозозависимо инхибиране на свързването на 2.4G2-FITC към FcγRIIb рецептора. Данните са представени като средна стойност ± SD от най-малко 3 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *two-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест; **** $p < 0,0001$.

Двете химерни молекули и чистото 2.4G2 антитяло показаха сходен капацитет да ангажират FcγRIIb рецептора, като ефективно предотвратяват свързването на

комерсиалното 2.4G2-FITC анти тяло върху CD19 клетки (Фиг. 7А, В). Наблюдаваното инхибиране на свързването беше дозозависимо (Фигура 7С).

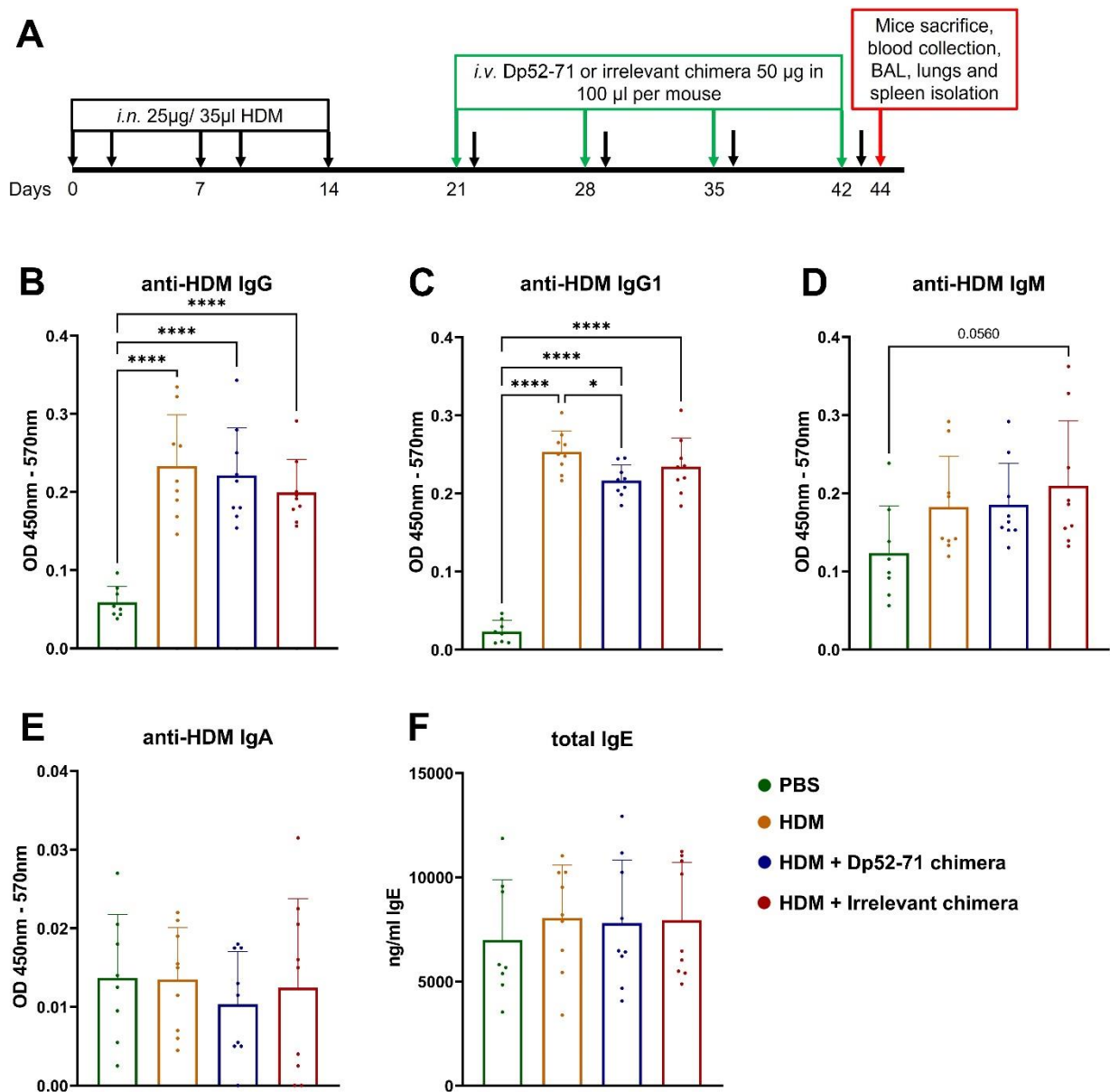
Наличието на Der p 1 пептидни епитопи върху Dp52-71 химерата беше потвърдено чрез ELISA анализ. Установено беше, че серумните IgG1 антитела от животни, сенсibiliзирани с HDM+Alum разпознават Dp52-71 химерата в по-голяма степен спрямо *irrelevant* химерата (Фигура 8).



Фигура 8. Dp52-71 химерата се разпознава от епитоп-специфични серумни IgG1 антитела. Разпознаването на пептидите от Dp52-71 химерата от серумни IgG1 антитела от сенсibiliзирани с HDM+Alum мишки беше анализирано чрез ELISA. Данните са представени като средна стойност \pm SD от най-малко 3 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *two-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

2.2. Серумни нива на HDM-специфични и общи IgE антитела

Разработен беше хроничен миши модел на алергия към домашен прах за да бъдат оценени ефектите на химерните молекули върху проявлението на алергичното възпаление (Фигура 9А). Експерименталните мишки бяха разпределени на случаен принцип в четири групи. Контролната група от здрави животни беше третирана *i.n.* и *i.v.* с PBS (PBS група), а останалите три групи бяха сенсibiliзирани и стимулирани *i.n.* с HDM екстракт. Сенсibiliзираните с HDM животни бяха инжектирани *i.v.* с PBS (HDM група), Dp52-71 химера (група HDM + Dp52-71 химера) или *irrelevant* химера (група HDM + *irrelevant* химера).



Фигура 9. Схема на хроничен миши модел на HDM алергия и схема на третиране (A). ELISA анализ на серумните нива на анти-HDM IgG (B), IgG1 (C), IgM (D), IgA (E) и общи IgE антитела (F) при здрави мишки и мишки сенсibiliзирани с HDM и третирани с PBS, Dp52-71 химера или *irrelevant* химера. Данните са представени като средна стойност \pm SD от 8-9 мишки на група. *p*-стойностите са изчислени с помощта на *one-way ANOVA* и последващ *Tukey's multiple comparisons* тест; **p*<0.05; *****p*<0,0001.

Ефектът на химерните молекули върху нивата на алерген-специфичните антитела в миши серуми беше установен чрез ELISA анализ. Нивата на HDM-специфичните IgG и IgG1 антитела бяха повишени в групите третирани с HDM в сравнение с PBS групата (Фигура 9B, C). Третирането с Dp52-71 химера води до статистически значимо намаление в нивата на анти-HDM IgG1 антителата в сравнение с HDM групата (Фигура 9C). Този ефект не беше наблюдаван при мишките, третирани с *irrelevant* химера. Не

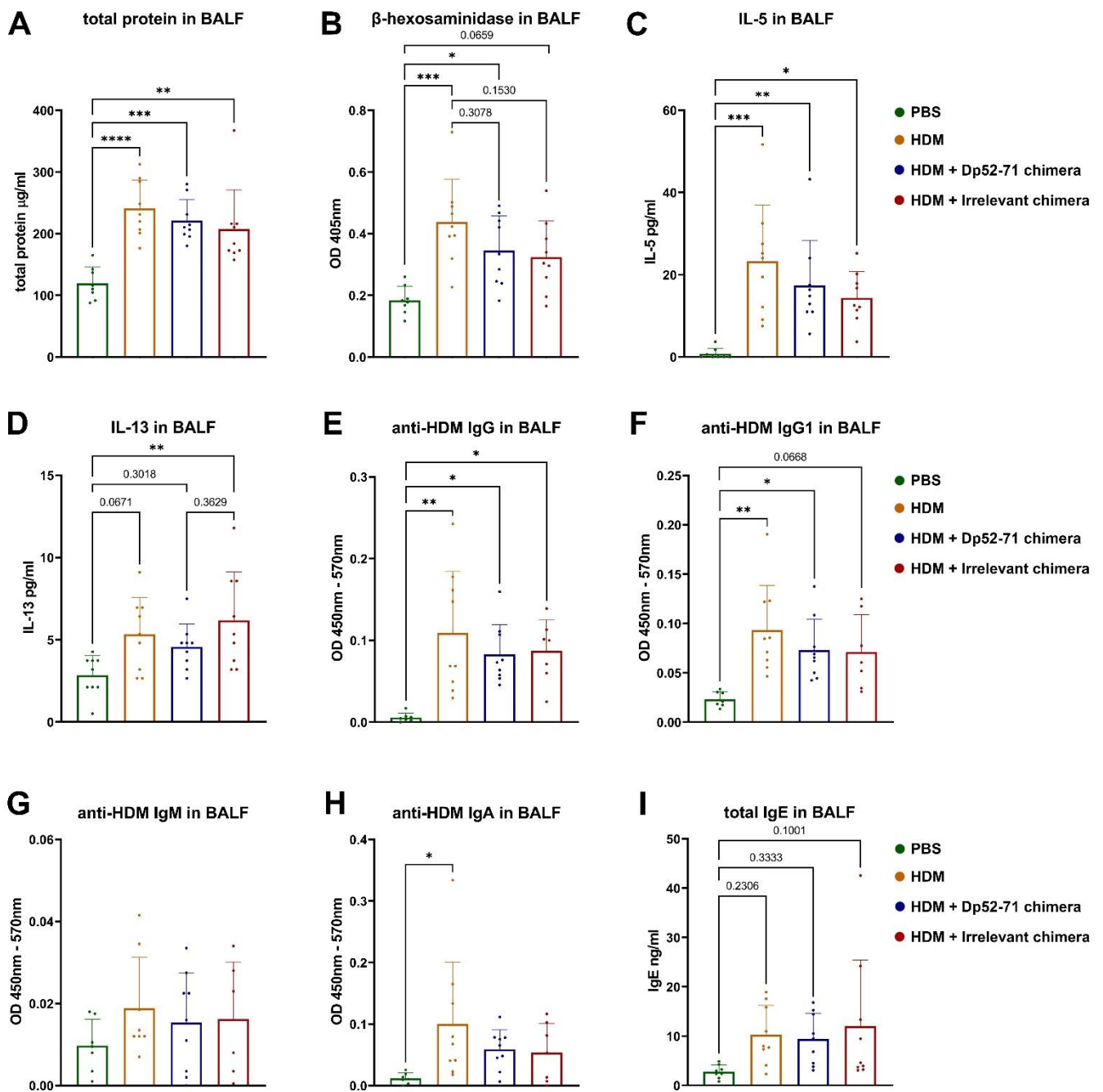
бяха установени статистически значими разлики в нивата на анти-HDM IgG антителата между HDM групата и двете групи третирани с химери (Фигура 9B).

