

На правах рукописи

Степанов Алексей Вячеславович

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ-КИЛЛЕРОВ
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ В-КЛЕТОК**

Специальность 03.01.03 – «молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2013

Работа выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научные руководители: Кандидат химических наук
Белогуров Алексей Анатольевич
Доктор биологических наук
Пономаренко Наталья Александровна

Официальные оппоненты: Доктор химических наук
Уткин Юрий Николаевич.
Доктор биологических наук
Купраш Дмитрий Владимирович.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук.

Защита состоится «27» июня 2013 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Автореферат разослан __ _____ 2013 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук

Олейников В. А.



I. ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы.

Рассеянный склероз - это хроническое воспалительное нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы с неизвестной этиологией. Патогенез данного заболевания включает в себя повреждение миелиновой оболочки нервных волокон, что приводит к постепенной утрате различных функций центральной нервной системы, связанных с физическим и психоэмоциональным состоянием больного. Более миллиона человек болеет рассеянным склерозом во всем мире. Основную роль в патологическом процессе демиелинизации аксонов отводят Т- и В-клеткам, специфичным к компонентам миелиновой мембраны. Список потенциальных аутоантигенов постоянно расширяется и включает в себя различные белки, ассоциированные с мембраной олигодендроцитов. Аутореактивные лимфоциты, специфичные к данным белкам, совместно с макрофагами проникают через гематоэнцефалический барьер и индуцируют процессы воспалительной демиелинизации в ЦНС.

Вопреки впечатляющему массиву клинических, иммунологических и биохимических данных, а также частично изученным молекулярным механизмам, лежащим в основе возникновения и развития заболевания, на сегодняшний день не существует лекарства, способного полностью остановить патологические процессы при рассеянном склерозе. Препараты, имеющиеся в распоряжении врачей, могут лишь снизить частоту и тяжесть обострений, а также замедлить темпы накопления неврологического дефицита, что подтверждается данными магнитно-резонансной томографии головного и спинного мозга.

Таким образом, дальнейшее совершенствование существующих подходов или же разработка новых перспективных методов терапии рассеянного склероза является задачей первостепенной важности.

Цель работы и основные задачи исследования.

Цель данной работы заключалась в разработке подходов антиген-специфичной терапии, включающих в себя индукцию иммунотолерантности, а также селективную элиминацию аутореактивных В-клеток, специфичных к миелиновым антигенам.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Определение и сравнительный анализ иммунодоминантных фрагментов ОБМ при рассеянном склерозе и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.
2. Создание композиций иммунодоминантных фрагментов ОБМ, инкапсулированных в однослойные маннозилированные липосомы, и последующая терапия экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс линии DA.

3. Создание панели белков-киллеров, способных к специфической элиминации В-клеток, на основе барназы, каталитических доменов псевдомонадного и шига-подобного токсинов, а также константных доменов иммуноглобулинов мыши и человека. Сравнительный анализ функциональной активности созданных молекул и выбор наилучшего цитотоксического агента.
4. Направленная элиминация аутореактивных В-клеток *in vivo* у мышей линии SJL полученными белками-киллерами на основе иммунодоминантного фрагмента ОБМ и выбранного цитотоксического агента.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В настоящей работе впервые были определены иммунодоминантные по В-клеточному ответу фрагменты основного белка миелина (ОБМ) у пациентов с рассеянным склерозом (РС) в сравнении с рядом животных моделей, развивающих экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). Совместное введение данных пептидов в составе маннозилированных однослойных липосом в DA крыс с ЕАЕ показало существенное снижение общего течения заболевания, значительно ускорило полное восстановление животных и привело к подавлению демиелинизационного процесса. При терапии липосомированными пептидами ОБМ было обнаружено снижение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИФН γ , а также стимуляция секреции нейротропного фактора мозга в ЦНС. Полученные результаты послужили основой для дальнейшего продвижения разработанных композиций в качестве перспективного лекарственного средства для терапии рассеянного склероза, которое на сегодняшний день находится на второй стадии клинических испытаний.

В процессе выполнения работы была создана панель селективных белков-киллеров В-клеток на основе РНКазы барназы, каталитических доменов псевдомонадного токсина и шига-подобного токсина *E.coli*, а также константных доменов иммуноглобулинов мыши и человека. После *ex vivo* экспериментов, проведенных на модельных системах, были отобраны наиболее перспективные цитотоксические молекулы на основе барназы и константного домена иммуноглобулина. Заключительный эксперимент, проведенный *in vivo* на мышах линии SJL с индуцированным ЕАЕ, подтвердил значительный терапевтический потенциал константного домена иммуноглобулина мыши, слитного с иммунодоминантным фрагментом ОБМ. Двукратное внутривенное введение данной молекулы приводило к полному подавлению популяции В-клеток, специфичных к выбранным на первом этапе фрагментам ОБМ. Полученные данные могут служить основой для дальнейшего получения препаратов антиген-специфичной терапии, способных не только купировать обострение, но и существенно облегчить течение рассеянного склероза.

