

Резюмета на статии на английски и български, участващи в справката за изпълнението на изискванията според ЗРАСРБ и тези на ИМикБ на доц. Андрей Чорбанов, дб.

1. Nikolova K., **Tchorbanov A.**, Djoumerska-Alexieva I., Nikolova M., Vassilev T. Intravenous immunoglobulin up-regulates the expression of the inhibitory FcγIIb receptor on B cells. **Immunol Cell Biol** 2009, 87, 529-533.

Intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations are known to modulate autoimmune/inflammatory diseases through several F(ab')₂- and Fc-dependent mechanisms. In this study, we show that the *in vitro* and the *in vivo* exposure of B lymphocytes from lupus-prone and from healthy mice to IVIg results in an increased expression of their surface inhibitory FcγIIb receptors. Further, this exposure enhanced the ability of a chimeric antibody, cross-linking FcγRIIb and immunoglobulin receptors on DNA-specific B lymphocytes, to suppress IgG anti-DNA antibody production. F(ab')₂ fragments of IVIg had a similar activity as the intact preparation, whereas Fc fragments had no effect. This study describes a novel approach with clinical relevance for modulating B lymphocyte activity.

Интравенозен имуноглобулин повишава експресията на инхибиторния рецептор FcγIIb, намиращ се върху В клетки.

Известно е, че различните форми на интравенозен имуноглобулин (IVIg) могат да модулират автоимунни/ възпалителни заболявания чрез няколко F(ab')₂- и Fc-зависими механизма. В този труд, ние показахме, че взаимодействие на В лимфоцити, от мишки с лупус и от здрави мишки, *in vitro* и *in vivo*, с IVIg води до повишаване на експресията на повърхностните инхибиторни FcγIIb рецептори. Също така, то увеличава способността на химерно анти тяло, свързващо кръстосано FcγIIb и имуноглобулиновите рецептори върху ДНК-специфичните В лимфоцити, да потиска производството на анти-ДНК ИгГ антитела. F(ab')₂ фрагментите от IVIg имат подобна активност, докато Fc фрагментите нямат такъв ефект. Нашето проучване описва иновативен поход с клинична значимост за модулиране на активността на В лимфоцитите.

2. Nikolova K., Mihaylova N., Voynova E., Kerekov N., Gesheva V., Prechl J., Nikolova M., **Tchorbanov A.** Re-establishing tolerance to DNA in humanized and murine models of SLE. **Autoimmun Rev** 2010, 9, 499–502.

DNA-specific B cells in SLE represent a logical target for therapeutic intervention. We hypothesize that it is possible to re-establish tolerance to native DNA in SCID mice with cells transferred from SLE patients or from lupus-prone MRL/lpr mice by administering chimeric molecules, containing a monoclonal antibody against inhibitory B cell receptors coupled to a peptide that antigenically mimics DNA. These protein-engineered molecules are able to co-crosslink selectively the antigen receptors of B cells possessing anti-native DNA specificity with the inhibitory surface receptors, thus delivering a strong suppressive signal.

Повторно изграждане на толеранс към ДНК при хуманизирани и миши модели на системен лупус еритематозус

Един от логичните подходи за терапия на системен лупус еритематозус (СЛЕ) е фокусиран върху ДНК- специфичните В клетки. Според нас е възможно да бъде възстановен толерансът към собствени молекули ДНК в SCID мишки, трансферирани с клетки от пациенти, диагностицирани със СЛЕ или с клетки от MRL/lpr мишки, предразположени към развитието на СЛЕ. Това би било постижимо чрез терапия с химерни молекули, които съдържат моноклонално антитяло срещу потискащ В-клетъчен рецептор, свързано с пептиди, имитиращи ДНК. Тези синтетични молекули омрежват В-клетъчни рецептори, притежаващи анти-ДНК специфичност с инхибиращи повърхностни рецептори. Именно тогава бихме генерирали силен потискащ сигнал.

3. Dimitrova I., Gesheva V., Nikolova K., Mihaylova N., Todorov T., Nikolova M. and **Tchorbanov A.** Target silencing of disease-associated B-lymphocytes by chimeric molecules in SCID model of pristane-induced autoimmunity. **Lupus** 2010, 19(11), 1261-1271.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the generation of autoantibodies against a diverse array of self-antigens. The B cells producing immunoglobulin G (IgG) antibodies to double-stranded DNA appear to play a main role in the disease progression. Their specific elimination is a reasonable mechanism for effective therapy of SLE. The presently used approaches for silencing autoreactive disease-associated B cells are nonspecific and more precise therapies are needed. We have previously constructed a chimeric protein molecule consisting of several DNA-mimotope peptides coupled to a rat monoclonal anti-mouse CD32 (FcγRIIb) antibody. The mineral oil pristane induces a lupus-like syndrome in non-autoimmune mice leading to the development of glomerulonephritis and lupus-associated autoantibodies. In the present paper, using a pristane-induced autoimmune model in SCID mice, we analyzed the ability of the chimeric antibody to suppress selectively the autoreactive B lymphocytes by cross-linking B-cell surface immunoglobulin receptors with the inhibitory IgG FcγRIIb receptors. Treatment with DNA-like chimeric molecules inhibited B- and T-cell proliferation, restricted the number of anti-DNA antibody-producing cells and suppressed the generation of IgG anti-DNA antibodies. In contrast, phosphate buffered saline (PBS)-injected control mice experienced an increase of disease-associated antibody levels and developed glomerulonephritis similar to pristane-treated donor Balb/c mice.