Групите третирани с HDM не показаха статистически значимо повишение в нивата на серумните HDM-специфични IgM антитела в сравнение с мишките, третирани с PBS (Фигура 9D). Въпреки това, беше наблюдавана тенденция за повишаване, достигайки най-голямата си разлика в групата третирана с *irrelevant* химера (p -стойност = 0,056). Не бяха установени значими разлики между групите в серумните нива на HDM-специфичните IgA (Фигура 9E) и общите IgE антитела (Фигура 9F). HDM-специфичните IgE антитела бяха изследвани чрез високочувствителен флуоресцентен ELISA анализ. Не бяха наблюдавани разлики в нивата на анти-HDM IgE антителата между здравите контроли и третираните с HDM мишки (данните не са показани).

2.3. Анализ на протеини в BALF

Изследвахме няколко ключови протеина в проби от BALF за да оценим характеристиките на локалния имунен отговор. Общата концентрация на протеини в BALF беше използвана като маркер за пропускливостта на кръвоносните съдове [176,179]. Друг важен параметър е дегранулацията на мастоцитите в белите дробове, която може да бъде измерена с помощта на анализ на активността на β -хексозаминидазата в BALF [176,180]. Общата протеинова концентрация (Фигура 10A) и ензимната активност на β -хексозаминидазата (Фигура 10B) бяха повишени във всички групи третирани с HDM. Наблюдавана беше тенденция на намалена протеинова концентрация и β -хексозаминидазна активност при сенсibiliзираните с HDM животни, третирани с Dp52-71 или *irrelevant* химера в сравнение с HDM групата.

Мишките от HDM групата показаха повишени нива на цитокина IL-5 (Фигура 10C), анти-HDM IgG (Фигура 10E) и IgG1 антитела (Фигура 10F) в сравнение със здравите мишки.



Фигура 10. Анализ на протеини в проби от BALF. Нивата на общите протеини (A), β -хексозаминидазната активност (B), IL-5 (C), IL-13 (D), HDM-специфичните IgG (E), IgG1 (F), IgM (G), IgA (H) и общите IgE антитела (I) в BALF бяха изследвани във всички групи. Данните са показани като средна стойност \pm SD от 6-9 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *one-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест; *p*-стойностите са посочени на графиките, **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001.

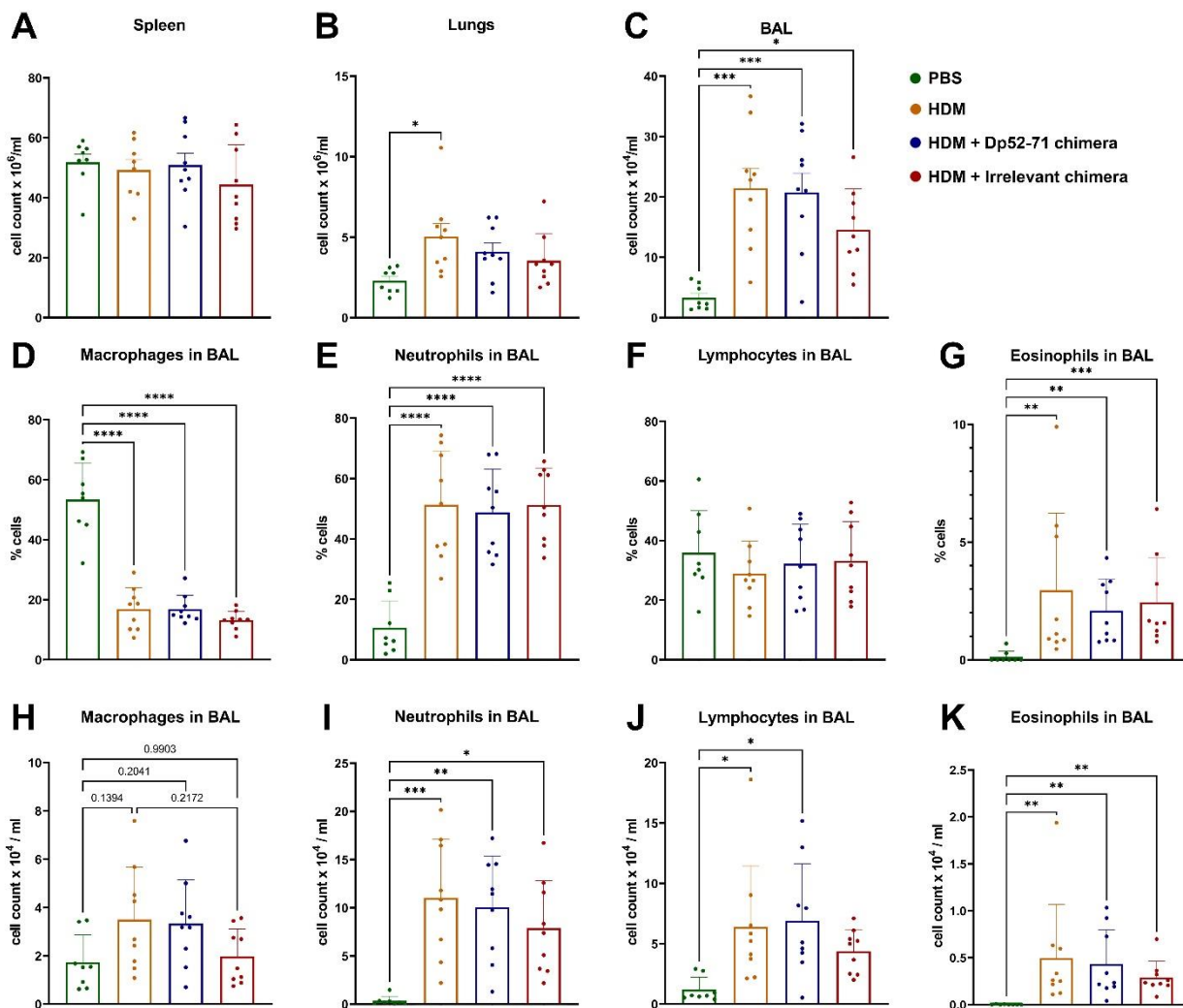
Установено беше намаляване на тези параметри в групите третирани с Dp52-71 или *irrelevant* химера в сравнение с HDM групата, но разликата не беше статистически значима.

Концентрацията на IL-13 в проби от BALF беше по-висока в групата с *irrelevant* химера в сравнение със здрави животни, но подобна статистически значима разлика не беше наблюдавана в групата третирана с Dp52-71 химера (Фигура 10D). Повишени нива на анти-HDM IgA антитела в BALF бяха наблюдавани в HDM-стимулираната група в сравнение с PBS мишките (Фигура 10H). Не бяха наблюдавани статистически значими разлики между отделните групи в нивата на HDM-специфичните IgM (Фигура 10G) и общите IgE антитела (Фигура 10I), както и при цитокините IL-4 и IL-9 (данните не са показани).

2.4. Общ и диференциален брой клетки в BAL

Извършени бяха анализи на общия и диференциалния брой на клетки в BAL с цел проследяване на локалния клетъчен имунен отговор след стимулирането с алергените от HDM. Общият брой на изолираните клетки от белите дробове беше статистически значимо по-висок в HDM групата в сравнение с животните, третирани с PBS (Фигура 11B). Частично намаление без статистическа значимост на този параметър беше установено в групите третирани с Dp52-71 или *irrelevant* химера. Всички групи, третирани с HDM показаха повишен общ брой на клетки в BAL в сравнение с животните, третирани с PBS (Фигура 11C). Тенденция без статистическа значимост за по-малък брой клетки в BAL беше открита в групата третирана с *irrelevant* химера ($p = 0.2686$). Не беше открита разлика в броя на изолираните от слезка клетки между отделните експериментални групи (Фигура 11A).

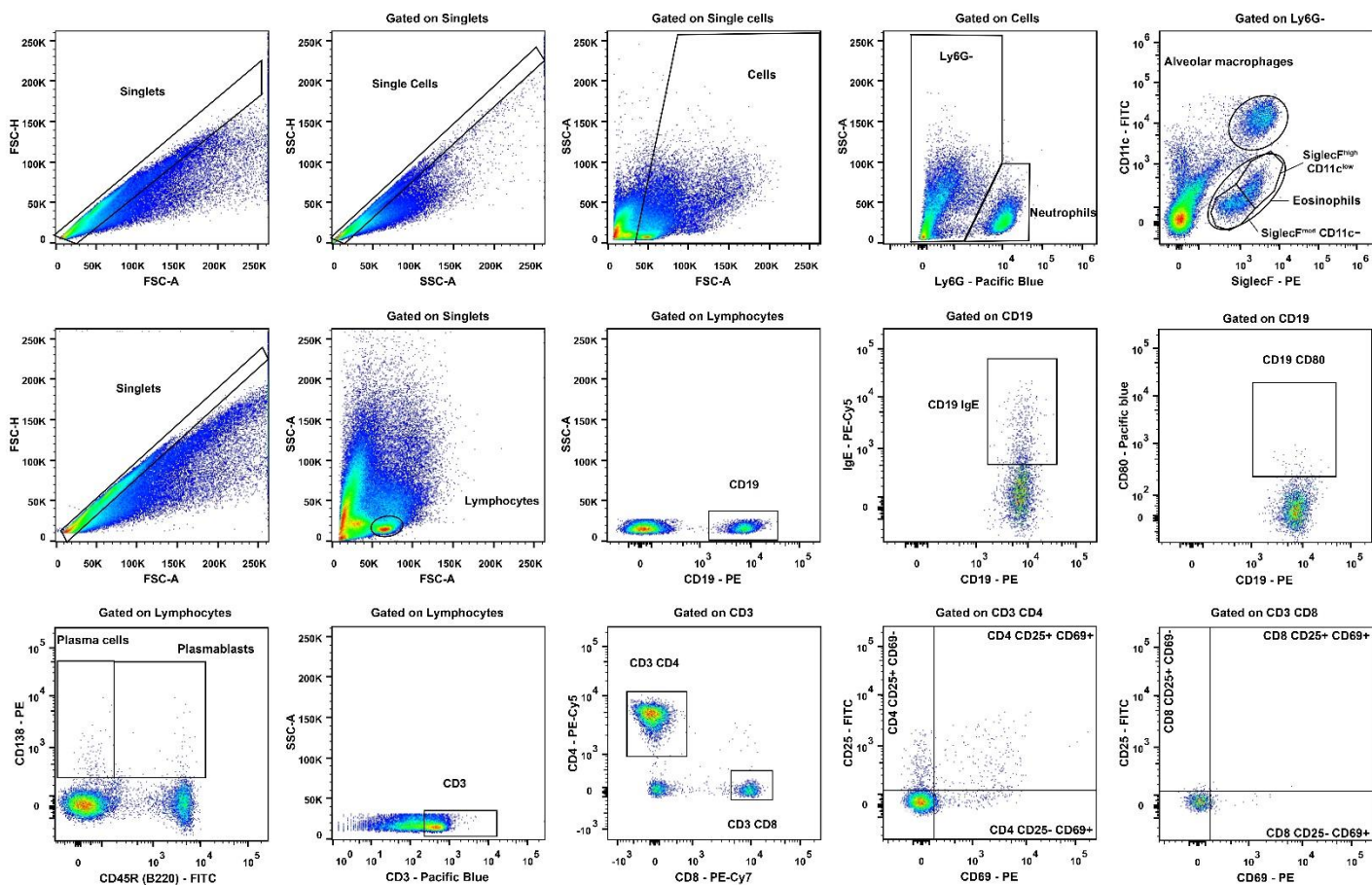
Диференциалното оцветяване и преброяване на клетки в BAL показва по-нисък процент на макрофаги във всички групи, третирани с HDM в сравнение с мишките, третирани с PBS (Фигура 11D). Повишен процент и клетъчен брой на неутрофили (Фигура 11E, I), еозинофили (Фигура 11G, K) и лимфоцити (Фигура 11J) бяха открити в групите, стимулирани с HDM алергени в сравнение със здрави мишки. Не бяха установени статистически значими разлики в тези параметри между групите, третирани с HDM.