Публикация и апробация работы.

По теме работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в список ВАК. Результаты работы были представлены на 4 конференциях: Biocatalysis 2009: Fundamentals & Applications, (2007, Архангельск); Российская школа молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии», (2010, Казань); V Российский симпозиум «Белки и пептиды», (2011, Петрозаводск); Научная конференция «X чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова», (2011, Москва);

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 107 страницах и содержит 36 рисунков и 7 таблиц.

II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Сравнительный анализ иммунодоминантных фрагментов ОБМ при рассеянном склерозе и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

Для анализа специфичности сывороточных аутоантител использовали созданную ранее эпитопную библиотеку фрагментов ОБМ, слитных с белком-носителем тиоредоксином (Рис. 1). Каждый белок эпитопной библиотеки содержал белок-носитель тиоредоксин (Тгх), один из 12 взаимно перекрывающихся фрагментов ОБМ, а также мус эпитоп. Для подтверждения работоспособности созданной библиотеки эпитопов, очищенные белки разделяли в 12% ПААГ, а затем, после переноса на нитроцеллюлозную мембрану, гибридизовали с анти-мус и анти-ОБМ антителами (Рис. 1).

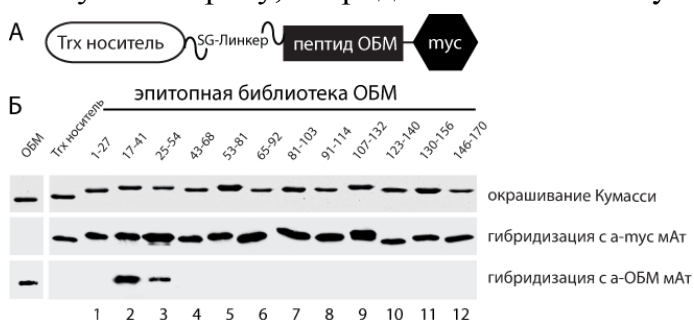


Рис. 1. Схематическое изображение эпитопной библиотеки фрагментов ОБМ, слитных с белком-носителем тиоредоксином. Электрофоретический анализ белков эпитопной библиотеки в 12% ПААГ, окрашенный Кумасси. Вестерн-блот анализ белков эпитопной библиотеки с контрольными анти-мус и анти-ОБМ антителами.

После проведенной верификации библиотека эпитопов была использована для дальнейшего тестирования сывороточных аутоантител из пациентов с РС и грызунов с индуцированным ЕАЕ (Рис. 2). Наличие перекрывающихся последовательностей ОБМ в составе белков эпитопной библиотеки позволяет более точно детерминировать предположительный эпитоп аутореактивных В-клеток. В результате анализа полученных данных у мышей линии C57BL/6 был обнаружен один иммунодоминантный эпитоп ОБМ₁₂₄₋₁₄₇, в то время как у мышей линии SJL/J и у крыс линии DA два (ОБМ₂₄₋₄₄, ОБМ₇₂₋₁₃₉ и ОБМ₄₀₋₆₀, ОБМ₁₀₇₋₁₇₀ соответственно). У пациентов с рассеянным склерозом были выявлены три иммунодоминантных эпитопа: ОБМ₄₂₋₆₅, ОБМ₈₄₋₁₀₀ и ОБМ₁₁₅₋₁₇₀, что оказалось в значительной степени схоже с данными по связыванию аутоантител, полученных из DA крыс (Рис.

