

**Резюмета на статии на английски и български, участващи в
справката за изпълнението на изискванията според ЗРАСРБ и тези на
ИМикБ-БАН на главен асистент д-р Николина Михайлова**

**1. Selective silencing of DNA-specific B lymphocytes delays lupus activity in
MRL/lpr mice**

Andrey I. Tchorbanov, Elisaveta N. Voynova, Nikolina M. Mihaylova, Todor A. Todorov,
Maria Nikolova, Vihra M. Yomtova, Bor-Luen Chiang and Tchavdar L. Vassilev;
Eur. J. Immunol.; 2007; 37: 3587–3596

Abstract

The pathological DNA-specific B lymphocytes in lupus are logical targets for a selected therapeutic intervention. We have hypothesized that it should be possible to suppress selectively the activity of these B cells in lupus mice by administering to them an artificial molecule that cross-links their surface immunoglobulins with the inhibitory FcγRIIb surface receptors. A hybrid molecule was constructed by coupling the DNA-mimicking DWEYSVWLSN peptide to a monoclonal anti-mouse FcγRIIb antibody. This chimeric antibody was added to cultured spleen cells from sick MRL/lpr mice, immunized with diphtheria toxoid, resulting in reduction of the numbers of anti-DNA but not of anti-diphtheria IgG antibody-producing cells. Intravenous infusions with the DNA-peptide antibody chimera to 7-wk-old animals prevented the appearance of IgG anti-DNA antibodies and of albuminuria in the next 2 months. The administration of the DNA-peptide chimeric antibody to 18 wk-old mice with full-blown disease resulted in the maintenance of a flat level of IgG anti-DNA antibodies and in delay of the aggravation of the lupus glomerulonephritis. The use of chimeric antibodies targeting inhibitory B lymphocyte receptors represents a novel approach for the selective suppression of autoreactive disease-associated B cells in autoimmune diseases.

**Селективното потискане на ДНК-специфични В лимфоцити забавя активността
на лупус при MRL / lpr мишки**

Андрей И. Чорбанов, Елисавета Н. Войнова, Николина М. Михайлова, Тодор А.
Тодоров, Мария Николова, Вихра М. Йомтова, Бор-Луен Чианг и Чавдар Л. Василев

Резюме

Патологичните ДНК-специфични В лимфоцити при СЛЕ са логична цел за селективна терапия. Ние предположихме, че би трябвало да е възможно да се потиска селективно активността на тези В клетки при мишки с лупус, като им се прилага изкуствена молекула, която омрежва техните повърхностни имуноглобулини с инхибиторните повърхностни рецептори Fcγ3R. Хибридна молекула е конструирана чрез свързване на ДНК-имитиращ DWEYSVWLSN пептид с моноклонално анти-мише Fcγ3R антитяло. Това химерно антитяло се добавя към спленоцити изолирани от болни MRL / lpr мишки, имунизирани с дифтериен токсин, което води до намаляване на броя на анти-ДНК, но не и на клетките, произвеждащи анти-дифтерийни IgG антитела. Интравенозното третиране на 7-седмични животни с химерните молекули предотвратяват появата на IgG анти-ДНК антитела и на албинурия през следващите 2 месеца. Прилагането на химерните антитяла на 18 седмични мишки с напълно развита болест, доведе до запазване на нивата на IgG анти-ДНК антителата и до забавяне на влошаването на лупусния гломерулонефрит. Използването на химерни антитела, насочени към инхибиторни В лимфоцитни рецептори, представлява нов подход за селективно потискане на свързани с автореактивните В клетки при автоимунни заболявания.

2. Suppression of autoreactive T and B lymphocytes by anti-annexin A1 antibody in a humanized NSG murine model of systemic lupus erythematosus.

N. Mihaylova, P. Chipinski, S. Bradyanova, T. Velikova, E. Ivanova-Todorova, S. Chausheva, M. Herbáth, D. Kalinova, J. Prechl, D. Kyurkchiev, A. I. Tchorbanov,
Clin Exp Immunol. 2020 Mar;199(3):278-293

Abstract

Systemic lupus erythematosus is a chronic inflammatory disease which involves multiple organs. Self-specific B and T cells play a main role in the pathogenesis of lupus and have been defined as a logical target for selective therapy. The protein annexin A1 (ANX A1) is a modulator of the immune system involving many cell types. An abnormal expression of ANX A1 was found on activated B and T cells during autoimmunity, suggesting its importance as a potential therapeutic target. We hypothesize that it may be possible to down-regulate the activity of autoreactive T and B cells from lupus patients in a humanized immunodeficient mouse model by treating them with an antibody against ANX A1. When cultured in the presence of anti-ANX A1, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from lupus patients

showed a decreased number of immunoglobulin (Ig)G anti-dsDNA antibody-secreting plasma cells, decreased T cell proliferation and expression of activation markers and increased B and T cell apoptosis. We employed a humanized model of SLE by transferring PBMCs from lupus patients to immunodeficient non-obese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice. The humanized animals presented autoantibodies, proteinuria and immunoglobulin deposition in the renal glomeruli. Treatment of these NOD-SCID mice with an anti-ANX A1 antibody prevented appearance of anti-DNA antibodies and proteinuria, while the phosphate-buffered saline (PBS)-injected animals had high levels after the transfer. The treatment reduced the levels of autoantibodies to several autoantigens, lupus-associated cytokines and disease symptoms.

Потискане на автореактивни Т и В лимфоцити чрез анти-анексин А1 антитяло в хуманизиран NSG миши модел на системен лупус еритематозус

Н. Михайлова, П. Чипински, С. Брадянова, Т. Великова, Е. Иванова - Тодорова, С. Чаушева, М. Хербат, Д. Калинова, Й. Прехл, Д. Кюркчиев, А. И. Чорбанов

Резюме

Системният лупус еритематозус е хронично възпалително заболяване, което обхваща множество органи. Автоимунните В и Т клетки играят основна роля в патогенезата на лупуса и са определени като логична цел за селективна терапия. Протеинът анексин А1 (ANX A1) е модулатор на имунната система, включващ много видове клетки. Анормалната експресия на ANX A1 е открита върху активирани В и Т клетки по време на автоимунитет, което предполага неговото значение като потенциална терапевтична цел. Предполагаме, че може да е възможно да се регулира активността на автореактивните Т и В клетки от пациенти с лупус в модел на хуманизирана имунодефицитна мишка, като се третира с антитяло срещу ANX A1. Култивирането на периферни мононуклеарните клетки от пациенти с лупус се култивират в присъствието на анти-ANX A1 антитяло, води до намаляване броя на анти-dsDNA антитяло секретирани плазмени клетки, намаляване пролиферацията на Т-клетките и експресията на маркерите за активиране, както и се повишена В и Т клетъчна апоптоза. Използвахме хуманизиран модел на СЛЕ чрез прехвърляне на РВМС от пациенти с лупус на имунодефицитни мишки с комбиниран имунодефицитен (NOD-SCID). Лечението на тези NOD-SCID мишки с анти-ANX A1 антитяло предотвратява появата на анти-ДНК антитета и протеинурия, докато инжектираните с буфериран физиологичен разтвор

(PBS) имат високи нива след трансфера. Лечението потиска нивата на автоантителата към няколко автоантигена, свързаните с лупус цитокини и симптомите на заболяването.

3. Humanized SCID mice models of SLE

Kerekov N, Mihaylova N, Prechl J, Tchorbanov A

Curr Pharm Des. 2011; 17(13):1261-6 DOI: 10.2174/138161211795703780.

Abstract

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 co-crosslinking 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 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.