Фигура 11. Общ брой клетки (на милилитър) изолирани от слезка (A), бели дробове (B) и BAL (C). Диференциално оцветяване на клетки в BAL, показващо макрофаги (D, H), неутрофили (E, I), лимфоцити (F, J) и еозинофили (G, K) и изразено като проценти и брой клетки на ml възстановена течност от BAL. Данните са показани като средна стойност \pm SD от 8-9 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *one-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест или чрез *Kruskal-Wallis* тест с последващ *Dunn's multiple comparisons* тест в зависимост от нормалността на разпределението на данните; *p*-стойностите са посочени на графиките, **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001.

2.5. Фенотипизиране на имунни клетки в бели дробове

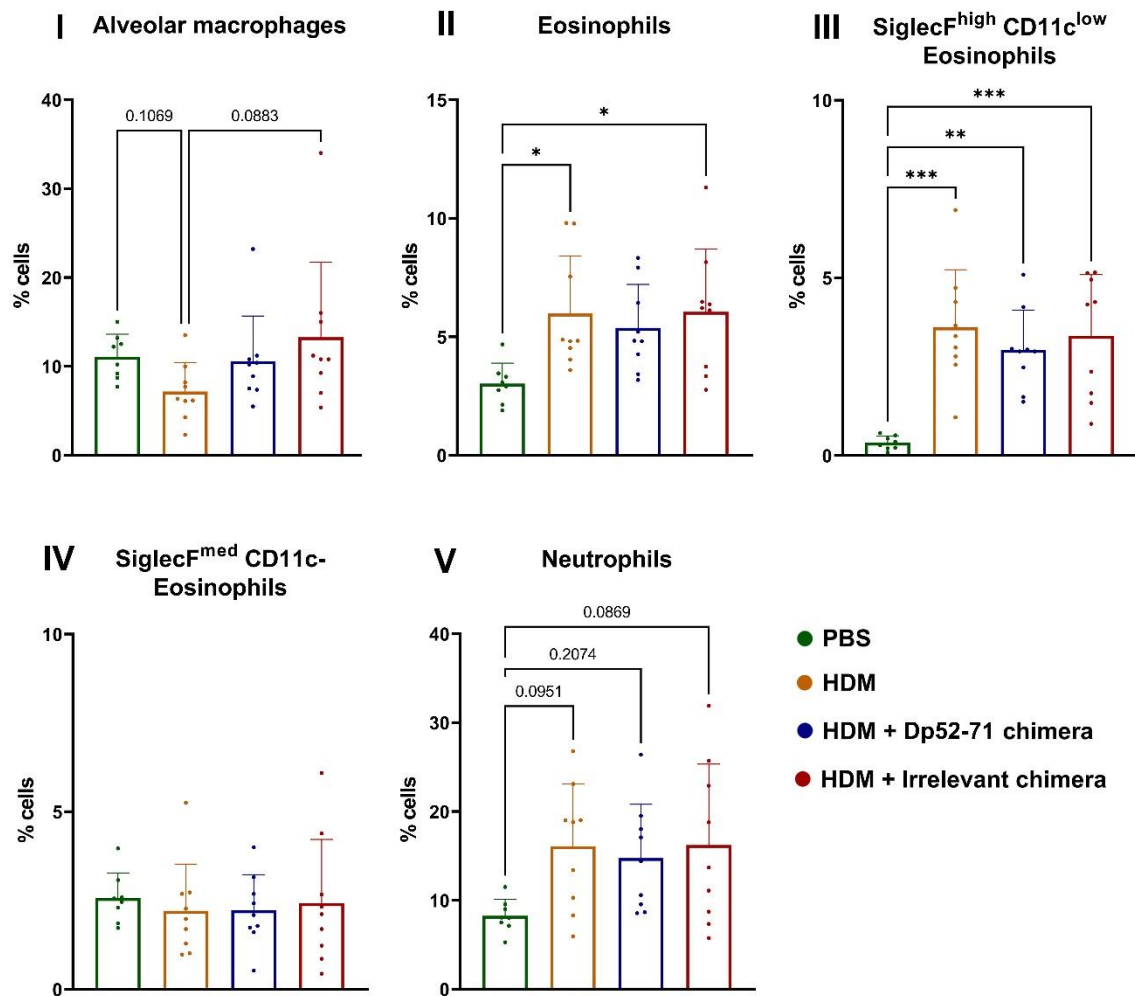
Извършено беше фенотипизиране чрез FACS анализ на популациите от имунни клетки в белите дробове с цел по-добро характеризиране на локалното възпаление (Фигура 12).



Фигура 12. Стратегия за обособяване на отделни клетъчни популации при фенотипизиране на имунни клетки в белите дробове чрез FACS анализ. Стратегия за обособяване на популации на миелоидни клетки (първи ред), В клетки и анти тяло-секретиращи клетки (втори ред) и Т клетки (трети ред).

Първо, изследвахме фенотипа на миелоидните клетки за които е известно, че играят важна роля в този тип възпаление (Фигура 13). Установен беше повишен процент еозинофили в белите дробове на HDM групата и групата, третирана с *irrelevant* химера в сравнение със здравите контролни животни (Фигура 13 II). Две различни популации от еозинофили бяха обособени въз основа на повърхностните маркери SiglecF и CD11c. Еозинофилите SiglecF^{high} CD11c^{low}, описани в литературата като по-активираната популация бяха повишени в групите, третирани с HDM в сравнение със здравите животни (Фигура 13 III). Установена беше тенденция без статистическа значимост за по-малък процент на тези клетки в групата, третирана с Dp52-71 химерата спрямо HDM групата ($p = 0,7483$). Не бяха наблюдавани разлики между групите при втората обособена еозинофилна популация, характеризирани като SiglecF^{med} CD11c- (Фигура 13 IV) и описана в литературата като тъканно резидентна и по-малко активирана [181,182].

Разлики между групите не бяха открити и в популацията на алвеоларните макрофаги (Фигура 13 I). Частично увеличение без статистическа значимост беше установено при неутрофилите във всички групи, третиран с HDM (Фигура 13 V).



Фигура 13. Фенотипизиране на миелоидни имунни клетки чрез FACS анализ в бели дробове. Характеризиране на различни типове миелоидни клетки – алвеоларни макрофаги (I), SiglecF^{high} CD11c^{low} (III), SiglecF^{med} CD11c- (IV) и общи еозинофили (II), и неутрофили (V), представени като процент от родителската популация. Данните са показани като средна стойност ± SD от 8-9 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *one-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест или чрез *Kruskal-Wallis* тест с последващ *Dunn's multiple comparisons* тест, в зависимост от нормалността на разпределението на данните; *p*-стойностите са посочени на графиките, **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001.

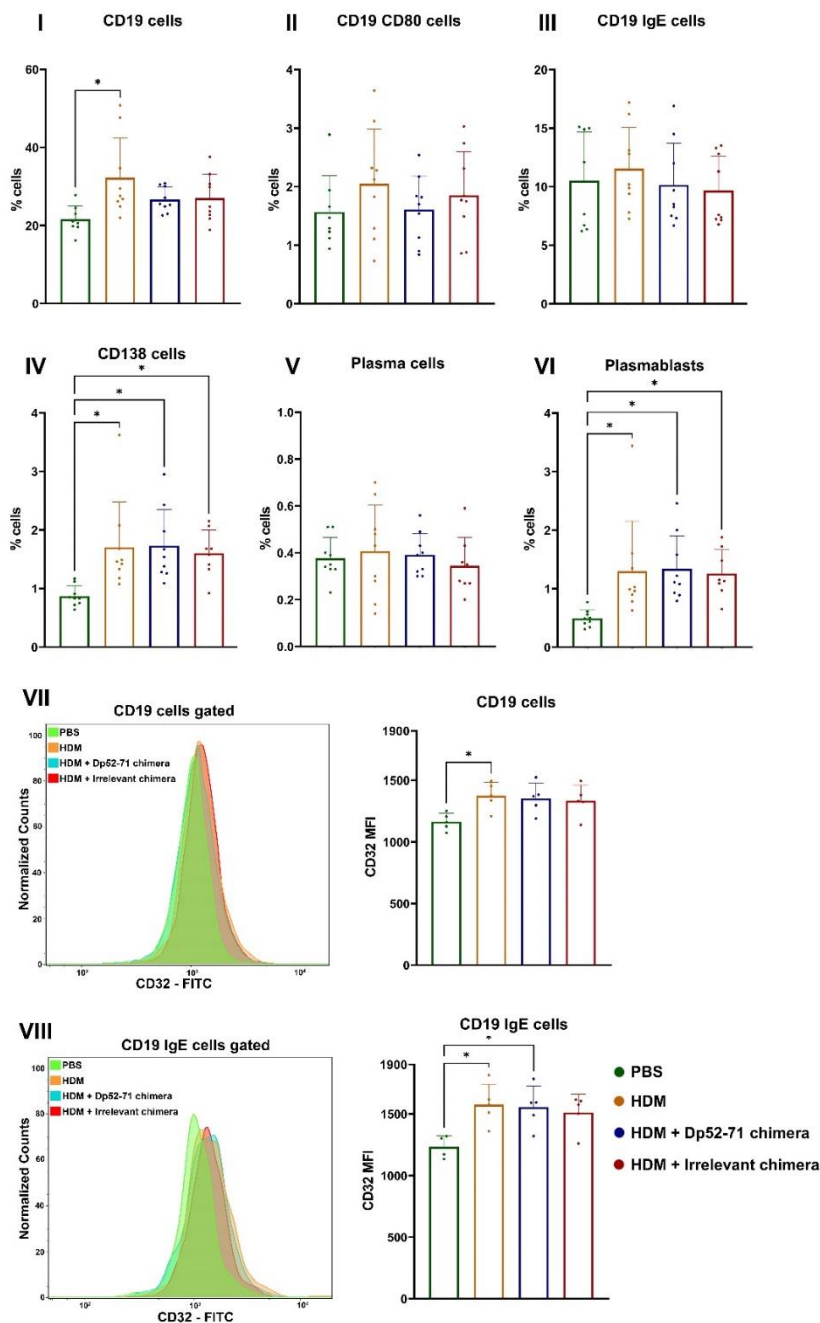
Тъй като химерните молекули са насочени към алерген-специфичните В клетки, характеризирането на този клетъчен тип, както и на анти тяло-секретиращите клетки представлява голям интерес за нашите изследвания (Фигура 14). FACS анализът разкри значително увеличен брой CD19⁺ клетки в HDM групата в сравнение със здравите

мишки (Фигура 14 I). Частично увеличение без статистическа значимост беше наблюдавано и при групите, третирани с Dp52-71 или *irrelevant* химера.