Целенасочено потискане на патологични В лимфоцити чрез химерни молекули в SCID модел на пристан-индуциран автоимунитет

Системен лупус еритематозус (СЛЕ) е автоимунно заболяване, характеризиращо се с генерирането на антитела срещу широк спектър от собствени антигени. В клетките, които продуцират имуноглобулини (IgG) срещу двойно-верижна ДНК имат основна роля в развитието на заболяването. Специфичното елиминиране на тези лимфоцити е удачна стратегия за ефективно третиране на СЛЕ. Настоящо използваните подходи за потискане на автореактивните патологични В клетки са неспецифични – имаме нужда

от по-прецизни терапии. Предходно, ние създадохме химерни протеинови молекули, състоящи се от множество ДНК-мимотопни пептиди, свързани за плъше анти-мише CD32 (FcγRIIb) моноклонално антитяло. Минералното масло пристан индуцира лупус-подобен синдром в здрави мишки – развиват гломерулонефрит и лупус-асоциирани автоантитела. В настоящата статия, използвайки пристан-индуциран автоимунен модел в SCID мишки, ние анализирахме възможността на химерните молекули да потиснат специфично автореактивните В лимфоцити, като свързахме едновременно В клетъчния имуноглобулинов рецептор с инхибиторния IgG FcγRIIb рецептор.

Третирането с ДНК-подобни химерни молекули инхибира В и Т клетъчната пролиферация, ограничи броя на анти-ДНК антитяло продуциращите клетки и потисна генерирането на IgG анти-ДНК антитела. Обратно, контролните животни инжектирани с фосфатен буфер (PBS) показаха покачване на нивата на патологични антитела и развиха гломерулонефрит, подобно на пристан-третираните донорни Balb/c мишки.

4. Nikolova K., Mihaylova N., Voynova E., **Tchorbanov A.**, Voll R., Vassilev T. Selective silencing of autoreactive B lymphocytes – following the Nature’s way. **Autoimmun Rev** 2010, 9, 775-779.

A novel approach for the selective silencing of targeted autoreactive B lymphocytes is reviewed that mimics the physiological mechanisms for suppressing B cell activity. It is based on the use of bi- or tri-specific chimeric antibodies that cross-link BCRs with a pre-selected antigen-binding specificity with one or more inhibitory types of receptors on the surface of the same disease-associated B lymphocyte. The effect of these engineered antibodies was proved to be specific as they only suppressed the production of the targeted pathological antibodies while sparing those with other specificities. The administration of the chimeric molecules to lupus-prone MRL/lpr mice resulted in decreased levels of disease-associated IgG autoantibodies and of proteinuria, in the prevention of cutaneous lesions, in decreased sizes of the lymphoid organs and in prolonged survival. These results prove that it is indeed possible to selectively silence unwanted B lymphocytes as well as to significantly delay the natural course of a spontaneous antibody-mediated autoimmune disease.

Селективно потискане на автореактивни В лимфоцити - по стъпките на природата

В настоящето изследване е разгледан иновативен подход за селективно потискане на автореактивни В лимфоцити, който имитира физиологичните механизми, потискащи активността на В клетките. Подходът се основава на дву- и три- специфични химерни антитела, с висок афинитет към определен антиген. Тези антитела свързват кръстосано В-клетъчни рецептори с един или повече типове потискащи рецептори върху една В-клетка, асоциирана с дадено заболяване. Специфичността на тези антитела бе доказана посредством способността им да потискат единствено производството на патологични антитела. MRL/lpr мишки, предразположени към системен лупус еритематозус, бяха третирани с химерните антитела. Именно тези мишки не развиха кожни лезии. Спрямо контролните мишки, третираните имаха по-малки лимфоидни органи, повишена продължителност на живот, понижени нива на патологични ИгГ

автоантитела и протеинурия. Тези резултати показват, че е възможно селективното потискане на нежелани В клетки, както и да се забави развитието на антитяло-медийрано аутоиммунно заболяване.

5. Papp K., Végh P., **Tchorbanov A.**, Vassilev T., Erdei A., Prechl J. Progression of the SLE-like disease drives the appearance of complement activating IgG antibodies in MRL/lpr mice. **Rheumatology** 2010, 49(12), 2273-2280.

Objectives. Nucleic acids are known to induce complement activation, which results in the masking and removal of apoptotic cells exposing nuclear components. Dysregulation of these events is characteristic of SLE, a systemic autoimmune disease characterized by the appearance of ANAs. In this study, we aimed to investigate the relationship between development of ANAs and their effect on complement activation by nucleic acids.

Methods. We used protein array technology to characterize complement activation by murine mAbs and polyclonal antibodies against various forms of nucleic acid. Serum samples from MRL/lpr mice were collected, starting before the onset of the disease till 6 months of age. Binding of IgG and its subclasses to dsDNA, ssDNA, RNA, plasmid DNA and nucleosome complexes was determined, along with C3 fixation.

Results. We show that complement C3 binding to various forms of nucleic acid that serve as targets in lupus is absent in normal serum. The addition of dsDNA-specific mAbs to normal serum results in the deposition of complement C3 to nucleic acids. In MRL/lpr mice, IgG antibodies against various nuclear antigens appear with ageing and disease progression. C3 binding to the antigens is somewhat delayed and suggests that accumulation or maturation of pathogenic antibodies is required for inducing C3 binding to ICs containing nucleic acids.

Conclusions. C3 deposition on nuclear antigens, therefore, reflects the state of disease progression in this murine model of SLE.

Прогресия на лупус-подобно заболяване води до поява на комплемент-активирани IgG антитела при MRL/lpr мишки.

Цели. Известно е, че нуклеиновите киселини индуцират активация на комплемента, което води до маскиране и премахване на апоптични клетки с открити ядрени компоненти. Нарушената регулация на тези процеси е типична черта при СЛЕ, системно аутоимунно заболяване, което се характеризира с появата на ANA. В настоящата разработка имахме за цел да изследваме връзката между развитието на ANA и техния ефект върху активацията на комплемента от нуклеинови киселини.

Методи. Използвахме технология за протеинови масиви, за да характеризираме активацията на комплемента от миши моноклонални антитела и поликлонални антитела срещу различни форми на нуклеинови киселини. Серуми от MRL/lpr мишки бяха събирани преди началото на заболяването до 6-месечна възраст. Свързването на IgG и

неговите субкласове към двДНК, евДНК, РНК, плазмидна ДНК и нуклеозомни комплекси беше установено, съпътствано с С3 фиксиране.