Хуманизирани модели SCID мишки на SLE

Кереков Н, Михайлова Н, Прехл Й., Чорбанов А

Резюме

Патологичните ДНК-специфични В-клетки при системният лупус еритематозус са логична цел за терапевтична интервенция. Наскоро беше показано, че рецепторът на комплемента тип 1 върху човешки В и Т-лимфоцити има супресивна активност. Съвместното омрежване на този рецептор с В-клетъчния рецептор (BCR) инхибира активирането и пролиферацията на В-клетките и може да бъде нова цел за включване на отрицателен сигнал. Експерименталната терапия при хора е ограничена от много етични съображения. Мишките с тежка комбинирана имунна недостатъчност (SCID), които

нямат както Т, така и В лимфоцити и приемат ксеногенни клетки, се използват за трансфер на човешки клетки за оценка на патогенезата на човешкия СЛЕ. Предполагаме, че е възможно да се възстанови толерантността към естествената ДНК при хуманизирани SCID мишки с клетки, прехвърлени от пациенти със СЛЕ, като се третират с химерна молекула, съдържаща моноклонално антитяло срещу човешки инхибиторен рецептор на комплемент тип 1, свързан с декапептид DWEYSVWLSN, който имитира в антигенно отношение ДНК. Тези протеинови инженерни молекули са способни да свързват селективно анти-ДНК специфични В-клетки, с инхибиращите повърхностни рецептори, като по този начин доставят силен потискащ сигнал.

4. Elimination of autoreactive B cells in humanized SCID mouse model of SLE

Kerekov NS, **Mihaylova NM**, Grozdev I, Todorov TA, Nikolova M, Baleva M, Nikolova M, Prechl J, Erdei A, Tchorbanov AI.

Eur J Immunol. 2011; 41:1-11 DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201141439> .

Abstract

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 are 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-cross-linking 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 mAb coupled to the decapeptide DWEYSVWLSN that mimics dsDNA. The generated protein-engineered chimera was able to co-cross-link selectively native DNA-specific BCR with the B-cell inhibitory receptor CR1, thus delivering a strong inhibitory signal.

Елиминирание на автореактивни В клетки в хуманизиран SCID миши модел на SLE

Кереков Н.С., Михайлова Н.М., Гроздев I, Тодоров Т.А., Николова М, Балева М, Николова М, Прехл Дж, Ердей А, Чербанов А.И.

Резюме

Въпреки че, все още не е установена точната етиология на системния лупус еритематозус (SLE), В-клетъчната хиперактивност и производството на автоантитела, насочени към компоненти на клетъчното ядро, са потвърден патогенетичен механизъм на заболяването. Следователно, насоченото инхибиране на специфични за ДНК В клетки е логичен терапевтичен подход. Доказано е, че рецепторът на комплемента тип 1 (CR1, CD35) потиска активирането и пролиферацията на В-клетките на човека след едновременното омрежване с BCR и може да служи като медиатор за доставяне на отрицателен вътреклетъчен сигнал. За да се оцени този терапевтичен подход, ние използвахме имунодефицитни SCID мишки, трансферирани с PBMC от пациенти със СЛЕ. Толерантността на тези хуманизирани SCID мишки към естествена ДНК беше възстановена след прилагане на химерна молекула, състояща се от CR1-специфично моноклонално антитяло, свързан с декапептида DWEYSVWLSN, който имитира в антигенно отношение двДНК. Генерираната протеинова химера свързва кръстосано ДНК В клетки притежаващи BCR специфичен за двДНК с В-клетъчния инхибиращ рецептор CR1, като по този начин доставя силен инхибиращ сигнал.

5. Target silencing of disease-associated B-lymphocytes by chimeric molecules in SCID model of pristane-induced autoimmunity.

Dimitrova I, Gesheva V, Nikolova K, Mihaylova N, Todorov T, Nikolova M, Tchobanov A.
Lupus; 2010; Oct;19(11):1261-1271

Abstract

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 аутоимунитет

Димитрова И., Гешева В., Николова К., Михайлова Н., Тодоров Т., Николова М.,
Чорбанов А

Абстракт

Системен лупус еритематозус (СЛЕ) е аутоимунно 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 аутоантитела. В настоящата статия, използвайки пристан-индуциран аутоимунен 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.

6. Simultaneous engagement of Fc gamma IIb and CD22 inhibitory receptors silences targeted B cells and suppresses autoimmune disease activity

Mihaylova N., Voynova E., Tchormanov A., Dolashka-Angelova P., Bayry J., Van Beeumen J., Kaveri S., Vassilev T

Molecular Immunology, 2009, 47: 123-130

Abstract

All B cell targeting therapeutic approaches used at present are unspecific and there is an urgent need for agents that silence selectively pathological autoreactive B lymphocytes only. We hypothesized that this aim could be achieved by chimeric antibodies that cross-link B cell immunoglobulin receptors with inhibitory receptors on the surface of the same targeted disease-associated cell. A hybrid molecule was constructed by coupling copies of the DNA-mimicking DWEYSVWLSN peptide and of the CD22-binding STN epitope with a free terminal sialic acid to a mouse monoclonal IgG antibody backbone. The DNA mimotope peptide binds to the immunoglobulin B cell receptor of pathological DNA-specific B cells of lupus mice, the STN epitope - to CD22 and the IgG by its Fc fragment - to FcγIIb on the surface of the same cell. Mass-spectra analysis showed that 4 STN epitopes plus 5 DNA mimotope peptides were coupled to a single light immunoglobulin chain and 4 STN - and 2 DNA mimotopes - to a heavy chain. Both FcγIIb and CD22 receptors on spleen cells from lupus MRL/lpr mice were phosphorylated after exposure to the chimeric antibody, indicating the involvement of both inhibitory pathways. The constructed chimera suppressed specifically in vitro as well as in vivo anti-DNA IgM and IgG antibody production and delayed the development of glomerulonephritis in the lupus-prone animals. The use of chimeric antibodies targeting two independent inhibitory B lymphocyte receptors represents a novel approach for the selective suppression of pathological autoreactive B cells in autoimmune diseases.

**Едновременното ангажирани на Fc gamma IIb и CD22 инхибиторните рецептори
заглушава таргетните В клетки и потиска активността на автоимунното
заболяването**

Михайлова Н., Войнова Е., Чорбанов А., Долашка-Ангелова П., Байри Дж., Ван Биймен
Й., Кавери С., Василев Т

Резюме

Всички терапевтични подходи, насочени към автореактивните В клетки, използвани в момента, са неспецифични и има спешна нужда от средства, които да заглушават селективно само патологичните автореактивни В лимфоцити. Ние предположихме, че тази цел може да бъде постигната чрез химерни антитела, които омрежват едновременно В-клетъчни имуноглобулинови рецептори с инхибиторни рецептори на повърхността на свързаната с болестта клетка. Конструирана е хибридна молекула чрез свързване на копия на ДНК-имитация DWEYSVWLSN пептид и на CD22-свързващия STN епитоп със свободна крайна сиалова киселина към скелет от мише моноклонално IgG антитяло. ДНК мимотопният пептид се свързва с имуноглобулиновия В клетъчен рецептор на патологични ДНК специфични В клетки на лупус мишки, STN епитопът - с CD22 и IgG чрез неговия Fc фрагмент - с Fc gamma IIb на повърхността на същата клетка. Маспектрометричният анализ показва, че 4 STN епитопи и 5 ДНК мимотопни пептиди са свързани към всяка лека имуноглобулинова верига и 4 STN - и 2 ДНК мимотопи - към тежката верига. Както Fc gamma IIb, така и CD22 рецепторите върху спленоцитите изолирани от предразположени към развитието на лупус MRL / lpr мишки се фосфорилирани след въздействието на химерното антитяло, което показва участието на двата инхибиторни пътя. Конструираната химера потиска специфично *in vitro*, както и *in vivo* производството на анти-ДНК IgM и IgG антитела и забавя развитието на гломерулонефрит при предразположени към лупус животни. Използването на химерни антитела, насочени към два независими инхибиращи В лимфоцитни рецептора, представлява нов подход за селективно потискане на патологичните автореактивни В клетки при автоимунни заболявания.

7. Monoclonal antibody therapy that targets phospholipid-binding protein delays lupus activity in MRL/lpr mice.

Nikolina Mihaylova, Silviya Bradyanova, Petroslav Chipinski, Stela Chausheva, Dobroslav Kyurkchiev, Andrey Tchorbanov.