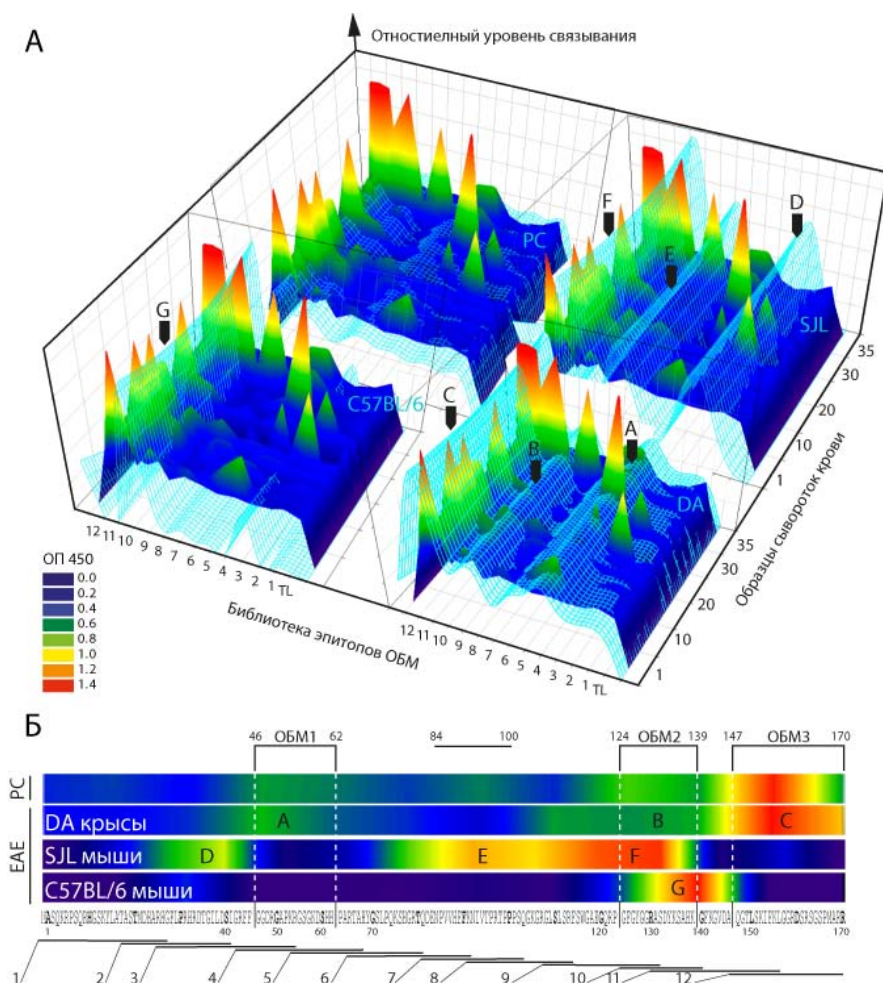
2Б). На основе первичного скрининга для дальнейшего изучения подходов по индукции толерантности и направленной элиминации В-клеток были выбраны крысы линии DA и мыши линии SJL, соответственно.

Для формирования аутоантител у крыс DA с ЕАЕ не только к С-концевой последовательности, но и к иммунодоминантному фрагменту ОБМ₈₃₋₁₀₄, а также для получения более стабильно воспроизводимой модели ЕАЕ, для дальнейших иммунизаций нами был выбран пептид ОБМ₆₃₋₈₁. Образцы крови, полученные у крыс, иммунизированных ОБМ₆₃₋₈₁, были проанализированы на наличие связывания аутоантител с ОБМ и его фрагментами в составе эпитопной библиотеки (Рис. 3А). В результате данного эксперимента были обнаружены 3 иммунодоминантные последовательности ОБМ: MDHARHGFLPRH, QDENPVVHFFKNIV и IFKLGGRDSRSGSPMARR.

Для количественной оценки аффинности сывороточных аутоантител, полученных из DA крыс с ЕАЕ, к выбранным фрагментам ОБМ нами были произведены измерения констант диссоциации аутоантител методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе ViaCore T-200. Анализ полученных данных показал, что константа диссоциации сывороточных аутоантител составляет $2 \cdot 10^{-8}$ М в случае ОБМ как лиганда, $1 \cdot 10^{-8}$ М для энцефалитогенного и $0.8 \cdot 10^{-8}$ М для С-концевого фрагмента ОБМ. Константу диссоциации процесса взаимодействия аутоантител с пептидом MDHARHGFLPRH посчитать не представлялось возможным (Рис. 3Б). В конечном

итоге для дальнейшего создания действующих композиций антиген-специфической терапии,

Рис. 2. А) Индивидуальный профиль связывания сывороточных аутоантител, изолированных из пациентов с РС (градиентная окраска) в сравнении со здоровыми донорами (верхняя левая панель) и грызунами с индуцированным ЕАЕ (мыши SJL, крысы линии DA, мыши линии C57BL/6; по часовой стрелке, начиная с правой верхней панели). Профили сравнения представлены голубым сетчатым полем). Б) Интегральная специфичность сывороточных аутоантител в каждой из исследуемых групп. Латинскими буквами А-Г отмечены обнаруженные иммунодоминантные фрагменты ОБМ. Цифрами 1- 12 обозначены перекрывающиеся фрагменты ОБМ в составе эпитопной библиотеки.



индуцирующих иммунотолерантность, нами были отобраны следующие пептиды: ОБМ₄₆₋₆₂ (ОБМ1), ОБМ₁₂₄₋₁₃₉ (ОБМ2) и ОБМ₁₄₇₋₁₇₀ (ОБМ3).