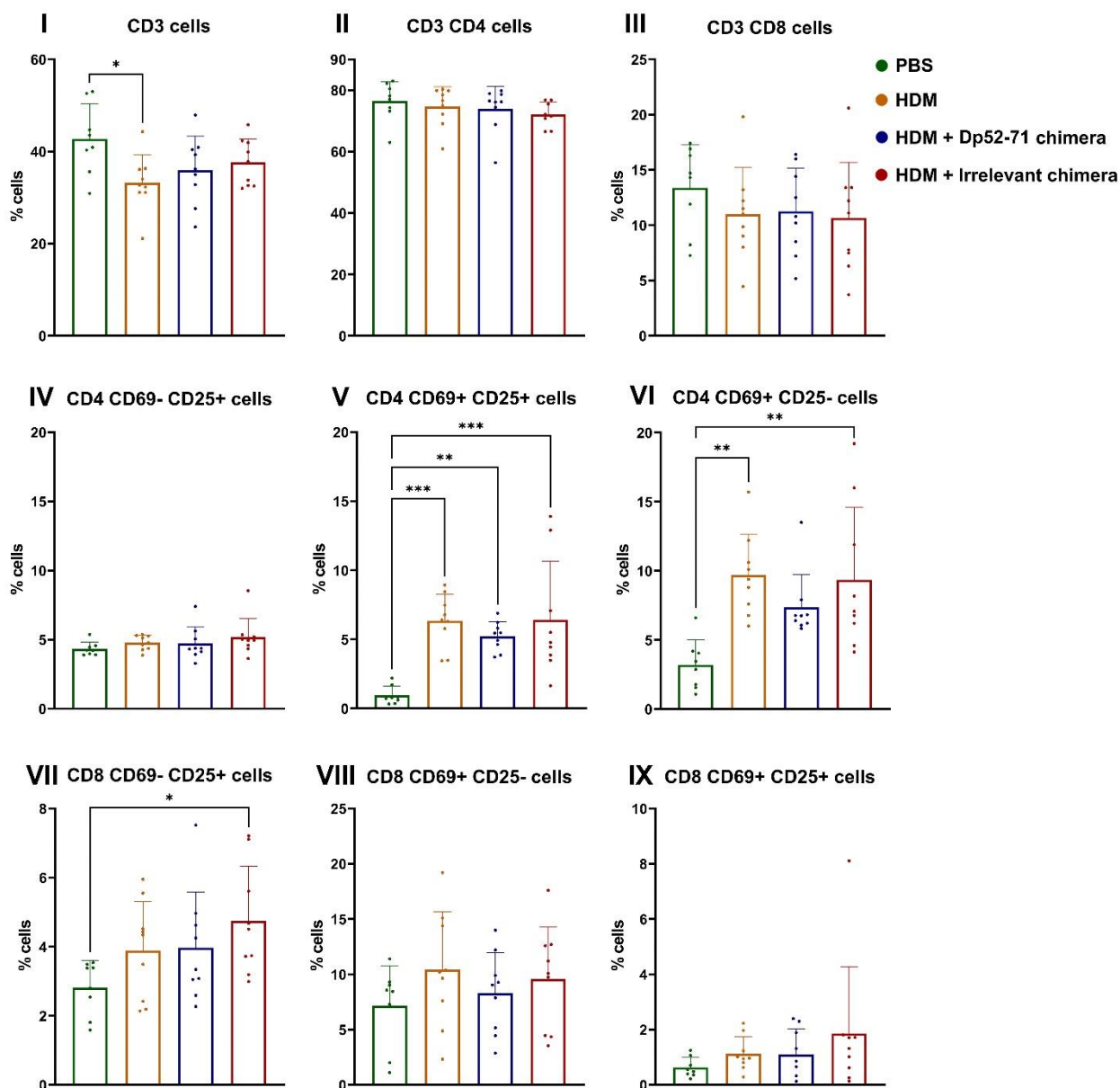
Експресията на CD32 (FcγRIIb) върху В клетките е важна, тъй като това е целевия протеин, който разпознават химерните молекули. Експресията, изразена като среден флуоресцентен интензитет (MFI) на CD32 върху CD19 клетки (Фигура 14 VII), както и върху CD19+ IgE+ клетки (Фигура 14 VIII) беше статистически значимо повишена в HDM групата в сравнение с мишките, третирани с PBS. Установено е, че в някои случаи FcγRIIb може да предизвика инхибиторни сигнали в В клетките независимо от В-клетъчния рецептор (BCR) [183,184]. Наблюдаваната свръхекспресия в HDM-стимулираните мишки може да обясни сходните тенденции в някои параметри при групите третирани с Dp52-71 или *irrelevant* химера. Приложението на Dp52-71 или *irrelevant* химера не повлиява експресията на CD32 върху CD19+ и върху CD19+ IgE+ клетки в сравнение с HDM групата.

Процентите на общите антияло-секретиращи клетки (CD138 положителни клетки) (Фигура 14 IV) и плазмобластите (Фигура 14 VI) са по-високи във всички HDM-стимулирани групи, в сравнение със здравата контролна група. Не бяха открити значителни разлики между отделните групи в броя на плазмоцитите (Фигура 14 V), CD19+ CD80+ (Фигура 14 II) и CD19+ IgE+ (Фигура 14 III) експресиращите клетки.

Т-клетъчните подтипове в белите дробове на третирани с HDM мишки също бяха анализирани (Фигура 15). Анализът показва значително намален брой CD3+ клетки в HDM групата в сравнение със здравите мишки (Фигура 15 I). Въпреки това, не бяха установени разлики в процента на CD3+ CD4+ (Фигура 15 II) и CD3+ CD8+ Т клетките (Фигура 15 III). Активирани Т-клетъчни подтипове CD4+ CD69+ CD25+ (Фигура 15 V) и CD4+ CD69+ CD25- (Фигура 15 VI) бяха повишени във всички третирани с HDM групи в сравнение с контролните животни. Установено беше намаляване без статистическа значимост на тези клетки в групата третирана с Dp52-71 химера в сравнение с HDM групата (CD4+ CD69+ CD25+, $p=0.7675$; CD4+ CD69+ CD25-, $p=0.4809$). Не бяха установени значими разлики между групите в субпопулациите на активирани CD8+ клетки (Фигура 15 VIII, IX).



Фигура 14. Фенотипизиране на В клетки и антияло-секретиращи клетки в бели дробове чрез FACS анализ. Представени са обобщени данни за процентите на CD19 клетки (I), CD19 CD80 клетки (II), CD19 IgE клетки (III), CD138 клетки (IV), плазмоцити (V) и плазмобласти (VI). Такива обобщени данни също са представени за средния флуоресцентен интензитет (MFI) на CD32 върху CD19 (VII) и CD19 IgE клетки (VIII). Данните са показани като средна стойност \pm SD от 8-9 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *one-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест или чрез *Kruskal-Wallis* тест с последващ *Dunn's multiple comparisons* тест, в зависимост от нормалността на разпределението на данните; *p*-стойностите са посочени на графиките, **p*<0.05.



Фигура 15. Фенотипизиране на Т-клетъчни популации в бели дробове чрез FACS анализ. Представени са обобщени данни за процентите на CD3 клетки (I), CD3 CD4 клетки (II), CD3 CD8 клетки (III), CD4 CD69- CD25+ клетки (IV), CD4 CD69+ CD25+ клетки (V), CD4 CD69+ CD25- клетки (VI), CD8 CD69- CD25+ клетки (VII), CD8 CD69+ CD25- клетки (VIII) и CD4 CD69+ CD25+ клетки (IX). Данните са показани като средна стойност \pm SD от 8-9 мишки на група. Разликите между групите бяха оценени чрез *one-way ANOVA* тест последван от *Tukey's multiple comparisons* тест или чрез *Kruskal-Wallis* тест с последващ *Dunn's multiple comparisons* тест, в зависимост от нормалността на разпределението на данните; *p*-стойностите са посочени на графиките, **p*<0.05.

2.6. Хистопатологично изследване на бели дробове

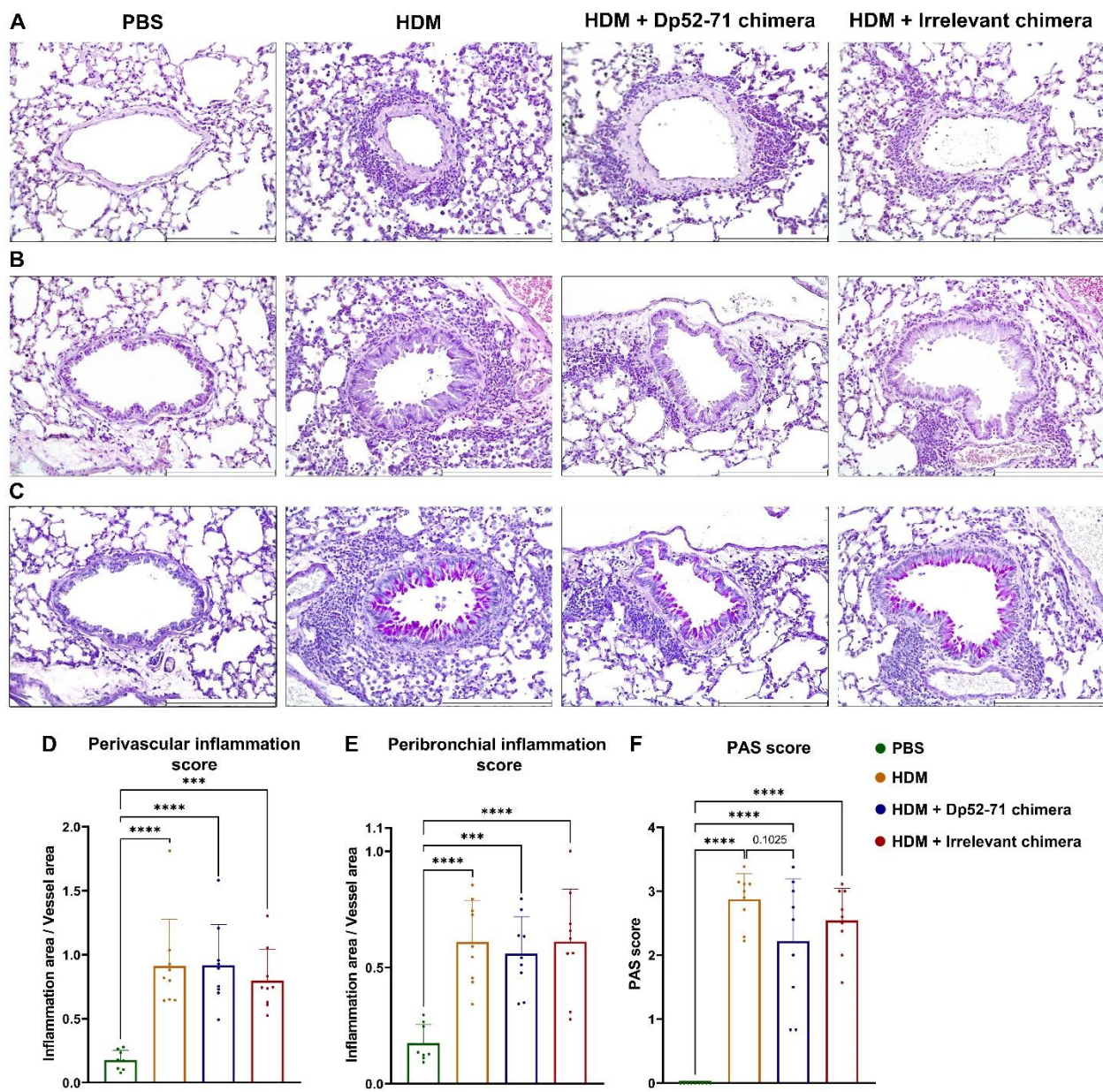
Накрая, общото алергично възпаление в белите дробове беше изследвано чрез хистологичен анализ. Оцветяването с хематоксилин и еозин (H&E) на миша белодробна тъкан разкри периваскуларна (Фигура 16A, D) и перибронхиална (Фигура 16B, E)

клетъчна инфилтрация във всички третирани с HDM групи, като не бяха наблюдавани значими разлики между самите тях.