Scand J Immunol. 2020 Jun 13; Volume 92, Issue 3 e12915. <https://doi.org/10.1111/sji.12915>

Abstract

Systemic lupus erythematosus is an autoimmune syndrome characterized by the development of autoantibodies to a wide range of antigens. Together with B cells, respective self-reactive T cells have an important contribution in disease progression as being responsible for inflammatory cytokines secretion, B cell activation, and promoting amplification of the autoimmune response. Annexin A1 is expressed by many cell types and binds to phospholipids in a Ca²⁺ dependent manner. Abnormal expression of annexin A1 was found on activated B and T cells in both murine and human autoimmunity suggesting its potential role as a therapeutic target. In the present study we have investigated the possibility to suppress autoimmune manifestation in spontaneous mouse model of lupus using anti-annexin A1 antibody. Groups of lupus-prone MRL/lpr mice were treated with the anti-annexin A1 monoclonal antibody and the disease activity and survival of the animals were following up. Flow cytometry, ELISA assays, Histological and Immunofluorescence kidney analyses were used to determine the levels of Annexin A1 expression, cytokines, anti-dsDNA antibodies and kidney injuries. The administration of this monoclonal antibody to MRL/lpr mice resulted in suppression of IgG anti-dsDNA antibody production, modulated IL10 secretion, decreased disease activity and prolonged survival compared to the control group.

Терапията с моноклонално антитяло насочено срещу фосфолипид-свързващ протеин забавя развитието на лупус при MRL/lpr мишки

Николина Михайлова, Силвия Брадянова, Петрослав Чипински, Стела Чаушева,
Доброслав Кюркчиев и Андрей Чорбанов

Абстракт

Системният лупус еритематозус е автоимунен синдром, характеризиращ се с развитието на автоантитела към широк спектър от антигени. Заедно с В-клетките, съответните автореактивни Т-клетки имат важен принос в прогресията на заболяването, тъй като са отговорни за секрецията на възпалителни цитокини, активирането на В-клетките и

подпомогот развитието на автоимунния отговор. Анексин А1 се експресира от много видове клетки и се свързва с фосфолипидите по зависим от Ca^{2+} път. Установена е аномална експресия на анексин А1 върху активирани В и Т клетки както при миши модели, така и при хората, което предполага потенциалната му роля като терапевтична цел. В настоящото проучване ние изследвахме възможността за потискане на автоимунната проява в спонтанен миши модел на лупус, използвайки анти-анексин А1 антитяло. Групи MRL/lpr мишки предразположени към развитието на лупус, бяха третирани с анти-анексин А1 моноклонално антитяло и беше проследена активността на болестта и преживяемостта на животните. Проточна цитометрия, ELISA тестове, хистологични и имунофлуоресцентни анализи на бъбреците бяха използвани за да се проследят нивата на експресия на Анексин А1, нивата на цитокините и антителата срещу dsDNA както и развитието на бъбречните увреждания. Прилагането на това моноклонално антитяло върху MRL/lpr мишки води до потискане на производството на ИГГ анти-dsDNA антитела, модулирана секреция на IL10, намалява активността на заболяването и удължава преживяемостта на животните в сравнение с контролната група.

8. Annexin A1 as a target for managing murine pristane-induced systemic lupus erythematosus

Nikolina Mihaylova, Silviya Bradyanova, Petroslav Chipinski, Melinda Herbáth, Stela Chausheva, Dobroslav Kyurkchiev, József Prechl and Andrey I. Tchorbanov
Autoimmunity, 2017; Volume 50 Issue 4: 257-268

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a polygenic pathological disorder which involves multiple organs. Self-specific B cells play a main role in the lupus pathogenesis by generating autoantibodies as well as by serving as important autoantigen-presenting cells. Autoreactive T lymphocytes, on the other hand, are responsible for B cell activation and proliferation, and cytokine production. Therefore, both factors promote the idea that a down-modulation of activated self-reactive T and B cells involved in the pathogenic immune response is a reasonable approach for SLE therapy. Annexin A1 (ANX A1) is expressed by many cell types and binds to phospholipids in a Ca^{2+} dependent manner. Abnormal expression of ANX A1 was found on activated B and T cells in both murine and human autoimmunity, suggesting its potential role as a therapeutic target. While its role on T lymphocytes is through formyl peptide receptor-like

molecules (FPRL), and the formed ANX A1/FPRL pathway modulates T cell receptor signalling, there is still no fool-proof data available for the role of ANX A1 in B cells. We employed a lupus model of Balb/c mice with pristane-induced SLE which very closely resembles human lupus. In the present study, we investigated the possibility to modulate the autoimmune response in a pristane-induced mouse model of SLE using an anti- ANX A1 antibody. Administration of this monoclonal antibody resulted in the inhibition of T-cell activation and proliferation, suppression of IgG anti-dsDNA antibody-secreting plasma cells and of proteinuria, decreased disease activity and prolonged survival compared to control group.

Анексин А1 като средство за управление на пристан-индуциран миши системен лупус еритематозус

Николина Михайлова, Силвия Брадянова, Петрослав Чипински, Мелинда Хербат, Стела Чаушева, Доброслав Кюркчиев, Йозеф Прехл и Андрей И. Чорбанов

Резюме

Системният лупус еритематозус (SLE) е полигенно патологично разстройство, което включва множество органи. Автоспецифичните В клетки играят основна роля в патогенезата на лупуса, като генерират автоантитела, както и като автоантиген-представящи клетки. Автореактивните Т-лимфоцити, от друга страна, са отговорни за активирането и пролиферацията на В-клетките и производството на цитокини. Следователно, модулирането на активността на авторитеактивните Т и В клетки, участващи в патогенния имунен отговор, е разумен подход за лечение на СЛЕ. Анексин А1 (ANX A1) се експресира от много типове клетки и се свързва с фосфолипидите по зависим от Ca^{2+} начин. Установена е аномална експресия на ANX A1 върху активирани В и Т клетки както в миши автоимунни модели, така и при хора с автоимунни болести, което предполага потенциалната му роля като терапевтична цел. Докато ролята му върху Т-лимфоцитите е чрез формил-пептидни рецептор-подобни молекули (FPRL), а образуваният път ANX A1 / FPRL модулира сигнализирането на Т-клетъчните рецептори, все още няма надеждни данни за ролята на ANX A1 при В-клетките. Използвахме пристан-индуциран модел на лупус при Balb / с мишки, който много прилича на човешки лупус. В настоящото проучване, ние изследвахме възможността да модулираме автоимунния отговор в индуциран от пристан миши модел на СЛЕ, използвайки анти-ANX A1 антитяло. Прилагането на това моноклонално антитяло води

до инхибиране на активирането и пролиферацията на Т-клетките, потискане на IgG анти-dsDNA-секретиращите плазмени клетки и на протеинурията, намалена активността на заболяването и удължено преживяване на животните в сравнение с контролната група.

9. Suppression of dsDNA-specific B lymphocytes reduces disease symptoms in SCID model of mouse lupus

Gesheva V, Kerekov N, Nikolova K, Mihaylova N, Todorov T, Nikolova M, Tchobanov A. Autoimmunity. 2014 Feb 6; 1-11 DOI: [10.3109/08916934.2014.883502](https://doi.org/10.3109/08916934.2014.883502)

Abstract

Self-specific B cells play a main role in the pathogenesis of lupus. This autoimmune disease is characterized by the generation of autoantibodies against self antigens, and the elimination of B and T cells involved in the pathological immune response is a logical approach for effective therapy. We have previously constructed a chimeric molecule by coupling a DNA-mimotope peptides to an anti-CD32 antibody. Using this protein molecule for the treatment of lupusprone MRL/lpr mice, we suppressed selectively the autoreactive B-lymphocytes by cross-linking B cell receptors with the inhibitory FcγRIIb receptors. This approach was limited by the development of anti-chimeric antibodies in MRL mice. In order to avoid this problem, we established a murine severe combined immunodeficiency lupus model, allowing a long-term chimera therapy. Elimination of the double-stranded DNA-specific B cells by chimera therapy in MRL-transferred immunodeficient mice resulted in inhibition of T cell proliferation and prevented the appearance of IgG anti-DNA antibodies and of proteinuria.