При анализе сывороточных аутоантител, выделенных из мышей линии SJL с ЕАЕ, индуцированным ОБМ, уровень гибридизации с 7 фрагментом оказался значительно выше по сравнению с 6 и 8 фрагментами библиотеки эпитопов ОБМ (Рис. 2). Можно предположить, что основной сайт связывания с сывороточными антителами включает в себя полностью последовательность пептида 7 (TQDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPS), а связывание с 6 и 8 фрагментами объясняется взаимодействием с С-концевой последовательностью 6 пептида (QDENPVVHFFK) и N-концевой последовательностью 8 пептида (FKNIIVTPRTPPPSQG). Помимо центральной части ОБМ, высокий уровень сигнала ИФА был обнаружен для 10 пептида ОБМ.

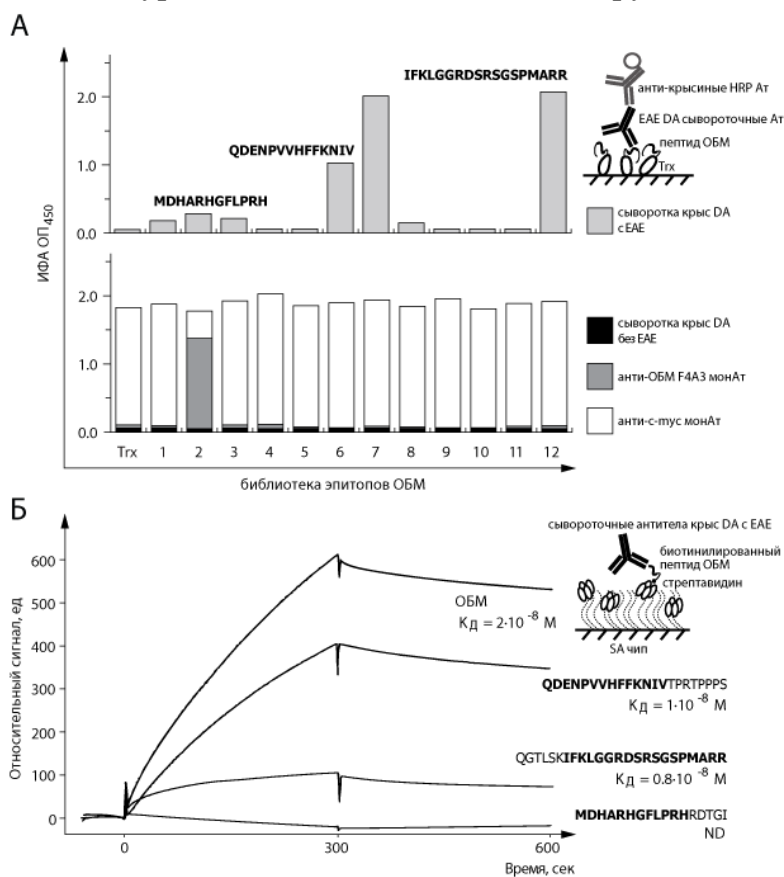


Рис. 3. Анализ специфичности и аффинности поликлональных аутоантител изолированных из DA крыс, иммунизированных пептидом ОБМ₆₃₋₈₁. А) Гибридизация с белками эпитопной библиотеки ОБМ сывороточных антител, выделенных из крыс DA с индуцированным ЕАЕ. Б) Измерение констант диссоциации поликлональных антител из крыс DA с индуцированным ЕАЕ по отношению к ОБМ и его иммунодоминантным фрагментам.

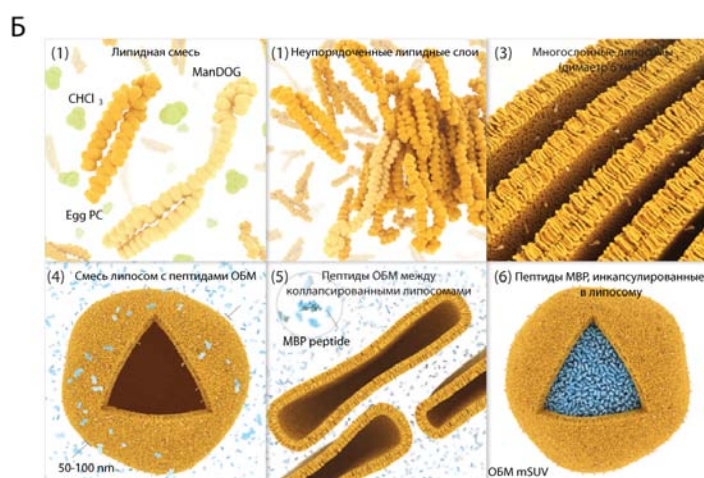
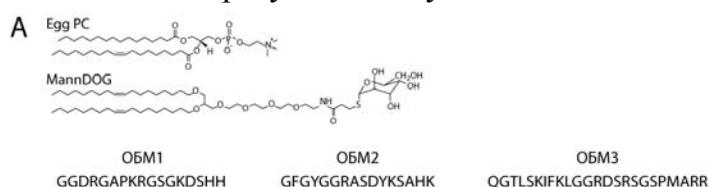
Аналогично крысам линии DA мы провели оптимизацию протокола и в случае индукции ЕАЕ у мышей линии SJL. Для этого в качестве основного нейроантигена был использован гомогенат спинного мозга мыши (ГСММ). Известно, что при индукции ЕАЕ ГСММ у SJL, по сравнению с ОБМ, про-