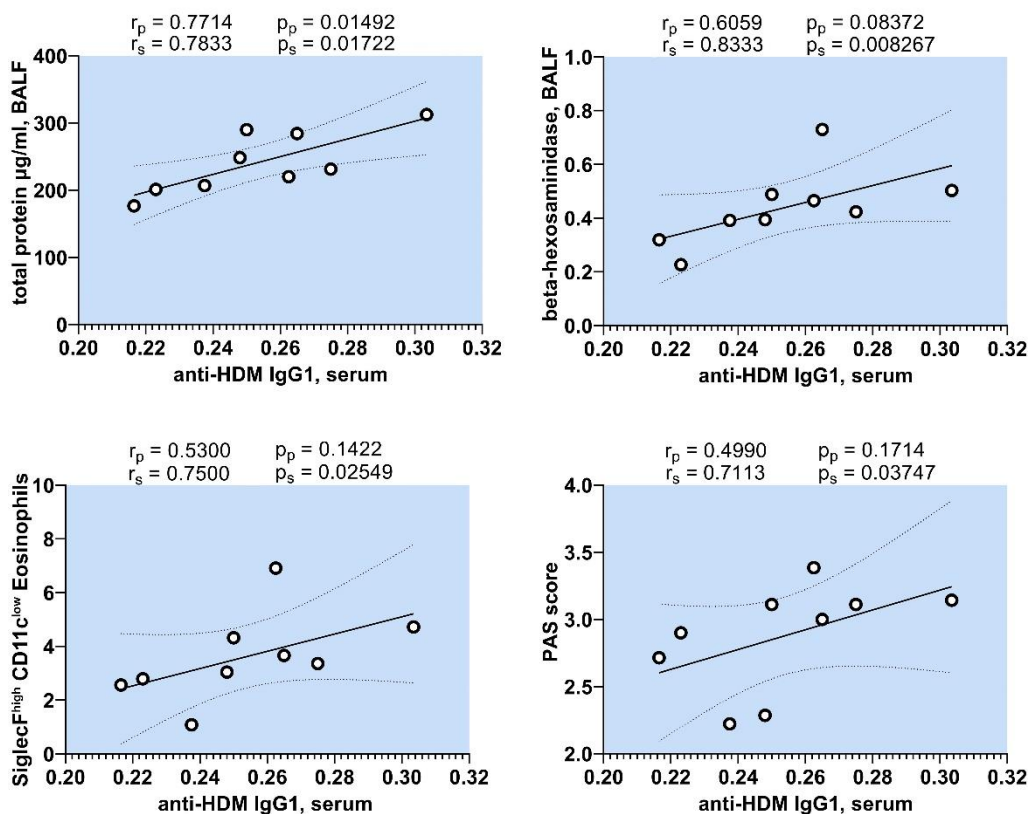
PAS-позитивните епителни клетки на дихателните пътища представляващи gobletните клетки, отговорни за производството на мукус, бяха открити в дихателните пътища на групите третирани с HDM, но не и в здравите мишки (Фигура 16C, F). Установено беше намаление на хистопатологичния PAS *score* при животните третирани с Dp52-71 химера в сравнение с HDM групата, и с *p*-стойност близка до статистическата значимост ($p = 0.1025$).

2.7. Корелационен анализ в HDM групата

Въпреки че мишите модели за индуциране на HDM-алергия имат сходни протоколи, резултатът от тяхното алергично възпаление често се различава [185]. За да характеризираме по-добре нашия модел на HDM алергия и връзките между отделните изследвани параметри, извършихме корелационен анализ в рамките на HDM групата. Този допълнителен анализ на данни може да ни помогне да разберем по-добре връзката между интересуващите ни имунологични параметри. Фигура 9C показва, че прилагането на Dp52-71 химерата води до намаляване на нивата на HDM-специфични IgG1 антитела в серума. Въпреки това, влиянието на Dp52-71 химерата върху другите имунологични параметри няма или има слаб ефект, който е недостатъчен за достигане на статистическа значимост. Поради това направихме корелационен анализ, за да проучим как анти-HDM IgG1 антителата са свързани с параметрите показващи алергично възпаление. Установена беше силна статистически значима положителна корелация между серумните нива на анти-HDM IgG1 антителата и общата протеинова концентрация в BALF, ензимната активност на β -хексозаминидаза в BALF, процентите на SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофилите в белите дробове и PAS *score* на белите дробове (Фигура 17). Тези резултати ни дават основание да предположим, че наблюдаваните тенденции, които не са статистически значими между групата третирана с Dp52-71 и HDM групата може да са резултат от слабия ефект, който генерираме чрез таргетиране на В клетките специфични само към един епитоп, който е част само от един алерген.



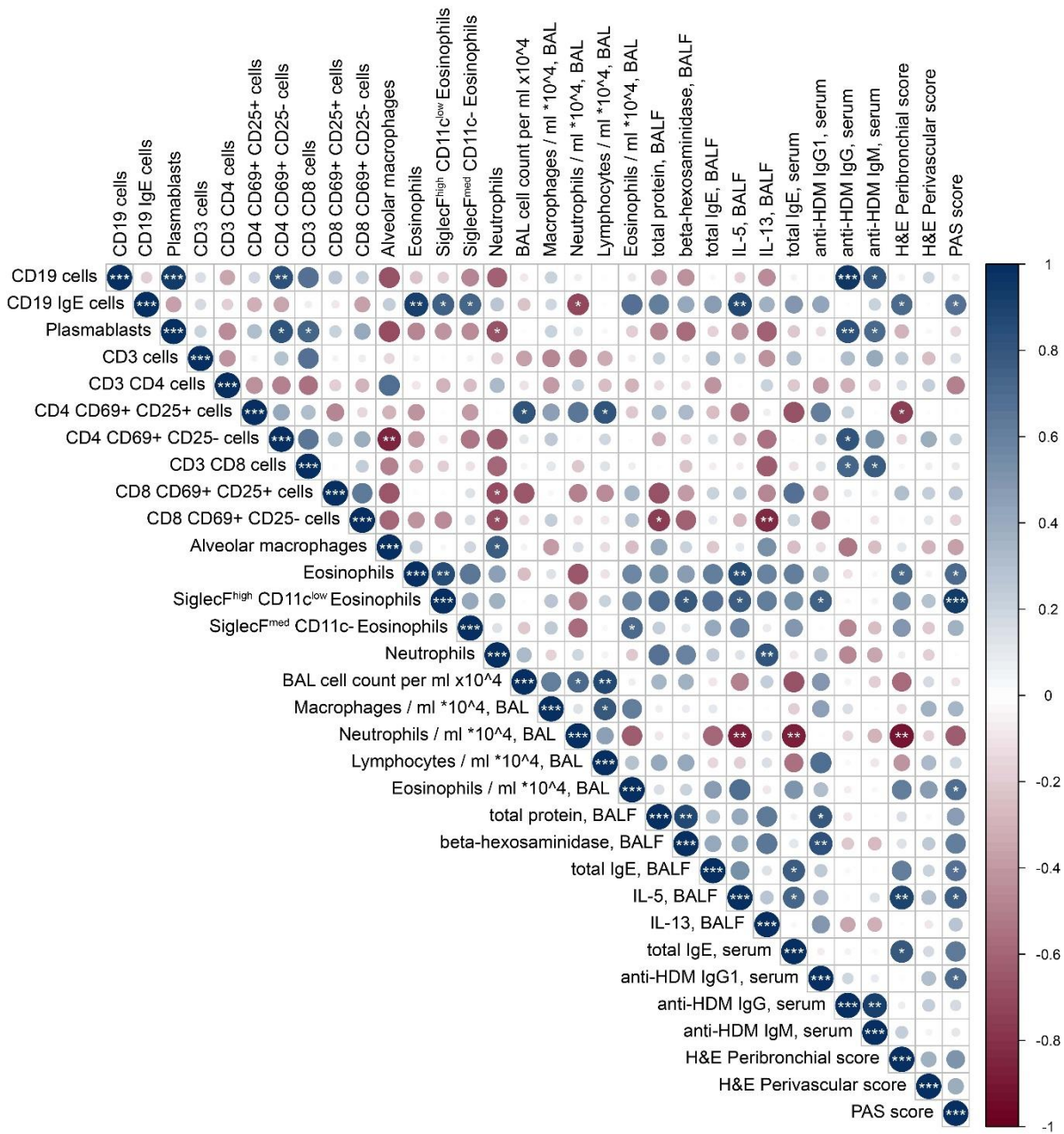
Фигура 16. Хистопатологичен анализ на бели дробове. Представителни изображения и хистологична оценка (*score*) на периваскуларно (A, D) и перибронхиално (B, E) възпаление на белодробна тъкан оцветена с H&E, PAS *score* (F) и представителни изображения показващи секрецията на мукус (C). Размер на скалата, 250 μ m. Данните са представени като средна стойност \pm SD от 8-9 мишки на група. *p*-стойностите бяха изчислени с помощта на *one-way ANOVA* тест с последващ *Tukey's multiple comparisons* тест; *p*-стойностите са посочени на графиките, ****p*<0.001; *****p*<0,0001.



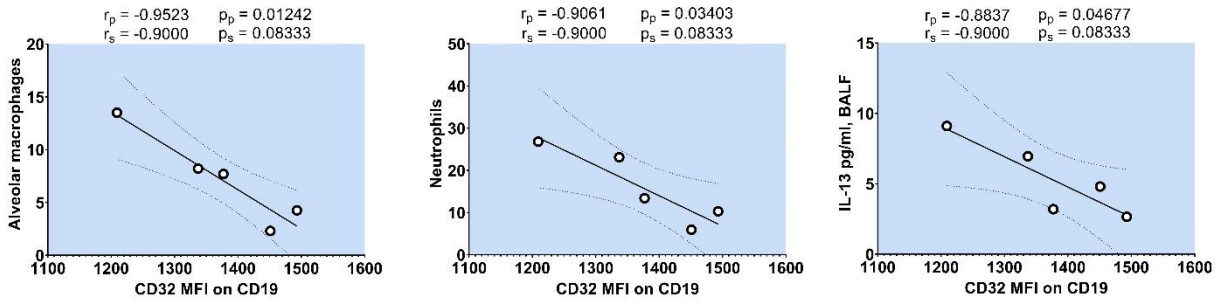
Фигура 17. Корелационен анализ в HDM групата. Корелационен анализ на серумните нива на анти-HDM IgG1 спрямо общата протеинова концентрация в BALF, ензимната активност на β -хексозаминидаза в BALF, процентите на SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофилите в белите дробове и PAS score на белите дробове. Коефициентът на корелация на *Pearson* (r_p) и *Spearman* (r_s) и *p*-стойностите при корелационния анализ на *Spearman* (p_s) и *Pearson* (p_p) са посочени над всяка фигура.