Потискането на специфичните към двДНК В лимфоцити намалява симптомите на заболяването в SCID миши модел на лупус

Вера Гешева, Никола Кереков, Калина Николова, Николина Михайлова, Тодор Тодоров, Мария Николова и Андрей Чорбанов

Резюме

Автоимунните В клетки играят основна роля в патогенезата на лупус. Това автоимунно заболяване се характеризира с генериране на автоантитела срещу собствени антигени и елиминирането на В и Т клетки, участващи в патологичния имунен отговор, е логичен подход за ефективна терапия. Конструирали сме химерна молекула чрез свързване на

ДНК-мимотопни пептиди с анти-CD32 антители. Използвайки тази протеинова молекула за лечение на MRL / lpr мишки, които спонтанно развиват лупус, ние потискахме селективно автореактивните В-лимфоцити чрез омрежване на В-клетъчни рецептори с инхибиращите FcγRIIb рецептори. Този подход е ограничен от развитието на анти-химерни антитела при MRL мишките. За да се избегне този проблем, ние разработихме миши модел на лупус при мишки с тежка имунна недостатъчност, който позволява дългосрочна терапия с химерните молекули. Елиминирането на дв ДНК-специфични В клетки чрез терапия с химерите при MRL-трансферирани имунодефицитни мишки, води до инхибиране на пролиферацията на Т-клетки и предотвратява появата на IgG анти-ДНК антитела и на протеинурия.

10. Long-Time Cooling before Cryopreservation Decreased Translocation of Phosphatidylserine (Ptd-L-Ser) in Human Ovarian Tissue

Isachenko V, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Tchobanov A, Mihaylova N, Manoylov I, Mallmann P, Merzenich M.

PLoS One. 2015 Jun 17;10(6):e0129108. doi: 10.1371/journal.pone.0129108. eCollection 2015.

Abstract

Objectives: To translocation (externalization) of phosphatidylserine lead at least the five negative effects observed during cells cryopreservation: hypoxia, increasing of intracellular Ca²⁺, osmotic disruption of cellular membranes, generation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation. The aim of this study was to test the intensiveness of the phosphatidylserine translocation immediately after thawing and after 45 d xenografting of human ovarian tissue, which was either frozen just after operative removal from patient or cooled before cryopreservation to 5°C for 24 h and then frozen.

Materials and Methods: Ovarian fragments from twelve patients were divided into small pieces in form of cortex with medulla, and randomly divided into the following four groups. Pieces of Group 1 (n=30) were frozen immediately after operation, thawed and just after thawing their quality was analyzed. Group 2 pieces (n=30) after operation were cooled to 5°C for 24 h, then frozen after 24 h pre-cooling to 5°C, thawed and just after thawing their quality was analyzed. Group 3 pieces (n=30) were frozen immediately after operation without pre-cooling, thawed, transplanted to SCID mice and then, after 45 d of culture their quality was analyzed. Group 4 pieces (n=30) were frozen after 24 h pre-cooling to 5°C, thawed, transplanted to SCID mice and then, after 45 d their quality was analyzed. The effectiveness of the pre-freezing cooling of

tissue was evaluated by the development of follicles (histology) and by intensiveness of translocation of phosphatidylserine (FACS with FITC-Annexin V and Propidium Iodide).

Results: For groups 1, 2, 3 and 4 the mean densities of follicles per 1 mm³ was 19.0, 20.2, 12.9, and 12.2, respectively (P1-2, 3-4 >0.1). For these groups, 99%, 98%, 88% and 90% preantral follicles, respectively were morphologically normal (P1-2, 3-4 >0.1). The FACS analysis showed significantly decreased intensiveness of translocation of phosphatidylserine after pre-cooling of frozen tissue (46.3% and 33.6% in Groups 2 and 4, respectively), in contrast with tissue frozen without pre-cooling (77.1% and 60.2% in Groups 1 and 3, respectively, P1, 3-2, 4 <0.05).

Conclusions: Long time (24 h) cooling of ovarian tissue to 5°C before cryopreservation decreased translocation of phosphatidylserine that evidences about increases the viability of the cells in the tissue after thawing.

Продължително охлаждане преди криоконсервацията намалява транслокация на фосфатидилсерин (Ptd-L-Ser) при човешка яйчникова тъкан

Исаченко В, Тодоров П, Исаченко Е, Рахими Г, Чорбанов А, Михайлова Н, Манойлов И, Малман П, Мерценич М.

Резюме

Цели: Екстернализацията на фосфатидилсерин води до поне пет негативни ефекта, наблюдавани по време на криоконсервацията на клетките: хипоксия, увеличаване на вътреклетъчния Ca²⁺, осмотично разрушаване на клетъчните мембрани, генериране на реактивни кислородни радикали (ROS) и липидна пероксидация. Целта на това проучване беше да се тества интензивността на транслокацията на фосфатидилсерина веднага след размразяване и след 45 дневна ксенотрансплантация на човешка яйчникова тъкан, която или е била замразена непосредствено след оперативното отстраняване от пациентката или е охладена преди криоконсервация до 5 ° C за 24 часа и след това замразена.

Материали и методи: Фрагментите на яйчниците от дванадесет пациентки бяха разделени на малки парченца всяко съдържащо кортекс и медула и произволно разделени на следните четири групи. Парчета от група 1 (n = 30) бяха замразени веднага след оперативното отстраняване, размразени и непосредствено след размразяване тяхното качество беше анализирано. Група 2 (n = 30) парчетата бяха охладени до 5 ° C за 24 часа

след оперативно отстраняване, след това замразени и непосредствено след размразяване тяхното качество беше анализирано. Група 3 (n = 30) парчета замразени веднага след операция без предварително охлаждане, размразени, трансплантирани на SCID мишки за 45 дни след което, тяхното качество беше анализирано. Група 4 (n = 30) парчетата бяха замразени след 24 h предварително охлаждане до 5 ° C, размразени, трансплантирани на SCID мишки за 45 дни след което тяхното качество беше анализирано. Ефективността на предварително охлаждане на тъканите преди замразяване беше оценена чрез развитието на фоликули (хистология) и чрез интензивността на транслокацията на фосфатидилсерин (FACS с FITC-анексин V и пропидиев йодид).

Резултати: За групи 1, 2, 3 и 4 средната плътност на фоликулите на 1 mm³ е съответно 19,0, 20,2, 12,9 и 12,2 (P1-2, 3-4 > 0,1). За тези групи съответно 99%, 98%, 88% и 90% преантрални фоликули са морфологично нормални (P1-2, 3-4 > 0,1). Анализът на FACS показва значително намалена интензивност на транслокация на фосфатидилсерин след предварително охлаждане на замразена тъкан (съответно 46,3% и 33,6% в групи 2 и 4), за разлика от тъканите, замразени без предварително охлаждане (77,1% и 60,2% в групите 1 и 3, съответно, P1, 3-2, 4 < 0,05).

Заклучения: Предварителното охлаждане (за 24 часа) на яйчниковата тъкан до 5 ° C преди криоконсервация намалява транслокацията на фосфатидилсерин, което свидетелства за увеличаване на жизнеспособността на клетките в тъканта след размразяване.

11. Intensive therapy with gastropodan hemocyanins increases their antitumor properties in murine model of colon carcinoma.

Stoyanova E, Mihaylova N, Manoylov I, Bradyanova S, Raynova Y, Idakieva K, Tchorbanov A.

Int Immunopharmacol. 2020 May 13;84: 106566. DOI: [10.1016/j.intimp.2020.106566](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106566)

Abstract

Various natural compounds have been tested as anticancer therapeutics in clinical trials. Most promising direction for antitumor therapy is the use of substances which enhance the immune system response stimulating tumor-specific lymphocytes. Hemocyanins are large extracellular oxygen transport glycoproteins isolated from different arthropod and mollusk species which exhibit strong anticancer properties. Immunized in mammals they trigger Th1 immune response

that promotes unspecific stimulation and adjuvant activity in experimental therapeutic vaccines for cancer and antibody development. In the present study we used two hemocyanins – one isolated from marine snail *Rapana thomasiana* (RtH) and another one, from the terrestrial snail *Helix pomatia* (HpH) which have been investigated by using different administration schedules (intensive and mild) in murine model of colon carcinoma. The treatment with RtH and HpH generated high levels of antitumor IgG antibodies, antibody-producing plasma cells and tumor-specific CTLs, stimulated secretion of proinflammatory cytokines, suppressed the manifestation of carcinoma symptoms as tumor growth and size, and prolonged the life span of treated mice. Our results showed a significant anti-cancer effect of RtH and HpH hemocyanins on a murine model of colon carcinoma with promising potential for immunotherapy in various schemes of administration based on crossreactive tumor-associated epitopes.

Интензивната терапия с гастроподанови хемоцианини увеличава техните противотуморни свойства при миши модел на карцином на дебелото черво.