исходит более интенсивное развитие симптомов заболевания. Данный способ индукции приводит к более воспроизводимой модели данной патологии. При индукции ЕАЕ у мышей SJL с применением ГСММ, профиль специфичности аутоантител к ОБМ в большей степени совпадает с сыворотками больных рассеянным склерозом. Так как при индукции ЕАЕ у мышей SJL с помощью ГСММ наибольший титр анти-ОБМ антител формируется к иммунодоминантному фрагменту ОБМ (QDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPSQG), данная аминокислотная последовательность была интегрирована в состав рекомбинантных молекул, способных селективно элиминировать аутореактивные В-клетки. Белки-киллеры, содержащие фрагмент 11 ОБМ (RASDYKSANKGFKGVDAQGTLSKIFKL), к которому не наблюдается формирования аутоантител, были использованы в качестве отрицательного контроля.

Создание липосом, содержащих инкапсулированные фрагменты ОБМ.

Для повышения эффективности антиген-специфичной терапии отобранные ранее иммунодоминантные пептиды ОБМ были инкапсулированы в однослойные липосомы (SUV), несущие остатки маннозы на своей поверхности. Основное преимущество данной композиции заключается в том, что немодифицированные иммунодоминантные пептиды представлены в нативном виде внутри липосомы, в то время как маннозные остатки на ее поверхности обеспечивают адресную доставку липосомных наноконтейнеров в антиген-представляющие клетки (АПК).

Липосомы состояли из смеси L- α -фосфатидилхолина (Egg PC) с мономаннозил диолеил глицерином DOG (MannDOG) (Рис. 4А) в молярном соотношении 100 к 1. Процесс получения наноконтейнеров включал в себя следующие этапы (Рис. 4Б): (1-2) Формирование неупорядоченных липидных слоев при выпаривании органического растворителя с последующей первичной регидратацией, приводящей к формированию многослойных липосом. (3) Обработка липосом высоким давлением с образованием однослойных липосом. (4) Криосушка однослойных липосом с добавленными пептидами. В результате осуществления данной стадии пептиды оказывались распо-



ложены между сжатыми однослойными липосомами. (5) Инкапсуляция пептидов в однослойные липосомы размера 60-100 нм, содержащих 1% маннозных остатков на своей поверхности, происходит во время вторичной регидратации.

Рис. 4. Схема создания наноконтейнеров с инкапсулированными фрагментами ОБМ. А) Химические формулы липидов Egg PC и MannDOG, использованных для создания липосом. Аминокислотные последовательности пептидов ОБМ1, ОБМ2 и ОБМ3, использованных для создания липосомальных композиций. Б) Процесс получения липосомных наноконтейнеров.

Для подтверждения преимущества доставки пептидов в составе маннозилированных липосом по сравнению с липосомами без остатков маннозы, были созданы липосомные композиции полипептида, содержащего последовательность мус-эпитопа: мус mSUV и мус SUV (индекс m означает наличие маннозы). Далее полученные липосомы в различных концентрациях инкубировали 2 часа с дендритными клетками, изолированными из крови крысы. После этого клетки отмывали, лизировали и далее осветленный гомогенат переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Количество мус пептида, интернализованного в дендритные клетки, в зависимости от изначальной концентрации липосом и наличия или отсутствия маннозы на их поверхности анализировали гибридизацией с анти-мус антителами. Для определе-

ния эквивалентности количества нанесенных клеточных лизатов мембрану дополнительно гибридизовали с антителами, специфичными к актину (Рис. 5А). Интенсивность сигнала после окрашивания была оценена денситометрически на приборе VersaDoc (BioRad) (Рис. 5Б). Как видно из Рис. 5, количество тус пептида в клеточном лизате после инкубации дендритных клеток с тус-содержащими маннозилированными mSUV липосомами заметно выше, чем при инкубации с тус SUV. Данное наблюдение подтверждает более высокую эффективность захвата дендритными клетками маннозилированных липосом, по сравнению с не маннозилированными.