Резултати. Показваме, че свързването на комплемента С3 към различните форми на нуклеинови киселини, които служат като мишени при лупус, липсва при серум от здрави контроли. Добавянето на анти-двДНК-специфични моноклонални антитела към нормалния серум води до свързване на С3 компонента на комплемента към нуклеиновите киселини. При MRL/lpr мишките с напредване на възрастта и прогресия на заболяването се появяват IgG антитела срещу разнообразни ядрени антигени. Свързването на С3 към антигените е някак забавено и предполага, че е необходимо натрупване или съзряване на патогенни антитела, за да се индуцира свързване на С3 към имунни комплекси, съдържащи нуклеинови киселини.

Заклучение. Следователно, отлагането на С3 върху ядрени антигени отразява прогресията на заболяването при миши модел на СЛЕ.

6. Gesheva V., Idakieva K., Kerekov N., Nikolova K., Mihaylova N., Doumanova L., **Tchorbanov A.** Marine gastropod hemocyanins as adjuvants of non-conjugated bacterial and viral proteins. **Fish and Shellfish Immunol** 2011, 30 (1), 135-142. **Q1 25 т.**

Killed viral vaccines and bacterial toxoids are weakly immunogenic. Numerous compounds are under evaluation as immunological adjuvants and peptide-carriers to improve the immune response. The hemocyanins, giant extracellular copper proteins in the blood of many mollusks, are widely used as immune stimulants. In the present study we investigated the adjuvant properties of hemocyanins isolated from marine gastropods *Rapana thomasiana* and *Megathura crenulata*. An immunization with Influenza vaccine or tetanus toxoid combined with *Rapana thomasiana* hemocyanin (RtH) and Keyhole limpet hemocyanin (KLH) in mice induced an anti-influenza cytotoxic response lasting at least 5 months and an antibody response to viral proteins. The IgG antibody response to the tetanus toxoid (TT) combined with RtH or KLH was comparable to the response of the toxoid in complete Freund's adjuvant. The results obtained demonstrate that the both hemocyanins are acceptable as potential bio-adjuvants for subunit vaccines.

Хемоцианини от морски коремоноги като адюванти на неконюгирани бактериални и вирусни протеини

Ваксините от инактивирани (убити) вируси и бактериалните токсоиди са слабо имуногенни. Безброй съединения са в процес на оценка като потенциални имунологични адюванти и пептиди-носители, които да подобрят имунния отговор. Хемоцианините, големи извънклетъчни мед-съдържащи протеини в кръвта на множество мекотели, са широко използвани като имуно стимуланти. В настоящата разработка ние изследвахме адювантите свойства на хемоцианини, изолирани от морски коремоноги *Rapana thomasiana* и *Megathura crenulata*. Имунизация на мишки с грипна ваксина или тетанусов

токсоид в комбинация с хемоцианини от *Rapana thomasiana* (RtH) и хемоцианин Keyhole limpet (KLH) индуцира анти-инфлуенца цитотоксичен отговор за поне 5 месеца, както и хуморален отговор към вирусните протеини. Отговорът с IgG антитела към тетанусовия токсид (ТТ), комбиниран с RtH или KLH беше съпоставим с отговор към токсоида в пълен адювант на Фройнд. Получените резултати показват, че и двата хемоцианина са подходящи като потенциални био-адюванти за субединични ваксини.

7. Kaloyanova S., Ivanova I., **Tchorbanov A.**, Dimitrova P., Deligeorgiev T. Synthesis of chloro-substituted analogs of Thiazole Orange - fluorophores for flow cytometric analyses. **J Photochem Photobiol B: Biology** 2011, 103, 215–221.

Synthesis, absorption and fluorescence properties of a series of asymmetrical monomethine cyanine dyes, chloro-containing analogs of Thiazole orange, are reported. Their staining ability was studied by flow cytometry. The saturating concentrations of each dye that gives a stable staining intensity have been determined. The ability of dyes B9, B11, B13 to stain live macrophages and apoptotic splenocytes was investigated. Positive signal in nucleus of adherent macrophages detected by fluorescent microscopy showed good specificity of B9, B11 and B13 dyes for DNA. In apoptotic assay cells positive for Annexin V were stained more brightly with the dyes B9, B11 and B13 than with propidium iodide. Despite that B13 showed high DNA selectivity it induces apoptosis of splenocytes and it is not suitable for detection of dead cells. The other synthesized chloro-containing analogs of Thiazole orange B9 and B11 can be successfully used for flow cytometric analyses of DNA content in live cells and for analyses of cell apoptosis.

Синтез на хлорсъдържащи аналози на Thiazole Orange-Флуорофори за анализ с проточна цитометрия

В настоящия труд са докладвани синтезните, абсорбционни и флуоресцентни качества на поредица асиметрични монометинови цианинови багрила, хлорсъдържащи аналози на Thiazole Orange. Оцветяващата им способност бе определена чрез проточна цитометрия. Така беше установена концентрацията нужна за постигане на стабилна интензивност на оцветяване. Проучена беше способността на багрилата B9, B11 и B13 да оцветят живи макрофаги и апоптиращи спленоцити. Чрез флуоресцентна микроскопия беше открит положителен сигнал в ядрата на адхерентни макрофаги, който показва специфичността на B9, B11 и B13 към ДНК. При анализ на апоптоза, клетки съдържащи Анексин А5 се оцветиха по-ярко с багрилата B9, B11 и B13, отколкото с пропидиев йодид. Независимо, че B13 показва висока селективност към ДНК, багрилото индуцира апоптоза на спленоцитите и следователно не е подходящо за разграничаване на мъртви клетки. Другите две синтезирани хлорсъдържащи багрила, аналози на Thiazole Orange, B9 и B11 могат успешно да бъдат използвани за анализ на съдържанието на ДНК в живи клетки, както и за анализ на клетъчна апоптоза.