Стоянова Е, Михайлова Н, Манойлов И, Брадянова С, Райнова Я, Идакиева К.,
Чорбанов А.

Резюме

Различни природни съединения са тествани като противоракови терапевтични средства в клинични изпитвания. Най-обещаващата посока за противотуморна терапия е употребата на вещества, които подобряват отговора на имунната система, стимулирайки тумор-специфични лимфоцити. Хемоцианините са големи извънклетъчни кислородни транспортни гликопротеини, изолирани от различни видове членестоноги и мекотели, които проявяват силни противоракови свойства. Имунизирани при бозайници, те предизвикват Th1 имунен отговор, който насърчава неспецифична стимулация и адювантна активност в експериментални терапевтични ваксини за развитие на рак и антитела. В настоящото проучване използвахме два хемоцианина - един изолиран от морски охлюв *Rapana thomasiana* (RtH) и друг, от сухоземен охлюв *Helix pomatia* (HpH), които са изследвани с помощта на различни схеми на приложение (интензивно и леко) в миши модел на карцином на дебелото черво. Лечението с RtH и HpH генерира високи нива на антитуморни IgG антитела, продуциращи антитела плазмени клетки и тумор-специфични CTL, стимулира секрецията на провъзпалителни цитокини, потиска проявата на симптоми на карцином като растеж и размер на тумора и удължава живота на лекуваните мишки. Нашите резултати показаха значителен противораков ефект на

RtH и HpH хемоцианини върху миши модел на карцином на дебелото черво с обещаващ потенциал за имунотерапия в различни схеми на приложение, базирани на кръстореактивни тумор-свързани епитопи.

12. Antibodies Use Heme as a Cofactor to Extend Their Pathogen Elimination Activity and to Acquire New Effector Functions

Jordan D. Dimitrov, Lubka T. Roumenina, Virginia R. Doltchinkova, Nikolina M. Mihaylova, Sebastien Lacroix-Desmazes, Srinivas V. Kaveri and Tchavdar L. Vassilev

The Journal of Biological Chemistry; 2007; Vol. 282, No. 37, pp. 26696–26706. DOI:

<https://doi.org/10.1074/jbc.M702751200>

Abstract

Various pathological processes are accompanied by release of high amounts of free heme into the circulation. We demonstrated by kinetic, thermodynamic, and spectroscopic analyses that antibodies have an intrinsic ability to bind heme. This binding resulted in a decrease in the conformational freedom of the antibody paratopes and in a change in the nature of the noncovalent forces responsible for the antigen binding. The antibodies use the molecular imprint of the heme molecule to interact with an enlarged panel of structurally unrelated epitopes. Upon heme binding, monoclonal as well as pooled immunoglobulin G gained an ability to interact with previously unrecognized bacterial antigens and intact bacteria. IgG-heme complexes had an enhanced ability to trigger complement-mediated bacterial killing. It was also shown that heme, bound to immunoglobulins, acted as a cofactor in redox reactions. The potentiation of the antibacterial activity of IgG after contact with heme may represent a novel and inducible innate-type defense mechanism against invading pathogens.

Антителата използващи хем като кофактор за разширяване на дейността си за елиминиране на патогена и за придобиване на нови ефекторни функционалности

Йордан Д. Димитров, Любка Т. Руменина, Вирджиния Р. Долчинкова, Николина М. Михайлова, Себастиан Лакроа-Десмазес, Сринивас В. Кавери и Чавдар Л.

Василев

Резюме

Различните патологични процеси са придружени от отделяне на големи количества свободен хем в кръвообращението. Чрез кинетични, термодинамични и спектроскопски методи демонстрирахме, че антителата имат способност да свързват хема. Това свързване води до намаляване на конформационната свобода на паратопите на

антителата и до промяна в естеството на нековалентните сили, отговорни за свързването на антигена. Антителата използват молекулярния отпечатък на молекулата на хема, за да взаимодействат с увеличен панел от структурно несвързани епитопи. След свързването на хема, моноклоналното IgG и сборния IgG придобиват способността да взаимодействат с неразпознати преди това бактериални антигени и интактни бактерии. Комплексите IgG-хем подобриха способността си да предизвикват бактериално убиване, медирано от комплемента. Също така беше показано, че хемът, свързан с имуноглобулини, действа като кофактор в окислително-възстановителните реакции. Потенцирането на антибактериалната активност на IgG след контакт с хем може да представлява нов и индуцируем вроден тип защитен механизъм срещу нахлуващи патогени.

13. Protein-engineered molecules carrying GAD65 epitopes and targeting CD35 selectively down-modulate disease-associated human B lymphocytes

Manoylov, I.K., Boneva, G.V., Doytchinova, I.A., Mihaylova, N.M., Tchobanov, A.I.
Clin Exp Immunol. 2019 Sep;197(3):329-340 DOI: <https://doi.org/10.1111/cei.13305>.

Abstract

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-cross-linking 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.

Протеинови инженерни молекули, носещи GAD65 епитопи и насочени към CD35, селективно модулират свързаните с болестта човешки В лимфоцити

Манойлов, И. К., Бонева, Г. В., Дойчинова, И. А., Михайлова, Н. М., Чорбанов, А. И.

Резюме

Захарният диабет тип 1 е аутоимунно метаболитно заболяване, характеризиращо се с хронична хипергликемия, наличие на автореактивни Т и В клетки и аутоантитела срещу собствени антигени. Ензим, свързан с мембраната върху бета-клетките на панкреаса, глутаминова киселина декарбоксилаза 65 (GAD65), е един от основните аутоантигени при диабет тип 1. Аутоантителата срещу GAD65 потенциално участват в разрушаването на бета-клетките и спада на функциите на панкреаса. Рецепторът на човешки комплемент тип 1 (CD35) върху В и Т лимфоцитите има супресивна активност върху тези клетки. Ние предположихме, че може да е възможно да се елиминират GAD65-специфични В клетки от пациенти с диабет тип 1, като се използват химерни молекули, съдържащи анти-CD35 антитяло, свързани с пептиди, наподобяващи GAD65 В / Т епитопи. Очаква се тези молекули да свързват селективно анти-GAD65 специфичните В клетки чрез съвместно омрежване на имуноглобулиновия рецептор и CD35 и да подават супресивен сигнал. За изграждането на двете химери са използвани два синтетични пептида, получени от протеин GAD65 (епитопи GAD65) и анти-CD35 моноклонално антитяло. Имуномодулиращата активност на конструираните антитела е тествана *in vitro*, като се използват мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC) от пациенти с диабет тип 1. Намаляване на броя на анти-GAD65 IgG секретирани антитела плазмени клетки и увеличен процент на апоптотични В лимфоцити се наблюдава след третиране на тези PBMCs с конструираните антитела. Изградените химерни молекули са способни селективно да модулират активността на GAD65-специфични В лимфоцити и производството на анти-GAD65 IgG аутоантитела чрез съвместно омрежване на инхибиторния CD35 и В-клетъчния антигенен рецептор (BCR). Това лечение представлява възможен подход за промяна на аутоимунната природа на тези клетки.

14. Helix pomatia hemocyanin - a novel bio-adjuvant for viral and bacterial antigens.

Gesheva V, Chausheva S, Stefanova N, Mihaylova N, Doumanova L, Idakieva K,
Tchorbanov A.

Int Immunopharmacol. 2015 May;26(1):162-8. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.03.011

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 plasmacytes 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

Гешева В., Чаушева С., Стефанова Н., Михайлова Н., Думанова Л., Идакиева К.,
Чорбанов А.

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. Тесвързват 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* (НРН) като биоадювант, комбиниран със стандартни антигени. За имунизация беше използван пречистен НРН, комбиниран с IP пептид от хемаглутинин на инфлуенца вирус или комбиниран с тетаничен токсид (ТТ). Приемът на тетаничния токсид, комбиниран с НРН, доведе до увеличаване на броя на анти-ТТ IgG продуциращи плазмоцити, както и до значимо повишаване на В-и Т-клетъчната пролиферация. Нивото на анти-ТТ IgG в антисыворотни миши серуми бе сравнено 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. Заключение: Ваксинирането на мишки демонстрира, че НРН е потенциален биоадювант за ваксини и може да бъде използван като естествен адювант или за пренос на пептиди.

15. Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma.

Gesheva V, Chausheva S, Mihaylova N, Manoylov I, Doumanova L, Idakieva K,
Tchorbanov A.

BMC Immunol. 2014 Aug 29;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 a 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.

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

Гешева В., Чаушева С., Михайлова Н., Манойлов И., Думанова Л., Идакиева К., Чорбанов А.

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. Теса 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 намалки 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. Имунизираният 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. Заключение: Хемоцианините се използват при терапии на рак на пикочния мехур и миши модел на меланома. 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, Rapanathomasiana, Helixromatia, хемоцианини, анти-туморна активност

16. New fluorogenic dyes for analysis of cellular processes by flow cytometry and confocal microscopy

Nikolova K, Kaloyanova S, **Mihaylova N**, Stoitsova S, Chausheva S, Vasilev A, Lesev N, Dimitrova P, Deligeorgiev T, Tchobanov A. J.

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2013 Dec 5;129:125-34 DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.10.010>.

Abstract

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 10^{-9} 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 флуорогенни багрила за анализ на клетъчни процеси чрез поточна
цитометрия и конфокална микроскопия**

Николова К, Калоянова С, Михайлова Н, Стоицова С, Чаушева С, Василев А, Лесев Н,
Димитрова П, Делигеоргиев Т, Чорбанов А.

Резюме

Флуоресцентната микроскопия и флуоресцентното изобразяване чрез поточна цитометрия са две от най-бързо развиващите се области в медицинските и биологични изследвания. Иновациите във флуоресцентната химия и синтеза на нови багрилни сонди са тясно свързани с развитието на сервизно оборудване като източници на светлина и техники за откриване. Сред съединенията, известни като флуоресцентни вещества, багрилата на основата на цианин са станали широко използвани, тъй като имат високи коефициенти на възбуждане, тесни емисионни ленти и висока флуоресценция при свързване с нуклеинови киселини.

Ключовите методи за оценка на апоптозата и клетъчния цикъл позволяват измерване на съдържанието на ДНК чрез няколко поточни цитометрични техники.

Ние синтезирахме нови монометин цианинови багрила и характеризирахме тяхната приложимост за оцветяване на живи и / или апоптотични клетки. Проведени са и експерименти с образна цитометрия и конфокална лазерна сканираща микроскопия (CLSM). Две от оцветителите са показали свързване с висок афинитет към ядрата при високи разреждания, до 10^{-9} М. Поточната цитометрия и CLSM потвърждават, че тези оцветители са маркирани селективно неживи, напр. етанол-фиксираны клетки, което ги прави подходящи за оценка на клетъчната жизнеспособност и апоптоза. Новите структури се оказаха подходящи и за анализ на клетъчния цикъл.

17. Generation of gene-engineered chimeric DNA molecules for specific therapy of autoimmune diseases

Gesheva V, Szekeres Z, Mihaylova N, Dimitrova I, Nikolova M, Erdei A, Prechl J,
Tchorbanov A.

Hum Gene Ther Methods. 2012 Dec;23(6):357-65 DOI:

<https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.051>.

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the development of self-reactive B and T cells and autoantibody production. In particular, double-

stranded DNA-specific B cells play an important role in lupus progression, and their selective elimination is a reasonable approach for effective therapy of SLE. DNA-based vaccines aim at the induction of immune response against the vector-encoded antigen. Here, we are exploring, as a new DNA-based therapy of SLE, a chimeric DNA molecule encoding a DNA-mimotope peptide, and the Fv but not the immunogenic Fc fragment of an FcγRIIb-specific monoclonal antibody. This DNA construct was inserted in the expression vector pNut and used as a naked DNA vaccine in a mouse model of lupus. The chimeric DNA molecule can be expressed in eukaryotic cells and cross-links cell surface receptors on DNA-specific B cells, delivering an inhibitory intracellular signal. Intramuscular administration of the recombinant DNA molecule to lupus-prone MRL/lpr mice prevented increase in IgG anti-DNA antibodies and was associated with a low degree of proteinuria, modulation of cytokine profile, and suppression of lupus nephritis.

Генериране на генно - инженерни химерни ДНК молекули за специфична терапия на автоимунни заболявания

Вера Гешева, Зузана Шекерес, Николина Михайлова, Илияна Димитрова, Мария Николова, Анна Ердей, Йозеф Прехл и Андрей Чорбанов

Резюме

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е автоимунно заболяване, характеризиращо се с развитието на автореактивни В и Т клетки и производството на автоантитела. По-специално, двуверижните ДНК-специфични В клетки играят важна роля в прогресията на лупуса и тяхното селективно елиминиране е разумен подход за ефективна терапия на SLE. Базираните на ДНК ваксини имат за цел индуциране на имунен отговор срещу антигена, кодиран от вектора. Тук изследваме, нова ДНК-базирана терапия на SLE, химерна ДНК молекула, кодираща ДНК-мимотопен пептид, и Fv, но не и имуногенния Fc фрагмент на специфично за FcγRIIb моноклонално антитяло. Тази ДНК конструкция беше вмъкната в експресионния вектор pNut и използвана като ДНК ваксина в миши модел на лупус. Химерната ДНК молекула може да бъде експресирана в еукариотни клетки и да омрежва клетъчни повърхностни рецептори на ДНК-специфични В клетки, доставяйки инхибиращ вътреклетъчен сигнал. Интрамускулното приложение на рекомбинантната ДНК молекула на предразположени към лупус MRL / lpr мишки, предотвратява увеличаването на IgG анти-ДНК антителата и е свързано с ниска степен на протеинурия, модулация на цитокиновия профил и потискане на лупусния нефрит.

18. Modulation of the immune response using *Rapana thomasiana* hemocyanin

Andrey Tchorbantov, Krassimira Idakieva, **Nikolina Mihaylova**, Lyuba Doumanova

International Immunopharmacology; 2008; 8; 1033-1038. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.008>

Abstract

We have investigated the non-specific immunostimulatory and specific immunomodulatory effects of hemocyanin from marine gastropod *Rapana thomasiana* (RtH). The purified RtH, its structural subunits RtH1 and RtH2 and a construct with influenza virus hemagglutinin intersubunit peptide (IP) were used in immunization protocols of Balb/c mice. Antibody formation against RtH, RtH1, RtH2, RtH-IP as well as anti-RtH IgG antibody isotypes were determined by ELISA. The immune homology between both subunits and the whole RtH molecule was investigated by cross-blotting technique. The retaining of the B-cell epitope of IP, coupled to the RtH was recognised by Western blot. The results obtained demonstrate that the immunization with RtH or its subunits in experimental models resulted in strong immune response *in vivo*. Common epitope of influenza A virus hemagglutinin jointed to RtH results in generation of molecule with increased immunogenicity. Our results are the first demonstration that RtH and/or its subunits could be used in different immunization protocols as an adjuvant or as a protein-carrier.

Модулиране на имунния отговор с помощта на хемоцианин изолиран от *Rapana thomasiana*

Андрей Чорбанов, Красимира Идакиева, Николина Михайлова, Люба Думанова

Резюме

Изследвахме неспецифичните имуностимулиращи и специфични имуномодулиращи ефекти на хемоцианин изолиран от морски коремоноги *Rapana thomasiana* (RtH). Balb / мишки бяха имунизирани с пречистеният RtH, неговите структурни субединици RtH1 и RtH2 и комплекс от RtH с хемаглутинови пептид (IP) от грипен вирус. Образуването на антитела срещу RtH, RtH1, RtH2, RtH-IP, както и изотипите на анти-RtH IgG антитела бяха изследвани чрез ELISA. Имулната хомология между двете субединици и цялата RtH молекула беше изследвана чрез крос-блот техника. Запазването на В-клетъчния епитоп на IP, свързан с RtH, беше установено чрез Western blot. Получените резултати показват, че имунизацията с RtH или неговите субединици в експериментални модели води до

силен имунен отговор *in vivo*. Общият епитоп на хемаглутинин на грип А вирус, свързан с RтН, води до генериране на молекула с повишена имуногенност. Нашите резултати са първата демонстрация, че RтН и / или неговите субединици могат да се използват в различни имунизационни протоколи като адювант или като протеинов носител.