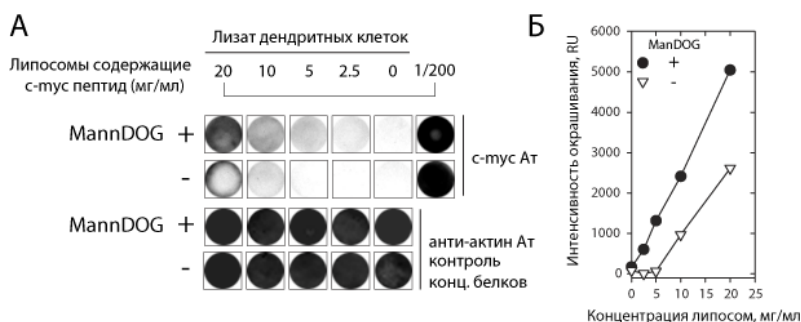


Рис. 5. Сравнение эффективности интернализации полипептида, содержащего тус эпитоп, в составе липосом с MannDOG и без. А) Гибридизация клеточного лизата дендритных клеток с антителами к тус эпитопу и актину. Б) Денситометрический анализ количества интернализированного тус пептида.

Антиген-специфичная иммуномодулирующая терапия ЕАЕ у крыс линии DA пептидами ОБМ, инкапсулированными в липосомы.

Для проведения дальнейших экспериментов были созданы четыре варианта различных композиций липосом, включающих в себя как индивидуально каждый из трех пептидов, так и эквимолярную смесь пептидов для изучения потенциального синергетического эффекта. Для изучения терапевтических свойств полученных формуляций мы проводили подкожные инъекции пептидов в составе липосом крысам линии DA с индуцированным ЕАЕ (Рис. 6А). В качестве положительного и отрицательного контроля нами были использованы терапевтический препарат Сорахоне (синтетический сополимер L-аминокислот Glu, Lys, Ala и Tyr) и липосомы, не содержащие пептиды ОБМ, соответственно. Терапию начинали в момент проявления первых клинических признаков развития заболевания. В группе животных, которым вводили пустые липосомы, наблюдалась наибольшая смертность (3/20), один смертельный случай был зарегистрирован в группе ОБМ2 mSUV (1/23), в остальных группах смертельных случаев зафиксировано не было (Табл. 1).

Табл. 1. Средние максимальная и кумулятивная степень развития ЕАЕ у крыс линии DA при введении различных липосомальных композиций в сравнении с Сорахоне и контрольной группой.

Инъекции	Количество животных в группе	Средняя максимальная степень развития заболевания (IQR ³)	Средняя кумулятивная степень развития заболевания (IQR ³)	Количество летальных исходов
без терапии	20	3 (0.5)	22 (12.5)	3/20
ОБМ1 mSUV	22	2 (1) ¹	17 (5.5) ¹	0/22
ОБМ2 mSUV	23	3 (0.75) ²	17.5 (26.75) ²	1/23
ОБМ3 mSUV	25	3 (0) ²	15 (11) ²	0/25
ОБМ1/2/3 mSUV	24	3 (0.75) ¹	14 (5.25) ¹	0/24
Сорахоне	22	2 (1.25) ¹	18.5 (12.5) ²	0/22
ОБМ1	21	3 (0.5) ²	19.5 (22) ²	1/21

¹p<0.05 статистически достоверное различие в сравнении с отрицательным контролем; дисперсионный анализ для непараметрической статистики методом Вилкоксона. ²p>0.05 статистически недостоверное различие в сравнении с отрицательным контролем; дисперсионный анализ для непараметрической статистики методом Вилкоксона. ³Интерквартильное значение.

Из данных таблицы 1 следует, что в группах животных, которым вводили ОБМ1 mSUV, ОБМ 1/2/3 mSUV и Сорахоне, наблюдалось максимальное статистически достоверное снижение уровня развития заболевания. Введение ОБМ1 mSUV эффективно подавляло развитие заболевания на начальной стадии (Рис. 6Б), в то время как пептиды ОБМ2 и ОБМ3 снижали уровень развития заболевания на стадии вторичного обострения (Рис. 6Б). Совместное введение пептидов ОБМ1/2/3 значительно снижало степень развития симптомов ЕАЕ на всех стадиях, о чем свидетельствует самое низкое во всех группах значение средней кумулятивной степени развития заболевания (Табл. 1; Рис. 6В). Применение Сорахоне (Рис. 6) оказалось близким по эффективности к действию смеси ОБМ1/2/3 в составе липосом. Основным преимуществом терапии инкапсулированными пептидами ОБМ над Сорахоне является полное восстановление крыс после проведения терапии. Как и ожидалось, введение пептида ОБМ1 без предварительной инкапсуляции в липосомы значительно снижает его терапевтический эффект (Рис. 6), что свидетельствует о важности использования процесса липосомирования в предложенном подходе.

Для подтверждения терапевтического эффекта созданных композиций из каждой экспериментальной когорты нами было отобрано по одному животному со средним профилем развития ЕАЕ, характерным для каждой группы (Рис. 7А). Криосрезы спинного мозга отобранных животных были обработаны красителем гемактоксилин-эозин (Рис. 7Б) для визуализации процессов глиозиса и демиелинизации в ЦНС (в баллах от 0 до 3). В результате проведенного гистологического анализа было подтверждено изначальное наблюдение, свидетельствующее об эффективности ОБМ2 по подавлению пиковой тяжести заболевания. Из рисунка 17 очевидно, что ОБМ1 и ОБМ2, в свою очередь, ускоряют выход животных на стадию полного выздоровления.