Процентът на SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофилите в белите дробове показва положителна корелация с β -хексозаминидазата и IL-5 в BALF, както и силна положителна корелация с PAS score (Фигура 18). Интересно е, че серумните нива на анти-HDM IgG антителата не корелират с параметрите, корелиращи с анти-HDM IgG1 антителата.

Друг интересен резултат в това изследване е свръхекспресията на CD32 по повърхността на белодробните В клетки в модела на HDM алергия. В допълнение, ние имахме за цел да определим дали тази свръхекспресия корелира с други изследвани имунологични параметри в този миши модел. Резултатите показаха значителна отрицателна корелация между CD32 MFI сигналът върху В клетките в белите дробове и процента на алвеоларните макрофаги и неутрофили в белите дробове, както и концентрацията на IL-13 в BALF (Фигура 19).



Фигура 18. Корелационен анализ в HDM групата. Корелационна матрица на ключови имунологични параметри, направена чрез теста на *Spearman* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Фигура 19. Корелационен анализ в HDM групата. Корелационен анализ на експресията на CD32 върху В клетки в белите дробове спрямо процента на алвеоларните макрофаги и неутрофили в белите дробове, както и концентрацията на IL-13 в BALF. Коефициентът на корелация на *Pearson* (r_p) и *Spearman* (r_s) и p -стойностите при корелационния анализ на *Spearman* (p_s) и *Pearson* (p_p) са посочени над всяка фигура.

V. ДИСКУСИЯ

1. Хуманизиран миши модел на алергия към домашен прах

Счита се, че генерирането на IgE антитела с висок афинитет е ключова стъпка за алергичните заболявания, при които малко количество от алергена в околната среда има способността да предизвика много силен отговор на свръхчувствителност. Известно е, че има корелация на серумните нива на IgE и броя на FcεRI рецепторите, експресирани върху базофили и мастоцити [76,186]. Следователно елиминирането на циркулиращите IgE антитела или IgE-продуциращите В клетки като патологични фактори при възпалителната каскада може да бъде обещаващ терапевтичен подход.

Към момента само няколко терапевтични подхода, при които се използват антитела са одобрени за лечение на алергични пациенти и намаляване на алергичната реакция. Пациенти с алергия и алергична астма, лекувани с *omalizumab* показват намаляване на тъканната еозинофилия и секрецията на възпалителни медиатори, както и намаляване на броя на IgE-позитивните и FcεRI-позитивните клетки в субмукозата. Тези пациенти също така показват редуциране на броя на IL-4-продуциращите клетки и намален общ брой на активираните CD4 и CD8 Т лимфоцити в респираторния тракт. *Omalizumab* е одобрен за лечение на тежка персистираща алергична астма особено при пациенти, които не се повлияват от конвенционалните терапии [187,188]. Като алтернативен подход за лечение на алергичните заболявания са разработени епитоп-специфични терапевтични стратегии. Химично модифицирани алергенни епитопи, както и различни носители са тествани с цел модулиране на имунния отговор, потискане на производството на IgE или индуциране на толеранс [189,190].

Друг логичен терапевтичен подход е инхибирането на производството на IgE антитела от В клетките, които специфично разпознават алергена. Настоящото проучване използва тази терапевтична стратегия ангажирайки инхибиторния CR1 и алерген-специфичния В-клетъчен рецептор чрез протеинов конструкт, който е в състояние да омрежва и двете структури по клетъчната мембрана. Доказано е, че подобна изкуствено създадена биспецифична химерна молекула, носеща анти-CR1 антитяло би разпознала преференциално асоциираните с болестта целеви В клетки, вместо други CR1-положителни клетки [165,166].

Инхибиторната функция на човешкия CR1 е потвърдена от няколко автора [147,150,165,166]. *Józsi et al.* демонстрират, че агрегираният C3, който имитира C3b - естественият лиганд на CR1, води до намаляване на нивото на свободния Ca²⁺ и

инхибира фосфорилирането на цитоплазмените протеини след свързване на CR1 върху BCR-активирани лимфоцити [147]. Този инхибиторен капацитет на CR1 е демонстриран и при пациенти със системен лупус еритематозус [148,151,166].

Der p 1, основният алерген от акарите на домашния прах съдържа няколко В- и Т-клетъчни епитопа, участващи в индуцирането на алергичния имунен отговор [170–172]. За конструирането на нашата химерна молекула, насочена към патологичните Dpt-специфични В клетки ние използвахме малък синтетичен пептид (p52-71), съдържащ един от В-клетъчните епитопа от Der p 1, конюгиран към анти тяло специфично за CR1. Този имунодоминантен пептид е доказан като ефективен индуктор на клетъчното активиране и проявява своята биологична активност само при FcεR+-експресиращи клетки от Dpt-чувствителни пациенти [171]. Разпознаването на Der p 1 епитопа от анти-Der p 1 IgG и IgE антителата след конюгацията пептид-анти тяло е установено чрез ELISA и Western blot в предишно изследване [174].

Молекулярният механизъм на процеса на вътреклетъчна сигнализация, иницииран от CR1 е все още неизвестен. Тъй като цитоплазмената опашка на рецептора е много къса може да се предположи, че рецепторната молекула не е в състояние да предава сигнали самостоятелно. Механизмът на сигнализация през CR1 все още не е изследван и досега не е идентифицирана молекула, която да участва в медираното от CR1 блокиране на BCR-индуцираните функции на човешки В клетки. В предишни изследвания беше доказано, че Dp52-71 химерата задейства сигнал независим от BCR чрез CR1 в В клетки изолирани от сливици, което води до фосфорилиране на тирозин в протеин с приблизително молекулно тегло 30–32 kDa. Тези данни предполагат съществуването на неизвестен досега инхибиторен път в човешките В клетки, който е иницииран от свързването на CR1 [176]. Инхибирането чрез CD35 осигурява допълнителна регулаторна контролна точка, чрез която имунните комплекси и продуктите от разграждането на С3 могат да ограничат активирането и функцията на В клетките.

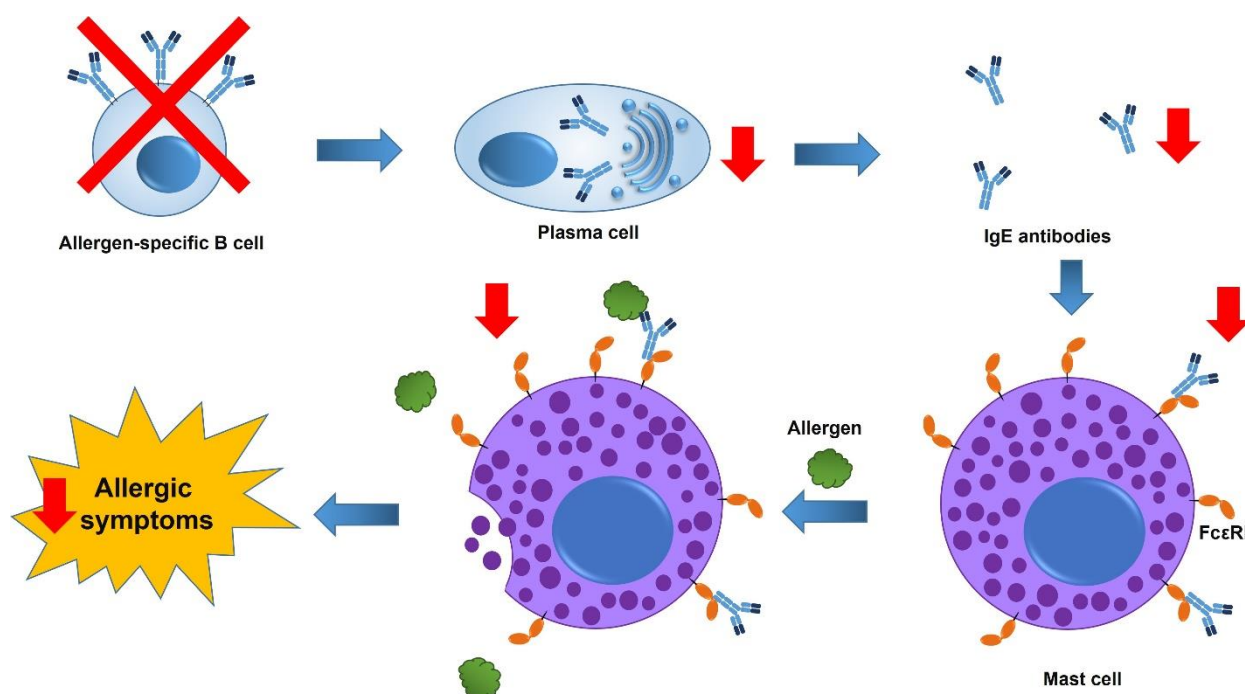
Имунодефицитните миши линии SCID, NSG и Rag2- γс- не развиват функционални Т, В (и NK) лимфоцити, което ги прави толерантни към трансплантация на ксеногенни клетки като човешки лимфоидни клетки и позволяват ограничена способност за диференциация и съзряване [138,139]. Изследванията показват, че SCID мишки с трансферирани PBMCs от HDM-сенсibiliзирани пациенти и подложени на интраназална стимулация с Dpt алерген, развиват алергична реакция, подобна на тази при хора: с Th2-медиран отговор, производство на алерген-специфични IgE антитела и

възпалителна реакция на респираторния тракт. Доказано е, че трансферът на 1×10^7 РВМС е достатъчен, за да доведе до производството на достатъчни за детекция нива на човешки IgE антитела [142–144]. Пасивната имунизация на SCID мишки със серуми от Dpt-сенсibiliзирани пациенти разкрива, че човешките IgE антитела могат да се свързват към миши мастоцити и стимулирането с алерген води до незабавен имунен отговор от тип 1 [145].

За да изследваме селективното елиминиране или потискане на Der p 1-специфични В лимфоцити в условия *in vivo* ние използвахме модел на алергия към НДМ в хуманизирани Rag2- γ - мишки базиран на протоколи за сенсibiliзация и стимулиране с НДМ, прилагани при интактни BALB/c мишки [131]. В предишни изследвания доказахме, че химерните молекули съдържащи Der p 1-пептиди са способни да омрежат Der p 1-специфичните BCR рецептори и CR1 върху алерген-специфичните В клетки от пациенти с НДМ алергия, което води до значително намаляване на броя на плазмоцитите секретирани анти-Dpt IgE антитела в *in vitro* условия [174]. Очаква се, че специфичната терапия с конструираното химерно антитяло би следвало да има повече предимства при условия *in vivo* поради двувалентната специфичност и следователно може селективно да потисне патологичните Dpt-специфични В клетки и производството на анти-Dpt IgE антитела. Установено беше, че при Rag2- γ - мишки, хуманизирани с РВМС от пациенти с НДМ алергия и третирани с Dp52-71 химера има намаление в нивата на Dpt-специфичните IgE антитела в BALF, както и в броя на човешките CD45, CD3 и CD4 клетки в белите дробове в сравнение с животните, третирани с контролна химера. За разлика от това, значително по-голям брой човешки CD8 Т клетки бяха открити в мишките, третирани с Dp52-71 химера, като данни от други автори предполагат, че увеличената популация на човешки IFN- γ -продуциращи CD8 Т клетки потискат Th2 имунния отговор [191].