19. New biotechnological approaches for immunotherapy of autoimmune diseases

Nikolina Mihaylova and Andrey Tchorbanov

Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 2011, 25(4), Suppl., 24-29 DOI:

<https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0130>.

ABSTRACT

In many physiological processes peptides play a critical role as neurotransmitters, hormones, antibiotics, etc. They have research importance in fields such as immunology, pharmacology, neuroscience and cell biology. There are many approaches for immunotherapies: some of them use peptides as important components of chimeric molecules for immunosuppression, the others, as peptide-based vaccines for immunostimulation. These immunotherapeutic strategies offer the advantages of being safe, easy to produce, devoid of oncogenic potential, and can be chemically or genetically engineered into defined conformational active form. The peptides contain a very important functional part called epitope, which is recognized by the immune system, specifically by antibodies, B or T cell receptors. Epitopes play a prominent role in peptide-based vaccines and disease diagnosis. Protein engineered or genetically engineered peptides conjugated to an antibody-carrier could be used as a targeting device delivering the epitopes to the cells of interest.

**НОВИ БИОТЕХНОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ЗА ИМУНОТЕРАПИЯ НА
АВТОИМУННИ БОЛЕСТИ**

Николина Михайлова, Андрей Чорбанов

Резюме

В много физиологични процеси пептидите играят критична роля като невротрансмитери, хормони, антибиотици и др. Те имат научно значение в области като имунология, фармакология, неврология и клетъчна биология. Има много подходи за имунотерапия: някои от тях използват пептиди като важни компоненти на химерни молекули за

имуносупресия, а други като пептидни ваксини за имуностимулация. Тези имунотерапевтични стратегии предлагат предимствата да бъдат безопасни, лесни за производство, лишени от онкогенен потенциал и могат да бъдат химически или генетично проектирани в определена конформационна активна форма. Пептидите съдържат много важна функционална част, наречена епитоп, която се разпознава от имунната система, по-специално от антителата, В или Т клетъчните рецептори. Епитопите играят важна роля в пептидните ваксини и диагностиката на заболяванията. Протеино-инженерни или генно-инженерни пептиди, конюгирани с антияло- носител, могат да се използват като насочващо устройство, доставящо епитопите до таргетните клетки.

20. Inflammation-induced enhancement of IgG immunoreactivity

N. M. Mihaylova, J. D. Dimitrov, I. K. Djoumerska-Alexieva and T. L. Vassilev

Inflammation Research; 57; 2008; 1–3. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6213-4>.

Abstract

Natural polyreactive IgG antibodies are found in the sera of all healthy individuals. The in vitro exposure of pooled human IgG to protein-destabilizing chemical or physical factors has been previously shown to result in the exposure of their "hidden" polyspecificity. We hypothesize that such an enhancement of their pre-existing immunoreactivity may occur in vivo in the aggressive microenvironment of inflammation sites. An increase in the antigen binding intensity as well as of the number of recognized antigens was observed in the sera of IgG-infused immunodeficient SCID mice with induced local inflammation. The expansion of the IgG pathogen-binding repertoire may have important biological consequences.

Индуцирано от възпаление повишаване на IgG имунореактивност

Н. М. Михайлова, Й. Д. Димитров, И. К. Джумерска-Алексиева и Ч. Л. Василев

Резюме

Естествените полиреактивни IgG антитела се откриват в серума на всеки здрави индивиди. По-рано е доказано, че in vitro въздействието на протеин- дестабилизираци химични или физични фактори върху пул от човешки IgG, води до разкриване на тяхната „скрита“ полиспецифичност. Предполагаме, че подобно подобряване на съществуващата им имунореактивност може да се случи in vivo в агресивната микросреда на възпалителните места. Увеличение на интензивността на свързване към антигена, както

и на броя на разпознатите антигени се наблюдава в серумите на IgG-инжектирани имунодефицитни SCID мишки с индуцирано локално възпаление. Разширяването на IgG репертоара, свързващ патогена, може да има важно биологично значение.

21. Suppression of Disease-Associated B Lymphocytes by GAD65 Epitope-Carrying Protein-Engineered Molecules in a Streptozotocin-Induced Mouse Model of Diabetes

Iliyan Konstantinov Manoylov, Gabriela Valentinova Boneva, Irini Atanas Doytchinova, Nikolina Mihaylova Mihaylova, and Andrey Ivanov Tchobanov

Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy, 2019, Volume 38, Number 5

DOI: [10.1089/mab.2019.0030](https://doi.org/10.1089/mab.2019.0030)

Abstract

Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune syndrome defined by the presence of autoreactive T and B cells, which results in destruction of insulin-producing beta cells. Autoantibodies against GAD65 (glutamic acid decarboxylase 65)-a membrane-bound enzyme on pancreatic beta cells, contribute to beta cells' destruction and the loss of pancreatic functions. Mouse FcγRIIb on B lymphocytes possesses an inhibitory effect on the activity of these cells. We hypothesized that it may be possible to suppress GAD65-specific B cells in mice with diabetes using chimeric molecules, containing an anti-FcγRIIb antibody, coupled to peptide B/T epitopes derived from the GAD65 protein. With these engineered chimeras, we expect to selectively co-cross-link the anti-GAD65-specific B cell receptor (BCR) and FcγRIIb, thus delivering a suppressive signal to the targeted B cells. An anti-FcγRIIb monoclonal antibody and two synthetic peptide epitopes derived from the GAD65 molecule were used for chimeras' construction. The suppressive activity of the engineered molecules was tested in vivo in mice with streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes. These chimeric molecules exclusively bind disease-associated B cells by recognizing their GAD65-specific BCR and selectively deliver a strong inhibitory signal through their surface FcγRIIb receptors. A reduction in the number of anti-GAD65 IgG antibody-secreting plasmocytes and an increased percentage of apoptotic B lymphocytes were observed after treatment with protein-engineered antibodies of mice with STZ-induced type 1 diabetes.

Потискане на свързани с болестта В лимфоцити чрез GAD65-носещи протеинови инженерни молекули, в стрептозотоцин-индуциран миши модел на диабет

Илиян Константинов Манойлов, Габриела Валентинова Бонева, Ирини Атанас Дойчинова, Николина Михайлова Михайлова и Андрей Иванов Чорбанов

Резюме

Захарният диабет тип 1 е автоимунен синдром, дефиниран с наличието на автореактивни Т и В клетки, което води до унищожаване на произвеждащите инсулин бета клетки. Автоантителата срещу GAD65 - мембранно свързан ензим върху бета-клетките на панкреаса, допринасят за разрушаването на бета-клетките и загубата на панкреатичните функции. Миши FcγRIIb върху В лимфоцити притежава инхибиторен ефект върху активността на тези клетки. Ние предположихме, че е възможно да се потиснат GAD65-специфични В клетки при мишки с диабет, използвайки химерни молекули, съдържащи анти-FcγRIIb антитяло, свързано с пептидни В / Т епитопа, получени от протеина GAD65. Очакваме селективно едновременно свързване на анти-GAD65 специфичните В-клетъчни рецептори (BCR) и FcγRIIb, като по този начин се задейства потискащ сигнал към прицелните В-клетки. За изграждането на химерите бяха използвани анти-FcγRIIb моноклонално антитяло и два синтетични пептидни епитопа, получени от молекулата GAD65. Потискащата активност на конструираните молекули беше тествана *in vivo* при мишки със стрептозотоцин (STZ) - индуциран диабет тип 1. Тези химерни молекули свързват изключително болестотворни В клетки, като разпознават техните GAD65-специфични BCR и селективно доставят силен инхибиторен сигнал чрез техните повърхностни FcγRIIb рецептори. Намаляване на броя на анти-GAD65 IgG-секретиращите антитела плазмоцити и повишен процент на апоптотични В лимфоцити са наблюдавани след терапия с конструираните химерни антитела при мишки със стрептозотоцин (STZ) - индуциран диабет тип 1.

22. Serum anti-alpha-elastin antibodies in patients with ankylosing spondylitis in depending on the sex.

Bogdanova M., Tchobanov A., Velkova A., Stephanova K., Mihaylova N., Kostova N., and Baydanoff S.