8. Kerekov N., Mihaylova N., Prechl J., **Tchorbanov A.** Humanized SCID Mice Models of SLE. **Curr Pharmaceutical Design** 2011, 17 (13), 1261-1266.

The pathological DNA-specific B cells in Systemic lupus erythematosus are a logical target for a selected therapeutic intervention. It has been recently shown that complement receptor type 1 on human B and T-lymphocytes has suppressive activity. The cocrosslinking of this receptor with the B-cell receptor (BCR) inhibits B cell activation and proliferation and it could be an attractive new target for negative signal delivery. Experimental therapy in humans is limited by many restrictions. Severe combined immunodeficiency (SCID) mice, which lack both T and B lymphocytes and accept xenogenic cells have been used for human cell transfer for evaluating the pathogenesis of human SLE. We hypothesize that it may be possible to re-establish tolerance to native DNA in humanized SCID mice with cells transferred from SLE patients by administering to them a chimeric molecule, containing a monoclonal antibody against human inhibitory complement receptor type 1 coupled to a decapeptide DWEYSVWLSN that mimics DNA antigenically. These protein-engineered molecules are able to cocrosslink selectively the antigen receptors of B-cells possessing anti-native DNA specificity with the inhibitory surface receptors, thus delivering a strong suppressive signal.

Хуманизирани SCID миши модели на системен лупус еритематозус

Генерираните патологични ДНК-специфични В клетки са логична мишена за селективни терапии за системен лупус еритематозус (СЛЕ). Наскоро бе показано, че рецептор за комплемент тип 1, намиращ се върху човешки В- и Т- лимфоцити има потискаща активност. Кръстосано свързване на този рецептор с В-клетъчен рецептор блокира активирането на В клетките и тяхната пролиферация и може да бъде подходящо при подаване на инхибиращ сигнал. С цел оценяването на патогенезата на СЛЕ и поради факта, че експериментирането върху хора е силно ограничено, човешки клетки бяха трансферирани в SCID мишки, които нямат Т- и В-лимфоцити и могат да приемат ксеногенни клетки. Според нас е възможно да се възстанови толерансът към ДНК в хуманизирани SCID мишки, притежаващи трансферирани клетки от пациенти със СЛЕ чрез подлагане на мишките на терапия с химерна молекула, съставена от моноклонално анти тяло срещу човешки инхибиращ рецептор за комплемент тип 1, свързан с декапептида DWEYSVWLSN, който имитира антигенен участък от ДНК. Тези синтетични молекули могат избирателно и кръстосано да свързват В-клетъчни антигенни рецептори, притежаващи анти-ДНК специфичност, с инхибиращите повърхностни рецептори и по този начин да предизвикат потискане.

9. Kerekov N., Mihaylova N., Grozdev I., Todorov T., Nikolova M., Baleva M., Nikolova M., Prechl J., Erdei A., **Tchorbanov A.** Elimination of autoreactive B cells in humanized SCID mouse model of SLE. *Eur J Immunol* 2011, DOI 10.1002/eji.201141439.

Although the exact etiology of systemic lupus erythematosus (SLE) remains elusive, B-cell hyperactivity and production of autoantibodies directed to components of the cell nucleus is a well established pathogenetic mechanism of the disease. Therefore, the targeted inhibition of DNA-specific B cells is a logical therapeutic approach. The complement receptor type 1 (CR1,

CD35) has been shown to suppress human B-cell activation and proliferation after co-crosslinking with the BCR, and may serve as a mediator for negative signal delivery.

In order to evaluate this therapeutic approach in a human-like system, we used immune-restricted SCID mice transferred with PBMCs from SLE patients. The tolerance of these humanized SCID mice to native DNA was re-established after administration of a chimeric molecule consisting of a CR1-specific monoclonal antibody coupled to the decapeptide DWEYSVWLSN that mimics dsDNA. The generated protein-engineered chimera was able to co-crosslink selectively native DNA-specific BCR with the B-cell inhibitory receptor CR1, thus delivering a strong inhibitory signal.

Отстраняване на автореактивни В клетки в хуманизирам SCID миши модел на СЛЕ

Въпреки че точната етиология на системния лупус еритематозус (СЛЕ) остава неизяснена, установен патогенетичен механизъм на заболяването се изразява в хиперактивност на В клетките и продукцията на автоантитела, насочени към компоненти на клетъчното ядро. Следователно, насоченото инхибиране на ДНК-специфични В клетки е логичен терапевтичен подход. Доказано е, че комплемент рецептор тип 1 (CR1, CD35) потиска клетъчната активация и пролиферация на човешки В клетки след кръстосано свързване с BCR и може да служи като посредник за предаване на отрицателен сигнал. За да оценим този терапевтичен подход в подобна на човешката система, ние използвахме имунодефицитни SCID мишки, в които бяха прехвърлени РВМС от пациенти със СЛЕ. Толерантността на тези хуманизирани SCID мишки към нативната ДНК беше възстановена след прилагане на химерна молекула, състояща се от CR1-специфично mAb, свързано с декапептид DWEYSVWLSN, който имитира двДНК. Създадената протеинова инженерна химера беше в състояние да свързва селективно нативен ДНК-специфичен BCR съвместно с инхибиращия В клетъчен рецептор CR1, като по този начин предава силен инхибиращ сигнал.

10. Nikolova, K., Kaloyanova, S., Mihaylova, N., Stoitsova, S., Chausheva, S., Vasilev, A., Lesev, N., Dimitrova, P., Deligeorgiev, T., **Tchorbanov, A.** New fluorogenic dyes for analysis of cellular processes by flow cytometry and confocal microscopy. **J Photochem Photobiol B: Biology** 2013, 129: 125-134. DOI 10.1016/j.photobiol.2013.10.010.