Дополнительно в опытных группах нами были сопоставлены титры сывороточных антител к полноразмерному ОБМ и его иммунодоминантным фрагментам ОБМ₈₁₋₁₀₃ и ОБМ₁₄₆₋₁₇₀. При введении композиций ОБМ1 mSUV, ОБМ1/2/3 mSUV и Сорахоне, в сравнении с контрольной группой, наблюдалось значительное снижение титра антител к ОБМ и его фрагментам (Рис. 8). Несмотря на то, что иммунодоминантный фрагмент ОБМ₈₁₋₁₀₃ не был включен в состав ни одной из липосомных композиций, следует отметить снижение уровня аутоантител к данному эпитопу в сыворотках леченых крыс. Одновременно с понижением титра аутоантител введение ОБМ1 mSUV, ОБМ1/2/3 mSUV и Сорахоне крысам DA с ЕАЕ значительно снижает присутствие в ЦНС провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИФН γ , а также повышает концентрацию нейротрофического фактора головного мозга (НФГМ), ответственного за развитие нейронов (Рис. 9). Эти данные находятся в соответствии с гистологическими срезами спинного мозга, окрашенными красителем luxol fast blue, который визуализирует повреждения миелиновой оболочки аксонов.

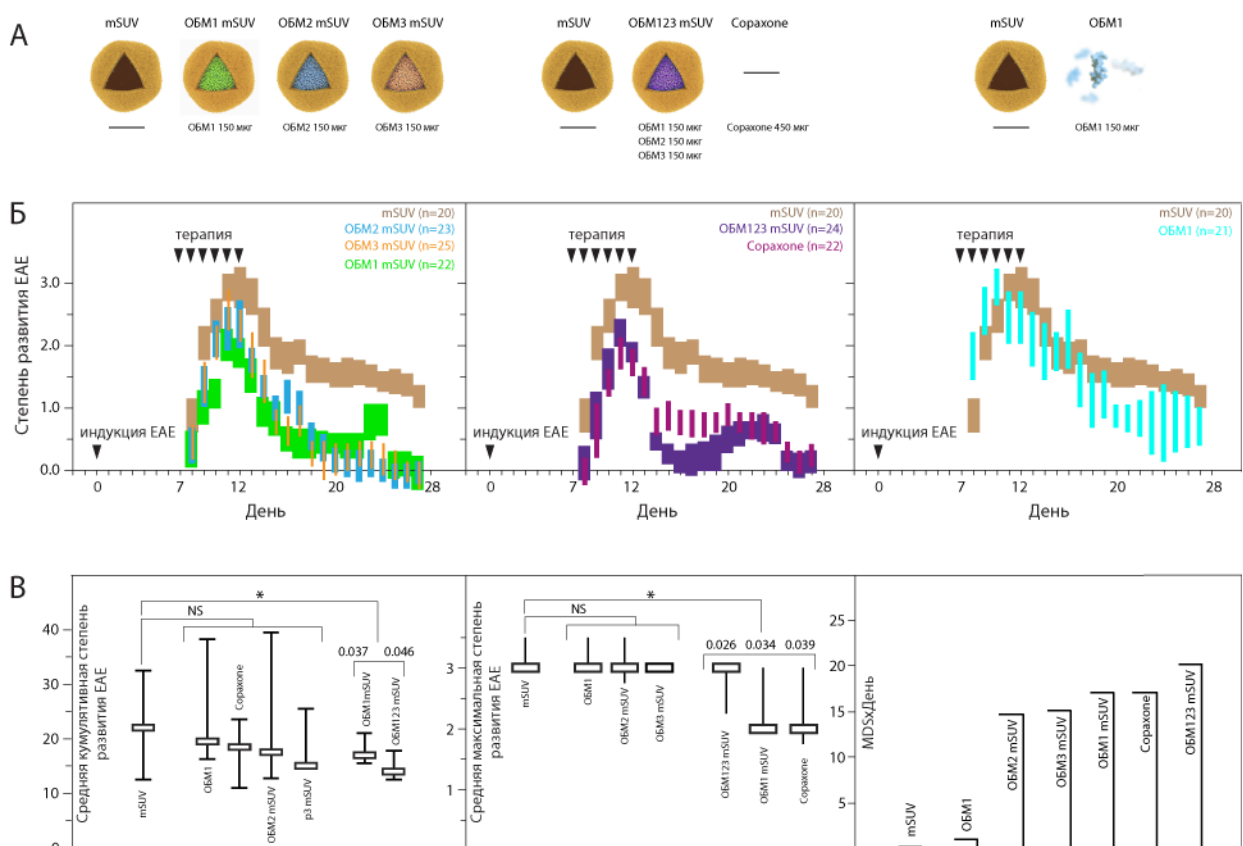