Ревматология 2006, 14 (4), 14-17. ISSN: 13100505

Summary:

The aim of this study is to assess whether significant differences exist between serum levels of anti-alpha-elastin antibodies (AEAbs) from class IgM, IgG and IgA in males with ankylosing spondylitis (AS) and those in healthy males, as well as between AEAbs in AS females and those in healthy females. The current study comprises 18 patients (mean age 45,8 yrs.; 41-50 yrs.; 13 males and 5 females) admitted to Dispensary of Rheumatology of Diagnostic Consulting Centre II, Pleven and 10 healthy persons (41-50 yrs.; 7 males and 3 females). The serum levels of IgM, IgG and IgA AEAbs were determined using enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). IgA AEAbs were elevated in AS men by comparison with those of the healthy males ($p < 0,05$). IgM AEAbs were elevated in AS women by comparison with those of the healthy females ($p < 0,05$). Significant differences exist between serum levels of IgA AEAbs in AS males and those in healthy males, as well as between IgM AEAbs in AS females and those in healthy females aged 41 – 50 years.

СЕРУМНИ АНТИ-АЛФА-ЕЛАСТИНОВИ АНТИТЕЛА ПРИ ПАЦИЕНТИ С АНКИЛОЗИРАЩ СПОНДИЛИТ В ЗАВИСИМОСТ ОТ ПОЛА

М. Богданова, А. Чорбанов, А. Велкова, Кр. Стефанова, Н. Михайлова, Н. Костова и Ст. Байданов

Резюме

Представеното проучване има за цел да изследва дали съществуват сигнификантни разлики в серумните нива на анти-алфа-еластинови антитела (АЕАт) от клас ИгМ, ИгГ и ИгА между болни мъже с анкилозиращ спондилит (АС) и здрави мъже, както и между болни жени с това заболяване и здрави жени. Проучването обхваща 18 болни (средна възраст 45,8 г.; 41-50 г.; 13 мъже и 5 жени; продължителност на заболяването най-малко 2 г.), диспансеризирани в Ревматологичен кабинет на ДКЦ II – Плевен и 10 здрави лица (41-50 г.; 7 мъже и 3 жени). Серумните нива на ИгМ, ИгГ и ИгА АЕАт са измерени чрез ензимно – свързан имуносорбентен анализ (ELISA). ИгА АЕАт са по-високи при мъжете

с АС в сравнение с тези на здравите мъже ($p < 0,05$). ИгМ АЕАт са по – високи при жените с АС в сравнение с тези на здравите жени ($p < 0,05$). Сигнификантни разлики съществуват в серумните нива на ИгА АЕАт между мъжете с АС и здравите мъже и на ИгМ АЕАт между болните жени и здравите жени на възраст между 41-50 г.

**23. BOOK CHAPTER Gastropods: Diversity, Habitat and Genetics
/Rapana Thomasiana Hemocyanin as a Protein Carrier and Adjuvant of Bacterial and
Viral Vaccines/**

K. Idakieva, V. Gesheva, N. Mihaylova, L. Doumanova, A. Tchobanov;
NOVA publisher, 2011; ISBN: 978-1-61324-817-1.

Abstract

The hemocyanins (Hcs) are a multigene family of giant extracellular copper proteins which serve as oxygen carriers in the blood of many mollusks. Their large molecular size (4 to 8 MDa), xenogenic character and carbohydrate content have been implicated in inducing strong immune response in mammals. Many of the vaccines that are in use today consist of mainly killed viruses and microbial agents, or, alternatively - viral subunits or bacterial toxoids. Unfortunately, killed viral vaccines and bacterial toxoids are weakly immunogenic. Recent approaches in the practical immunology involve the use of different highly immunogenic molecules for non-specific immunomodulation (as adjuvants) or for active specific immunostimulation (as protein carrier covalently bound to specific antigen). Among them are the hemocyanins - extracellular type-3 copper proteins occurring freely dissolved in the hemolymph of many arthropod and mollusc species. The use of Hcs from different sources as carriers of haptens and peptides for production of monoclonal antibodies and as carriers of vaccines against infectious diseases is generally accepted. Hcs have been applied also as adjuvants in immunocompetent tests and as experimental antigens in studies of the immune system. Living marine snails *Rapana thomasiana* were caught near Bulgarian coast of west part of Black Sea. The hemocyanin isolated from *Rapana thomasiana* (RtH) is built from two structural subunits, RtH1 and RtH2. It has been shown that the structural subunits RtH1 and RtH2 are closely related and both correspond immunologically to KLH2, one of the two hemocyanin isoforms of the gastropod *Megathura crenulata*. Based on this structural similarity, a logical conclusion is that the hemocyanin of *Rapana thomasiana* will have strong adjuvant immunostimulatory effect as well as it would be possible to use RtH as a protein carrier and vaccine adjuvant. In the present study

we investigated the adjuvant properties of hemocyanin isolated from marine gastropod *Rapana thomasiana* as well as its use for protein-carrier of a viral peptide (common epitope of influenza A virus hemagglutinin). An immunization with Influenza vaccine or tetanus toxoid combined with RtH in mice induced an anti-influenza cytotoxic response (CTL) lasting at least 5 months and an antibody response to viral proteins. We demonstrated also its high immunogenicity as a single model antigen and its properties as a strong protein carrier for viral peptides from Influenza hemagglutinin. The results obtained demonstrate that RtH is acceptable as a potential bio-adjuvant for subunit bacterial and viral vaccines.

**ГЛАВА КНИГА Гастроподи: разнообразие, местообитания и генетика
/Хемоцианин от *Rapana Thomasiana* като протеинов носител и адювант на
бактериални и вирусни ваксини/**

К. Идакиева, В. Гешева, Н. Михайлова, Л. Думанова, А. Чорбанов;

Резюме

Хемоцианините (Hcs) са разнообразно в генетично отношение семейство от гигантски извънклетъчни медни протеини, които служат като кислородни носители в кръвта на много мекотели. Техният голям молекулен размер (4 до 8 MDa), ксеногенен характер и съдържание на въглехидрати са допринесени за предизвикване на силен имунен отговор при бозайници. Много от ваксините, които се използват днес, се състоят от предимно убити вируси и микробни агенти, или като алтернатива - вирусни субединици или бактериални токсосоиди. За съжаление убитите вирусни ваксини и бактериални токсосоиди са слабо имуногенни. Последните подходи в практическата имунология включват използването на различни силно имуногенни молекули за неспецифична имуномодулация (като адюванти) или за активна специфична имуностимулация (като протеинов носител, ковалентно свързан със специфичен антиген). Сред тях са хемоцианините - извънклетъчни медни протеини тип 3, срещащи се свободно разтворени в хемолимфата на много видове членестоноги и мекотели. Общоприето е използването на Hcs от различни източници като носители на хаптени и пептиди за производството на моноклонални антитела и като носители на ваксини срещу инфекциозни заболявания. Hcs се прилагат също като адюванти при имунокомпетентни тестове и като експериментални антигени при изследвания на имунната система. Живи морски охлюви

Rapana thomasiana са уловени край българското крайбрежие на западната част на Черно море. Хемоцианинът, изолиран от *Rapana thomasiana* (RtH), е изграден от две структурни субединици, RtH1 и RtH2. Доказано е, че структурните субединици RtH1 и RtH2 са тясно свързани и двете отговарят имунологично на KLH2, една от двете изоформи на хемоцианина на гастропода *Megathura crenulata*. Въз основа на това структурно сходство, логичен извод е, че хемоцианинът на *Rapana thomasiana* ще има силен адювантен имуностимулиращ ефект, както и би било възможно да се използва RtH като протеинов носител и ваксинален адювант. В настоящото изследване ние изследвахме адювантните свойства на хемоцианина, изолиран от морския гастропод *Rapana thomasiana*, както и използването му за протеин-носител на вирусен пептид (общ епитоп на хемаглютинин на грипен вирус А). Имунизацията с грипна ваксина или тетаничен токсид, комбинирана с RtH при мишки, индуцира противогрипна цитотоксична реакция (CTL) с продължителност най-малко 5 месеца и отговор на антитела срещу вирусни протеини. Демонстрирахме също така високата му имуногенност като единичен модел антиген и свойствата му като силен протеинов носител за вирусни пептиди от грипен хемаглютинин. Получените резултати показват, че RtH е приемлив като потенциален биоадювант за субединични бактериални и вирусни ваксини.