Fluorescent microscopy and fluorescent imaging by flow cytometry are two of the fastest growing areas in the medical and biological research. Innovations in fluorescent chemistry and synthesis of new dye probes are closely related to the development of service equipment such as light sources, and detection techniques. Among compounds known as fluorescent labels, the cyanine-based dyes have become widely used since they have high excitation coefficients, narrow emission bands and high fluorescence upon binding to nucleic acids. The key methods for evaluation of apoptosis and cell cycle allow measuring DNA content by several flow cytometric techniques. We have synthesized new monomethine cyanine dyes and have characterized their applicability for staining of live and/or apoptotic cells. Imaging experiments

by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM) have been also performed. Two of the dyes have shown high-affinity binding to the nuclei at high dilutions, up to 10⁹ M. Flow cytometry and CLSM have confirmed that these dyes labeled selectively non-living, e.g. ethanol-fixed cells that makes them appropriate for estimations of cell viability and apoptosis. The novel structures proved to be appropriate also for analysis of the cell cycle.

Нови флуоресцентни багрила за анализ на клетъчни процеси чрез проточна цитометрия и конфокална микроскопия.

Флуоресцентната микроскопия и флуоресцентната визуализация чрез проточна цитометрия са две от най-бързо развиващите се области в сферата на медицинските и биологичните изследвания. Развитието на флуоресцентната химия и синтезирането на нови багрила са тясно свързани с подобряване на източниците на светлина и методите за детекция. Често използвани флуоресцентни маркери са цианиновите багрила, тъй като те имат висок коефициент на възбуждане, тесен диапазон на излъчване и висока флуоресцентност при свързване с нуклеинови киселини. Ключовите методи за проследяване на апоптоза и клетъчния цикъл позволяват измерването на съдържанието на ДНК, използвайки проточна цитометрия. Синтезирахме нови монометинови цианинови багрила и охарактеризирахме тяхната приложимост при оцветяване на живи и/или апоптиращи клетки. Проведохме експерименти с проточна цитометрия и конфокална лазерна сканираща микроскопия (КЛСМ) с цел визуализация на светлинния сигнал. Две от багрилата показаха висок афинитет към клетъчни ядра при разреждания до 10⁹М. Чрез проточна цитометрия и КЛСМ потвърдихме, че багрилата са способни да маркират специфично клетки, фиксирани с етилов алкохол, тоест са приложими и при оценяване на клетъчна жизнестойност/апоптоза. Използването на синтезираните молекули е уместно и при анализ на клетъчен цикъл.

11. Kerekov N., Ivanova I., Mihaylova N., Nikolova M., Prechl J., Tchorbanov A. Built-in adjuvanticity of Genetically and Protein Engineered Chimeric Molecules for Targeting of Influenza A peptide epitopes. **Immunol Research** 2014, 60(1), 23-34; DOI 10.1007/s12026-014-8489-0.

Highly purified, subunit, or synthetic viral antigens are known to be weakly immunogenic and potentiate only the antibody, rather than cell-mediated immune responses. An alternative approach for inducing protective immunity with small viral peptides would be the direct targeting of viral epitopes to the immunocompetent cells by DNA vaccines encoding antibody fragments specific to activating cell surface co-receptor molecules. Here, we are exploring as a new genetic vaccine, a DNA chimeric molecule encoding a T and B cell epitope-containing influenza A virus hemagglutinin peptide joined to sequences encoding a single-chain variable fragment antibody fragment specific for the costimulatory B cell complement receptors 1 and 2. This recombinant DNA molecule was inserted into eukaryotic expression vector and used as a naked DNA vaccine in WT and CR1/2 KO mice. The intramuscular administration of the DNA construct resulted in the in vivo expression of an immunogenic chimeric protein, which cross-links cell surface receptors on influenza-specific B cells. The DNA vaccination was

followed by prime-boosting with the protein-engineered replica of the DNA construct, thus delivering an activation intracellular signal. Immunization with an expression vector containing the described construct and boosting with the protein chimera induced a strong anti-influenza cytotoxic response, modulation of cytokine profile, and a weak antibody response in Balb/c mice. The same immunization scheme did not result in generation of influenza-specific response in mice lacking the target receptor, underlining the molecular adjuvant effect of receptor targeting.

Вградена адювантност при генно- и протеин-инженерни химерни молекули с цел насочване на епитопи от пептид на вирус инфлуенца А

Силно пречистените или синтетични вирусни антигени са слабо имуногенни и активират само антитяловия, вместо цялостния клетъчен имунен отговор. Алтернативен подход за индуциране на защитна имунна реакция с помощта на малки вирусни пептиди би било директното насочване на вирусни епитопи към имунокомпетентни клетки. Това може да се постигне чрез ДНК ваксина, кодираща фрагменти от антитяло, специфични за активиращите повърхностни корецепторни клетъчни молекули. Тук, ние разработихме нова генетична ваксина представляваща ДНК химерна молекула, която кодира хемаглютанин от инфлуенца А вирус, съдържащ Т- и В-клетъчен епитоп. Също така е свързана с последователност, кодираща едноверижни вариабилни фрагменти (scFv) от антитяло, специфично за ко-стимулиращ В-клетъчен рецептор 1 и 2 на комплемента. Тази рекомбинатна ДНК молекула беше добавена към еукариотен вектор за експресия и в следствие беше използвана като ДНК ваксина в WT и CR1/2 KO мишки.

Инжектирането в мускула на ДНК конструкта доведе до *in vivo* синтез на имуногенния химерен протеин, който кръстосано свързва повърхностни клетъчни рецептори, намиращи се върху инфлуенца-специфични В клетки. Ваксинирането с ДНК беше последвано от стимулиране с белтъчна молекула, имитираща ДНК конструкта, което доведе до вътреклетъчно активиране. Имунизацията с вектор, съдържащ гореспоменатия конструкт, и последвалото стимулиране с химера, предизвика анти-инфлуенца цитотоксичен отговор, модулиране на цитокинетичния профил, както и слаб отговор от антитела в Balb/c мишки. Същата имунизационна схема не доведе до генерирането на инфлуенца-специфичен отговор в мишки, непритежаващи целевия рецептор. По този начин бе подчертан ефектът на молекулния адювант при използването му за насочено свързване с рецептори.