Тъй като за конструирането на химерните молекули беше използван само един епитоп (p52-71), не беше възможно потискането на всички Der p 1-специфични В клетки, разпознаващи множеството различни Der p 1 епитопи. Значителното понижаване на анти-Der p 1 IgE антителата може да е резултат от феномена на разпространение на епитопа (epitope spreading), който е известен при случаите на алергия и автоимунитет. Например, използването на пептидна ваксина от алергена Fel d1 води до индуциране на имунен отговор към епитопи от Fel d1, които не са включени във ваксината [192]. Този феномен би могъл да обясни и значителното намаляване на другите проследени клинични параметри.

Изследването на локалния имуен отговор в BALF след третиране с Dp52-71 химерата показва значително намалени нива на човешките анти-Dpt IgE антитела, но не и на нивата на алерген-специфичните IgA, IgG и общите IgE антитела в сравнение с контролната химера. Открити бяха също и значително намалени нива на β -хексозаминидазата и концентрацията на общ протеин в BALF след третиране с Dp52-71 химерата, което предполага локално инхибиране на мастоцитната дегранулация и съдовата пропускливост (Фигура 20).



Фигура 20. Ефект на човешката Dp52-71 химерна молекула при хуманизирания модел на алергия към HDM и предложен механизъм на действие.

Dp52-71 химерата вероятно инхибира диференциацията на В клетките до плазмобласти, но изглежда, че някои съществуващи Dpt-специфични антияло-продуциращи плазмобласти не се повлияват поради липсата на BCR. В предишни изследвания е установено, че контролната химера няма потискащ ефект върху Dpt-специфичните клетки [174]. Важно е, че беше установена и намалена клетъчна инфилтрация при хистопатологичната оценка на белите дробове от животни, третирани с епитоп-специфичната химера. Изглежда, че насоченото потискане на Dpt-специфични В клетки нарушава и техните антиген-представящи функции, което води до редуциране на белодробното възпаление.

В настоящото проучване изследвахме протеин-инженерно CR1-специфично химерно моноклонално антитяло в хуманизиран Rag2- γ c- модел на HDM алергия за да изследваме възможен нов подход за специфична терапия. Активността на целевите Dp α 1-специфични В клетки може да бъде потисната или чрез блокиране на В-клетъчната диференциация към IgE-секретиращи плазмоцити или чрез ограничаване на патологичната комуникация между Т и В лимфоцитите. Използвайки тези химерни молекули в хуманизирана моделна система ние демонстрираме, че този подход е ефективен и има потенциала да бъде доразвит с цел да се намали производството на патологични IgE антитела и хистопатологичните промени в белите дробове.

2. Хроничен миши модел на алергия към домашен прах

Настоящото проучване имаше за цел да повлияе алерген-специфичните В клетки в хроничен миши модел на HDM алергия чрез протеин-инженерна химерна молекула, способна едновременно да свърже BCR и CD32, като възможен нов терапевтичен подход. Конструирани бяха химерни молекули, състоящи се от моноклонално 2.4G2 антитяло разпознаващо Fc γ RIIb, свързано с доказани епитоп-носещи пептиди (p52-71) или контролни пептиди. Новоконструираните химерни молекули запазват способността си да свързват Fc γ RIIb върху В клетките и се разпознават от алерген-специфични IgG1 антитела. Прилагането на Dp52-71 химерата води до понижени нива на HDM-специфичните IgG1 антитела в серума на мишки с хронично интраназално стимулиране с HDM екстракт. Въпреки това, намаляването на нивата на антителата беше частично, вероятно поради повлияването на ограничена епитоп-специфична В-клетъчна популация, докато репертоарът от антитела срещу различните алергени в HDM екстракта е много по-широк. Освен това бяха наблюдавани някои тенденции без статистическа значимост за намаляване на няколко параметъра, включително β -хексозаминидазата в BALF, SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофилите в белите дробове и достигайки най-високо ниво на достоверност при белодробния PAS score ($p=0,1025$). Dp52-71 химерата беше конструирана с цел повлияване на зрелите епитоп-специфични В клетки чрез едновременно омрежване на BCR и Fc γ RIIb и последващо задействане на фосфорилирането на ITIM домена на Fc γ RIIb. Това фосфорилиране би довело до свързване на съдържащата SH2-домен инозитол фосфатаза SHIP1, което инхибира активиращите сигнали чрез дефосфорилиране на цитоплазмения домен на BCR.

Въпреки това, SHIP- и ITIM-независимо сигнализиране чрез FcγRIIb в отсъствието на BCR сигнал е в състояние да индуцира апоптоза в зрели В клетки чрез активиране на проапоптогичните протеини BAD и BID. Освен това, резултатът от сигнализирането през FcγRIIb зависи и от етапа на развитие на В клетките. Докато едновременното омрежване на FcγRIIb и BCR инхибира пролиферацията на зрели В клетки и про-В клетки, изолираното свързване към FcγRIIb води до апоптоза при активирани В клетки, пре-В клетки и плазмоцити [157,193]. Въпреки, че Dp52-71 химерата би могла да свързва и нецелели клетки до известна степен, химерата би се свързвала преференциално към Dp52-71-специфичните В клетки поради увеличаване общ авидитет, еквивалентен на сумата от афинитетите на свързване на пептида към BCR и 2.4G2 антитялото към FcγRIIb.

Поредица от изследвания, част от които са представени и в настоящата дисертация (хуманизиран модел) проследяват *in vitro* и *in vivo* ефектите на химерни молекули насочени към същата Dp52-71-специфична В-клетъчна популация при пациенти с HDM алергия и инхибиторния рецептор CR1. Третирането с тези анти-човешки CR1 химерни молекули, съдържащи същите епитоп-носещи пептиди като мишата химера, намалява броя на анти-HDM IgE-секретиращите клетки и индуцира В-клетъчна апоптоза *in vitro* [174]. Прилагането на анти-човешка химерна молекула в хуманизиран Rag2- γс- модел на HDM алергия води до намаляване на HDM-специфичните IgE антитела както в серума, така и в BALF. Това третиране намалява също и нивата на общия протеин и β-хексозаминидазата в BALF, както и инфилтрацията на имунни клетки в белите дробове [176]. Въпреки че прилагането както на миши, така и на човешки химерни молекули води до намаляване на HDM-специфичните антитела, резултатите от третирането при цялостното алергично възпаление се различават, тъй като мишите химери не успяват да постигнат статистически значимо намаление на други параметри на заболяването. Причината за тази разлика може да се дължи на различни фактори, като спецификите на целевите рецептори, както и характеристиките на хуманизираните и мишите модели. Възможно е нивата на имунния отговор срещу имунодоминантния алерген Der p 1 и особено към пептида p52-71 да са различни при алергичното заболяване при хора и хроничния миши модел на HDM алергия. Освен това, наблюдаваните тенденции без статистическа значимост между групата с Dp52-71 химера и HDM групата съвпадат с параметрите, които показват силна положителна корелация с анти-HDM IgG1 антителата при HDM групата (β-хексозаминидаза в BALF, SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофили и PAS score на бели дробове). Изхождайки от тези резултати е изкушаващо

да се спекулира, че намаляването на нивата на HDM-специфичните IgG1 антитела може да бъде свързано с тенденциите, които бяха наблюдавани между групата с Dp52-71 химера и HDM групата, адресирайки липсата на статистическа значимост при тези параметри към малкият размер на ефекта, който генерираме чрез насочване към В клетки, специфични само към един алергенен епитоп.

Настоящото проучване изследва нова терапевтична стратегия за повлияване на алерген-специфични В клетки, използвайки химерни молекули. Разработен беше хроничен миши модел на алергия към HDM за да бъдат изследвани *in vivo* ефектите от предложената терапия. Този модел на HDM алергия беше характеризирани с повишени серумни нива на HDM-специфични IgG и IgG1 антитела. Въпреки това не бяха наблюдавани разлики в нивата на общите и HDM-специфичните IgE антитела между здрави и третирани с HDM мишки. Някои от проучванията, използвайки миши модели на алергия към HDM успяват да индуцират HDM-специфични IgE антитела, но това увеличение често е много слабо в сравнение с това при HDM-чувствителни алергични пациенти с астма [194]. Други автори използвайки миши модели на алергия към HDM се фокусират върху анализа на HDM-специфични IgG1 антитела и или не измерват нивата на анти-HDM IgE антителата или не успяват да открият повишени нива на алерген-специфични IgE антитела [134,194–197]. Освен това проучванията показват, че разликите в биохимичния състав на HDM екстрактите, като съдържанието на протеази са отговорни за общите и HDM-специфичните IgE антитела, но не и за анти-HDM IgG1 антителата [185,198]. В допълнение, експерименти включващи мишки дефицитни по FcεRIα или IgE предполагат, че нито FcεRIα, нито IgE допринасят за алергичното заболяване на дихателните пътища в кратък 14-дневен модел на алергия към HDM с високи или лимитиращи дози от алегените [199]. Липсата на IgE отговор в нашия хроничен миши модел на алергия към HDM може да бъде отдадена на биохимичния състав на партидата на използвания от нас HDM екстракт или други фактори, като например схемата на третиране. Въпреки това, наличието на Th2-зависим HDM-специфичен IgG1 отговор с повишено белодробно възпаление и секреция на мукус характеризира състояние на алергична астма.

Животинските модели на алергия към HDM са полезен инструмент за изследване на патогенезата на заболяването и потенциални терапевтични средства. Въпреки това, разликите между алергичните модели базирани на фактори като биохимичния състав на HDM екстрактите, както и протоколите за прилагане на алергените изискват последващи по-задълбочени анализи на моделите. В това проучване имаме за цел да

характеризираме детайлно нашия хроничен модел, изследвайки както хуморалният, така и клетъчният имунен отговор. Анализите показаха, че мишките стимулирани с HDM екстракт имат повишен брой еозинофили, неутрофили и лимфоцити в BAL, както и повишени проценти на SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофили, CD19 клетки, плазмобласти и активирани CD4 CD69+ CD25+ Т клетки в белите дробове. В HDM групата бяха открити също и повишени нива на общи протеини, β -хексозаминидазна активност и IL-5 в BALF, както и високи нива на HDM-специфични IgG1 и IgG антитела в BALF и серум. Мишият модел на алергия към HDM беше свързан с хистопатологични промени в белите дробове, като перибронхиално и периваскуларно възпаление и хиперплазия на гоблетни клетки. Корелационният анализ на имунологичните параметри в настоящия модел показва интересна връзка между серумните нива на HDM-специфичните IgG1 антитела и няколко ключови параметъра на алергичното възпаление. Открихме силна положителна корелация на HDM-специфичните IgG1 антитела с общия протеин и β -хексозаминидазна активност в BALF, SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофили в белите дробове, както и белодробния PAS *score*. Важно е, че серумните нива на анти-HDM IgG антителата не показаха корелация с тези параметри, което предполага, че антителата от подклас IgG1 играят различна роля в алергичното възпаление. Въпреки, че много автори описват повишени нива на HDM-специфични IgG1 антитела и ги използват като маркер за антиген-специфична В- и Т-клетъчна клонална експанзия, приносът на този подклас антитела към алергичното възпаление се нуждае от изясняване, особено по отношение на сенсibiliзацията към HDM алергени [194]. Въпреки това, експерименти изследващи ролята на алерген-специфичните IgG1 антитела в реакциите на свръхчувствителност към овалбумин хвърлят светлина върху възможните механизми. Мишки, пасивно сенсibiliзирани с овалбумин-специфични IgG1 антитела развиват положителна реактивност при кожен тест и повишена реакция на дихателните пътища придружена от повишени нива на еозинофили в BAL след провокация на дихателните пътища. Освен това, пасивната имунизация с овалбумин-специфични IgG2a или IgG3 антитела не е свързана с тези реакции [200]. Друго проучване установява, че при мишки смъртта и повечето от патологичните промени, свързани с активна или IgG1-зависима пасивна анафилаксия зависят от FcR гама веригата. Авторите също предполагат, че системната анафилаксия може да бъде значително медирана от Fc γ RIII и IgG1 [201]. Освен това, мишки дефицитни по Fc γ RIII имат нарушена IgG-медирана пасивна кожна анафилаксия и дегранулация на мастоцитите [202]. В допълнение, медираното от Fc γ R поглъщане на алерген-специфични IgG имунни комплекси от дендритни клетки може да