12. Gesheva V., Chausheva S., Mihaylova N., Manoylov I., Doumanova L., Idakieva K., Tchorbanov A. Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma. **BMC Immunology** 2014, 15:34, DOI: 10.1186/s12865-014-0034-3

Background: Various immunotherapeutic approaches have been used for the treatment of cancer. A number of natural compounds are designed to repair, stimulate, or enhance the immune system response. Among them are the hemocyanins (Hcs) - extracellular copper proteins isolated from different arthropod and mollusc species. Hcs are oxygen transporter molecules and normally are freely dissolved in the hemolymph of these animals. Hemocyanins are very promising class of anti-cancer therapeutics due to their immunogenic properties and

the absence of toxicity or side effects. KLH (*Megathura crenulata* hemocyanin) is the most studied molecule of this group setting a standard for natural carrier protein for small molecules and has been used in anti-tumor clinical trials.

Results: The Hcs isolated from marine snail *Rapana thomasiana* (RtH) and the terrestrial snail *Helix pomatia* (HpH) express strong *in vivo* anti-cancer and anti-proliferative effects in the developed by us murine model of colon carcinoma. The immunization with RtH and HpH prolonged the survival of treated animals, improve humoral anti-cancer response and moderate the manifestation of C-26 carcinoma symptoms as tumor growth, splenomegaly and lung metastasis appearance.

Conclusion: Hemocyanins are used so far for therapy of superficial bladder cancer and murine melanoma models. Our findings demonstrate a potential anti-cancer effect of hemocyanins on a murine model of colon carcinoma suggesting their use for immunotherapy of different types of cancer.

Keywords: C-26 carcinoma, Murine cancer model, *Rapana thomasiana*, *Helix pomatia*, Hemocyanins, Anti-cancer activity

Антитуморни свойства на хемоцианини, изолирани от коремоноги, в миши модел на карцином на дебелото черво.

Въведение: За лечението на ракови заболявания се използват различни имунотерапевтични подходи. Редица природни вещества са предназначени да направляват, стимулират или повишават имунния отговор. Сред тях са хемоцианините (Hcs) - извънклетчни медсъдържащи белтъци, изолирани от различни видове членестоноги и мекотели. Хемоцианините са респираторни молекули, които пренасят кислород и хранителни вещества в хемолимфата на тези животни. Те са обещаваща група от анти-ракови терапевтични вещества, което се дължи на тяхната способност да стимулират имунната система, без токсични странични ефекти. KLH (хемоцианин изолиран от *Megathura crenulata*) е най-изследваната молекула от тази група, определяща стандарт за естествен белтък-преносите на малки молекули и е използвана в анти-туморни клинични изследвания.

Резултати: Хемоцианините, изолирани от *Rapana thomasiana* (RtH) и от *Helix pomatia* (HpH), проявяват *in vivo* анти-туморни и анти-пролиферативни свойства в разработения от нас миши модел на рак на дебелото черво. Имунизиранието с RtH и HpH удължава живота на третираните животни, повишава хуморалния антитуморен отговор и потиска развитието на симптоми на карцином C-26, като образуване на тумори, спленомегалия и метастази в белите дробове.

Заклучение: Хемоцианините се използват при терапии на рак на пикочния мехур и миши модел на меланом. Нашите изследвания демонстрираха потенциалния анти-туморен ефект на хемоцианините в миши модел на рак на дебелото черво, което предполага използването им при терапия на различни видове рак.

Ключови думи: карцином C-26, миши модел на рак, *Rapana thomasiana*, *Helix pomatia*, хемоцианини, анти-туморна активност

13. Gesheva V., Chausheva S., Stefanova N., Mihaylova N., Doumanova L., Idakieva K., Tchorbanov A. *Helix pomatia* hemocyanin - a novel bio-adjuvant for viral and bacterial antigens. *Int Immunopharmacol* 2015, 26(1):162-168. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.03.01;

Background: New generated subunit vaccines are characterized by increased safety and lack of side effects, however they suffer from weak immunogenicity. The adjuvants are substances that have the ability to enhance the magnitude and duration of the immune response and to increase vaccine efficacy, but the different vaccines may require diverse adjuvants. The urgent need of novel adjuvant formulations occurs, thus ensuring protective cellular and humoral responses against infectious pathogens. The hemocyanins, oxygen binding copper proteins in the hemolymph of molluscs and arthropods, are widely used as peptide carriers and vaccine adjuvants.

Results: In the present study we promote the hemocyanin isolated from the terrestrial gastropod *Helix pomatia* (HPH) as bio-adjuvant, combined with standard antigens. The purified HPH combined with influenza virus hemagglutinin intersubunit peptide (IP) or with tetanus toxoid (TT) were used for immunization. Administration of tetanus toxoid combined with HPH in mice resulted in an increased number of anti-TT IgG producing plasmocytes and induced a significant increase of B and T cell proliferation. The level of the anti-TT IgG antibodies in mice sera was comparable to the group administered with TT+ Al(OH)₃. An immunization of experimental animals with IP combined with *H. pomatia* hemocyanin led to generation of strong anti-influenza cytotoxic response.

Conclusion: The vaccination of mice demonstrates that the HPH is acceptable as a potential bio-adjuvant for subunit vaccines and it could be used as a natural adjuvant or protein carrier.

Хемоцианин от *Helix pomatia* - иновативен биоадювант за вирусни и бактериални антигени

Обща информация: Характерно за новите ваксини са високата сигурност и липсата на странични ефекти, въпреки че техен недостатък е слабата им имуногенност. Адювантите са вещества, които имат способността да повишат силата и продължителността на имунния отговор, както и да увеличат ефективността на ваксината. Нужно е да отбележим, обаче, че различните ваксини използват различни адювантни молекули. Нужни са иновативни адюванти, за да бъдат осигурени защитен клетъчен и хуморален отговор срещу инфекциозни патогени. Хемоцианините представляват мед-съдържащи белтъци, изолирани от различни видове членестоноги и мекотели. Те свързват кислорода в хемолимфата на тези животни и намират широко приложение като преносители на различни пептиди, и като адюванти във ваксини.

Резултат: В настоящето изследване използвахме хемоцианин изолиран от сухоземния охлюв *Helix pomatia* (HPH) като биоадювант, комбиниран със стандартни антигени. За имунизация беше използван пречистен HPH, комбиниран с IP пептид от хемаглутинин на инфлуенца вирус или комбиниран с тетаничен токсид (TT). Приемът на тетаничния токсид, комбиниран с HPH, доведе до увеличаване на броя на анти-TT IgG продуциращи плазмоцити, както и до значимо повишаване на В- и Т-клетъчната пролиферация. Нивото на анти-TT IgG антитела в миши серуми бе сравнимо с това,

установено в група, третирана с ТТ+Al(OH)₃. Имунизацията на животни с IP комбиниран с НРН доведе до силен анти-инфлуенца цитотоксичен отговор.

Заклучение: Ваксинирането на мишки демонстрира, че НРН е потенциален биоадювант за ваксини и може да бъде използван като естествен адювант или за пренос на пептиди.

14. Kurutos, A., Balabanov, I., Kamounah, F.S., Nikolova-Ganeva, K., Borisova, D., Gadjev, N., Deligeorgiev, T., Tchorbanov, A. Bright green-emitting ds-DNA labeling employed by dicationic monomethine cyanine dyes: Apoptosis assay and fluorescent bio-imaging. **Dyes and Pigments** 2018, 157, 267-277.

Fluorescent based techniques are among the state-of-the-art detection methods utilized for both qualitative and quantitative investigations in biochemical and biomedical sciences. The essential methods for evaluation of apoptosis and cell cycle by measuring DNA content using flow cytometry and imaging experiments, such as fluorescent microscopy are extensively being used for staining of live and/or apoptotic cells. Among a wide diversity of commercially available fluorescent dyes, cyanine-based non-covalent labeling has been employed for several years as fluorescent probes mainly due to their capabilities for biological applications upon binding to nucleic acids. Three novel asymmetric dicationic monomethine cyanine dyes derived from 2-thiomethylbenothiazolium and 4-methylquinolinium salts were synthesized and have been tested for potential applicability in biological research as fluorescent labels for nucleic acids detection. The newly obtained cyanine probes became highly fluorescent upon addition of ds-DNA according to a well-known mechanism of this class of organic compounds. Employing flow cytometry and fluorescent microscopy, the dyes were evaluated in live-dead cells discrimination.

Moreover, FACS studies on 3T3 mouse embryonic fibroblast cells verified their inability to penetrate through intact plasma membrane. Further in-depth studies on the dyes, outline their capability for estimations of cell viability and staining late apoptotic/necrotic cells. Imaging experiments by means of fluorescent microscopy, delineate the dyes' high specificity towards ds-DNA and allowed nuclear morphology imaging of non-living ethanol-fixed cells.

Маркиране на двойноверижна ДНК в зеления спектър чрез дикатионни мониметинови цианинови багрила: Анализ на апоптоза и флуоресцентна микроскопия

Флуоресцентните техники са сред най-съвременните методи за детекция както за качествени така и за количествени изследвания в биохимичните и биомедицинските науки. Основните методи за оценка на апоптоза и клетъчен цикъл, използвайки флуоресцентен анализ и фотомикрографско изследване, като флуоресцентна микроскопия, са широко използвани за оцветяване на живи и/или апоптозни клетки. Сред наличните в търговската мрежа флуоресцентни багрила, цианин-базирано нековалентно белязване се прилага от няколко години, главно поради биологичните му свойства да се свързва с нуклеинови киселини.

Три нови асиметрични дикаатионни монометинови цианинови багрила, получени от 2-тиметилбензотаизолава и 4-метилохинолинова соли бяха тествани за потенциалното им приложение в биоизследванията като флуоресцентни маркери за свързване с нуклеинови киселини. Новосинтезираните цианинови проби бяха силно флуоресцентни при наличието на двойноверижна ДНК, според добре познатия механизъм на този клас съединения. Багрилата бяха оценени чрез проточна цитометрия и флуоресцентна микроскопия при определянето на живи и мъртви клетки. Нещо повече, FACS анализите на 3Т3 миши ембрионални фибробластни клетки доказаха, че багрилата не проникват през здрава цитоплазмена мембрана. По-нататъшни задълбочени проучвания показаха тяхната способност за охарактеризиране жизнеността на клетките и за оцветяване на късна апоптоза/некроза.

Визуализацията чрез флуоресцентна микроскопия показва специфичността им срещу двойноверижна ДНК и позволява морфологичната характеристика на ядрата на мъртви клетки, фиксирани с етанол.

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

Antiviral DNA vaccines are a novel strategy in the vaccine development field, which basically consists of the administration of expression vectors coding viral antigen sequences into the host's cells. Targeting of conserved viral epitopes by antibody fragments specific to activating cell surface co-receptor molecules on antigen-presenting cells could be an alternative approach for inducing protective immunity. It has been shown that FcγRI on human monocytes enhances antigen presentation in vivo. Various DNA constructs, encoding a Single-chain variable antibodies (scFv) from mouse anti-human FcγRI monoclonal antibody, coupled to a sequence encoding a T- and B-cell epitope-containing influenza A virus hemagglutinin intersubunit, peptide were inserted into the eukaryotic expression vector system pTriEx-3 Neo. The constructed chimeric DNA molecules were expressed by transfected Chinese hamster ovary cells and the ability of the engineered proteins to interact with FcγRI-expressing cells was confirmed by flow cytometry. The fusion protein induced a strong signal transduction on human monocytes via FcγRI. The expression vector pTriEx-3 Neo containing the described construct was used as a naked DNA vaccine and introduced directly to experimental humanized NOD SCID gamma mice with or without boosting with the expressed fusion protein. Immunization with the generated DNA chimeric molecules and prime-boost with the expressed recombinant proteins induced significant serum levels of anti-influenza immunoglobulin G antibodies and strong cytotoxic T lymphocyte activity against influenza virus-infected cells in humanized animals.