допринесе за възпалението на дихателните пътища. Авторите наблюдават, че *i.n.* прилагане на овалбумин-специфични IgG имунни комплекси води до усилване на производството на Th2 цитокини, антиген-специфична Т-клетъчна пролиферация, еозинофилия и възпаление на дихателните пътища [203,204]. Повишените серумни нива на HDM-специфични IgG1 антитела в нашия модел на алергия може да допринасят за положително корелиращите параметри общ протеин и β -хексозаминидазна активност в BALF, SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофили в бели дробове и белодробния PAS score, тъй като проучването фокусирано върху овалбумин-специфични IgG1 антитела предоставя доказателства за ролята на IgG1 при реакции на свръхчувствителност, включително реактивност при кожни тестове, реакция на дихателните пътища, еозинофилия, дегранулация на мастоцитите и анафилаксия. Въпреки, че е възможно Th2-асоциираните алерген-специфични IgG1 антитела да участват в развитието на няколко характеристики на алергията към HDM при мишките модели са необходими повече изследвания, тъй като корелационният анализ не е достатъчен за категорични изводи.

Изследването на експресията на нашата целева молекула CD32 (Fc γ RIIb) показва, че този рецептор е свръхекспресиран по повърхността на CD19 и CD19 IgE-позитивните В клетки в белите дробове на HDM-стимулирани мишки в сравнение със здрави животни. Тази свръхекспресия не беше повлияна от прилагането на Fc γ RIIb-специфичните Dp52-71 или *irrelevant* химери. Освен това, свръхекспресията на CD32 показва статистически значима отрицателна корелация с процентите на алвеоларните макрофаги и неутрофили в белите дробове, както и концентрацията на IL-13 в BALF. Доколкото ни е известно, това е първото проучване, което показва свръхекспресия на Fc γ RIIb върху В клетки при алергия към HDM. Изследванията разкриват, че имунизацията на майчиния организъм с овалбумин води до свръхекспресия на Fc γ RIIb в IgM+ В клетки в слезките на потомството по IL-10-зависим начин [205,206]. Изненадващо, подобна имунизация на мишки преди зачеване с алергени от *Dermatophagoides pteronyssinus* води до намалена експресия на Fc γ RIIb върху В клетките на потомството [207]. Въпреки това, тези данни не могат да бъдат директно сравнени с нашите резултати поради няколко фактора. Първо, нашето проучване демонстрира директния ефект на екстракта от HDM върху В-клетъчната експресия на Fc γ RIIb, а не на ефекта от имунизацията на майчиния организъм върху потомството. В допълнение, ние анализирахме локалните белодробни В клетки и прилагането на алергените беше интраназално, докато в гореспоменатото проучване са използвани В клетки от слезка и системен път на приложение на алергените. Ролята на Fc γ RIIb при алергичните заболявания е известна главно при

функциите на ефекторните клетки, като инхибирането на IgE-индуцираното активиране на мастоцити [208–210]. Въпреки това, експресията на FcγRIIb върху В клетки изглежда е критична за развитието на мукозен антиген-индуциран толеранс, който е нарушен при FcγRIIb^{-/-} мишки. Трансферът на В клетки, експресиращи FcγRIIb е достатъчен за да индуцира Foxp3⁺ регулаторни Т клетки и да потисне антиген-специфичните Т клетки. В допълнение, FcγRIIb-свърхекспресиращи В-клетки имат повишен капацитет да индуцират мукозен Т-клетъчен толеранс и регулаторни Т-клетки при мишки с В-клетъчен дефицит [211]. HDM-индуцираната свърхекспресия на FcγRIIb върху белодробните В клетки в хроничния миши модел и отрицателната корелация с процента неутрофили и концентрацията на IL-13 са интригуващи. Следователно са необходими допълнителни проучвания за да бъде изследвана ролята на FcγRIIb върху В клетките в контекста на алергичните заболявания и особено сенсibiliзацията с HDM.

Тук изследвахме възможен нов подход за специфична терапия на алергия към HDM използвайки протеин-инженерни молекули, които водят до намаляване на нивата на HDM-специфични антитела. Ограничение на това проучване е, че не можем да очакваме да потиснем целия спектър от алерген-специфични В клетки при HDM алергия използвайки само един Der p 1 епитоп, но въпреки това специфичното потискане на В лимфоцити, специфични за този епитоп предоставя възможност за бъдещи мулти-епитопни подходи. Селективното елиминиране на алерген-специфични В клетки от химерни молекули има обещаващ транслационен потенциал и може да бъде доразвито в нов подход за специфична терапия. Настоящото проучване предполага бъдещото използване на FcγRIIb свърхекспресията и разширяване на химерната технология включвайки повече епитопи с цел подобряване на алергичното възпаление.

VI. ИЗВОДИ

Хуманизиран миши модел на алергия към домашен прах

1. Установен беше хуманизиран модел на алергия към HDM чрез трансфер на РВМСs от алергични пациенти в имунодефицитни Rag2- γ c- мишки, при който се предизвиква алергичен имунен отговор в бял дроб.
2. Третирането на хуманизираните мишки с човешката CR1-специфична Dp52-71 химера намалява нивата на анти-HDM IgE, общия протеин и β -хексозаминидазата в BALF.
3. Човешката CR1-специфична Dp52-71 химера намалява броя на инфилтрираните човешки лимфоцити в белия дроб.
4. Човешката Dp52-71 химера потиска общото периваскуларно възпаление в белите дробове на хуманизираните мишки.

Хроничен миши модел на алергия към домашен прах

1. Конструирани от нас миши Fc γ RIIb-специфични Dp52-71 химерни молекули се свързват към Fc γ RIIb рецептора на миши В клетки и се разпознават от алерген-специфични IgG1 антитела.
2. Разработен беше хроничен модел на алергия към HDM при мишки, характеризиращ се с повишени нива на анти-HDM IgG1 антитела, повишен брой специфични за заболяването имунни клетки в белия дроб и развитие на характерни за алергията патологични симптоми.
3. Нивата на алерген-специфичните IgG1 антитела в модела на алергия при мишки показаха силна положителна корелация с общия протеин и β -хексозаминидазна активност в BALF, SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофили в белите дробове, както и белодробния PAS *score*.
4. Fc γ RIIb е свръхекспресиран по повърхността на CD19 и CD19 IgE-позитивните В клетки в белите дробове на HDM-стимулирани мишки.
5. Прилагането на Dp52-71 химерата понижава нивата на HDM-специфичните IgG1 антитела в серума.
6. Намаляването на β -хексозаминидазата в BALF, SiglecF^{high} CD11c^{low} еозинофилите в белите дробове и белодробния PAS *score* показва тенденция за повлияване на късния алергичен локален отговор след края на терапията.

VII. ПРИНОСИ

Приноси с фундаментално значение

- За първи път е показано, че FcγRIIb е свръхекспресиран по повърхността на В лимфоцитите, включително и на IgE-позитивните В клетки, изолирани от бял дроб на мишки, стимулирани с алергени от домашен прах.
- Установена е връзка между нивата на серумните анти-HDM IgG1 антитела с някои параметри на алергичното възпаление, която може да спомогне за изясняване ролята на IgG1 антителата в патогенезата на мишите модели на HDM алергия.

Приноси с научно-приложен характер

- Разработени са експериментални хуманизиран и хроничен миши модел на алергия към домашен прах, които могат да бъдат използвани при изследвания свързани с механизмите на заболяването, както и на нови терапевтични подходи.
- Използваната протеин-инженерна химерна технология, целяща селективното елиминиране на алерген-специфични В клетки, има потенциала да бъде използвана за разработването на нови подходи за специфична терапия.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. **Ralchev, N.R.**, Kerekov, N., Mihaylova, N., Kremlitzka, M., Hristova, D., Dzhorev, J., Erdei, A. and Tchobanov, A.I.. Targeted suppression of Dpt-specific B cells in humanized Rag2- γ c-mouse model of HDM allergy. 2022. Scandinavian Journal of Immunology, p.e13241. - **Journal Rank: JCR – Q2; Impact Factor –3.7 (2022)**
2. **Ralchev, N.**, Bradyanova, S., Kerekov, N., Tchobanov, A. and Mihaylova, N., 2024. Suppression of Pathological Allergen-Specific B Cells by Protein-Engineered Molecules in a Mouse Model of Chronic House Dust Mite Allergy. International Journal of Molecular Sciences, 25(24), p.13661. – **Journal Rank: JCR - Q1; Impact Factor – 4.9 (2023)**

Участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд:

1. Юбилейна конференция “15 години Българска асоциация по клинична имунология“, 6-7 ноември 2020 г., хотел Хилтън, гр. София; **Постер**
2. Шести Европейски Конгрес по Имунология, 1-4 септември 2021 г., virtualeci2021.com; **Доклад**
3. XVI Работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти“, 24-26 ноември 2021 г., София; **Доклад**
4. Трети интердисциплинарен докторантски форум, 6-7 юни, 2022 г., гр. Кюстендил; **Доклад**
5. Четвърти интердисциплинарен докторантски форум с международно участие, 16-19 Май 2023 г., гр. Сандански, България; **Доклад**
6. 18-ти Международен конгрес по имунология (IUIS 2023), 27 ноември - 2 декември 2023 г., Кейптаун, Южна Африка; **Постер**
7. Седми Европейски Конгрес по Имунология, 1-4 септември 2024 г., Дъблин, Ирландия; **Доклад**
8. Годишна конференция по Имунология, 13 декември 2024 г., хотел „Rosslyn Central park“, гр. София; **Доклад**
9. СТАРА RETREAT, 25-28 ноември 2024 г., София; **Доклад**

Информационни и комуникационни науки и технологии

Енергийни ресурси и енергийна ефективност

Нанонауки и нови материали и технологии

Биомедицина и качество на живот

Биоразнообразие и, биоресурси и екология

Климатични промени, рискове и природни ресурси

Астрономия, космически изследвания и технологии

Културно-историческо наследство и национална идентичност

Човек и общество

Никола Ралчев Ралчев, 2025