Представяне на епитопи от инфлуенца вирус на антиген-представящи клетки чрез генно-инженерни химерни молекули в хуманизиран NOD SCID Gamma трансферен модел

Антивирусните ДНК ваксини, състоящи се от вектор, кодиращ вирусен антиген са иновативна стратегия в сферата на ваксините. Свързването на неизменящи се вирусни епитопи с фрагмент от антитяло, което е специфично за активиращи рецептори по повърхността на антиген-представящи клетки, е алтернативен подход за индуцирането на защитен имунен отговор. Известно е, че FcγRI, намиращ се по повърхността на човешки моноцити, подобрява антигенното представяне *in vivo*. Разнообразни ДНК конструктори, кодиращи едноверижни вариабилни фрагменти (scFv) от мише античовешко FcγRI моноклонално антитяло, бяха добавени към векторна система pTriEx-3 Neo. Това антитяло от своя страна е свързано към последователност, кодираща хемаглютинин от инфлуенца вирус А, съдържащ Т- и В-клетъчен епитоп.

Химерните ДНК молекули бяха експресирани от трансфектирани CHO клетки и чрез проточен цитометър беше потвърдена възможността на тези синтетични протеини да взаимодействат с FcγRI- експресиращи клетки. Така сглобеният протеин предизвика провеждането на силен сигнал чрез FcγRI върху човешки моноцити. Експресионният вектор pTriEx-3 Neo, съдържащ гореспоменатия конструктор, беше използван за ДНК ваксина и с него бяха третирани експериментални хуманизиран NOD SCID gamma мишки, с или без стимулиране с белтъчен еквивалент на конструктора.

Имунизацията с генерираните ДНК химерни молекули и стимулирането с експресирания рекомбинантен протеин индуцираха високи нива на анти-инфлуенца IgG антитела, както и силна цитотоксична активност на Т лимфоцити срещу клетки, инфектирани с инфлуенца вирус в хуманизиран животни.

16. Manoylov, I., Boneva, G., Doytchinova, I., Mihaylova N., **Tchorbanov A.** Protein-engineered molecules carrying GAD65 epitopes and targeting CD35 selectively down-modulate disease-associated human B lymphocytes. **Clin Exp Immunol** 2019, 197 (3): 329-340; doi: 10.1111/cei.13305

Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia, the presence of autoreactive T and B cells and autoantibodies against self-antigens. A membrane-bound enzyme on the pancreatic beta-cells, glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65), is one of the main autoantigens in type 1 diabetes. Autoantibodies against GAD65 are potentially involved in beta-cell destruction and decline of pancreatic functions. The human complement receptor type 1 (CD35) on B and T lymphocytes has a suppressive activity on these cells. We hypothesized that it may be possible to eliminate GAD65-specific B cells from type 1 diabetes patients by using chimeric molecules, containing an anti-CD35 antibody, coupled to peptides resembling GAD65 B/T epitopes. These molecules are expected to selectively bind the anti-GAD65 specific B cells by the co-crosslinking of the immunoglobulin receptor and CD35 and to deliver a suppressive signal. Two synthetic peptides derived from GAD65 protein (GAD65 epitopes) and anti-CD35 monoclonal antibody were used for the construction of two chimeras. The immunomodulatory activity of the engineered antibodies was tested *in vitro* using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from type 1 diabetes patients. A reduction in the number of anti-GAD65 IgG antibody-secreting plasma cells and increased percentage of apoptotic B lymphocytes was observed after treatment of

these PBMCs with the engineered antibodies. The constructed chimeric molecules are able to selectively modulate the activity of GAD65-specific B lymphocytes and the production of anti-GAD65 IgG autoantibodies by co-cross-linking of the inhibitory CD35 and the B cell antigen receptor (BCR). This treatment presents a possible way to alter the autoimmune nature of these cells.

Протеин-инженерни белтъчни молекули, носещи епитопи от GAD65 и свързващи се селективно с CD35, понижават активността на автореактивни човешки В лимфоцити

Захарен диабет тип 1 е автоимунно метаболитно заболяване, за което са характерни хипергликемията, присъствието на автореактивни Т и В клетки, както и автоантитела срещу собствени антигени. Ензимът декарбоксилаза на аминокиселината глутамат 65 (GAD65), намиращ се на мембраната на панкреатични бета-клетки, е един от основните автоантигени при диабет тип 1. Вероятно автоантитела срещу GAD65 са свързани с разрушаването и намаляването на функцията на панкреаса.

Човешкият рецептор за комплемент тип 1 (CD35), намиращ се върху В и Т лимфоцити, има потискащо действие върху тези клетки. Според нас е възможно да елиминираме GAD65-специфичните В клетки при пациенти с диабет тип 1 чрез третиране с химерни молекули, съдържащи анти-CD35 антитела свързани с пептиди, наподобяващи GAD65 В/Т епитопи. Очаква се тези молекули селективно да свържат анти-GAD65-специфични В клетки и кръстосано да обвържат имуноглобулиновия рецептор CD35, генерирайки по този начин потискащ сигнал.

Двата синтетични пептида, част от протеина GAD65 (GAD65 епитопи) и анти-CD35 моноклонално антитяло, бяха използвани за конструиране на две химери. Имуномодулаторната активност на синтетичните антитела беше тествана *in vitro*, използвайки периферни мононуклеарни клетки (PBMC) от пациенти с диабет тип 1. Третирането на тези PBMC със синтетичните антитела предизвика понижаване в броя на анти-GAD65 IgG антитяло-секретиращи плазматични клетки, както и увеличаването на процента апоптиращи В лимфоцити. Конструираните химерни молекули успяха селективно да модулират активността на GAD65-специфичните В клетки заедно с производството на анти-GAD65 IgG автоантитела чрез кръстосано свързване на инхибиращия CD35 с В-клетъчен рецептор (BCR). Тази терапия предоставя възможност да забавим автоимунната природа на тези клетки.