Рис. 6. Терапия экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита в крысах линии DA иммунодоминантными пептидами ОБМ, инкапсулированными в липосомы. А) Схематическое изображение вводимых композиций с указанием состава и количества инкапсулированных пептидов. Б) Экспериментальные группы животных оценивали по усредненной степени развития симптомов заболевания. В) Сравнительный анализ средней кумулятивной и средней максимальной степени развития EAE у DA крыс в различных экспериментальных группах (В, левая и средняя панель, соответственно). Сопоставление интегральной терапевтической эффективности (произведение тяжести развития заболевания на дни) пептидов ОБМ в составе липосом по сравнению с контролем (В, левая панель).

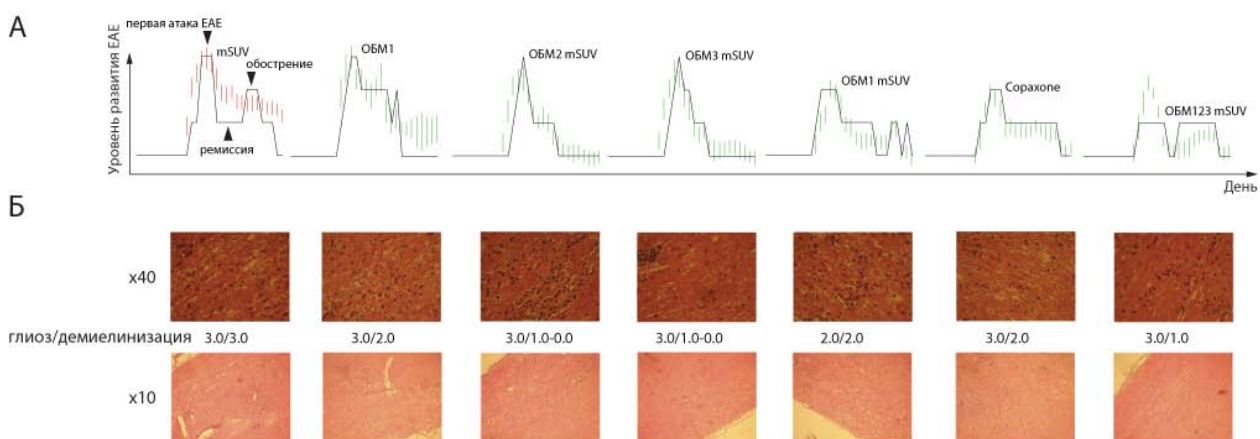


Рис. 7. А) Из каждой экспериментальной группы было выбрано животное с профилем развития EAE (сплошная линия), наиболее приближенным к среднему профилю по всей группе (продольные зеленые и красные линии). Б) Гистологический анализ повреждений в ЦНС у крыс DA с индуцированным EAE в различных экспериментальных группах.

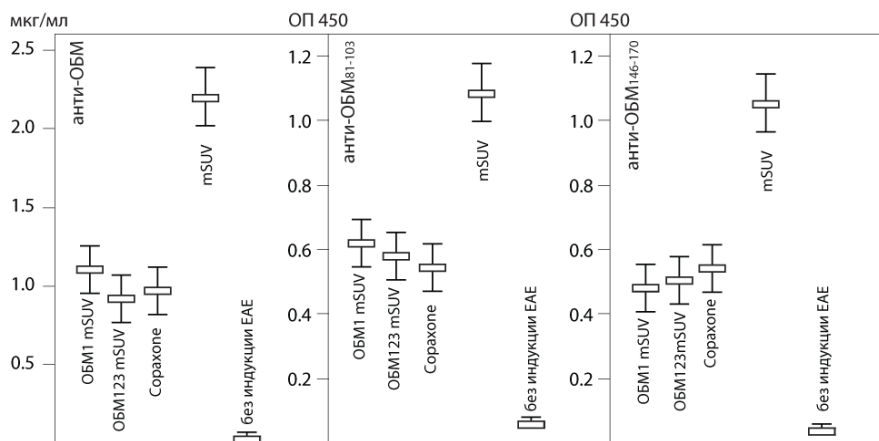


Рис. 8. Сравнение титра сывороточных аутоантител к полноразмерному ОБМ и его иммунодоминантным фрагментам ОБМ₈₁₋₁₀₃ и ОБМ₁₄₆₋₁₇₀ у крыс линии DA с ЕАЕ, подвергнутых терапии, в сравнении животными из контрольной группы с ЕАЕ без лечения и интактных животных.

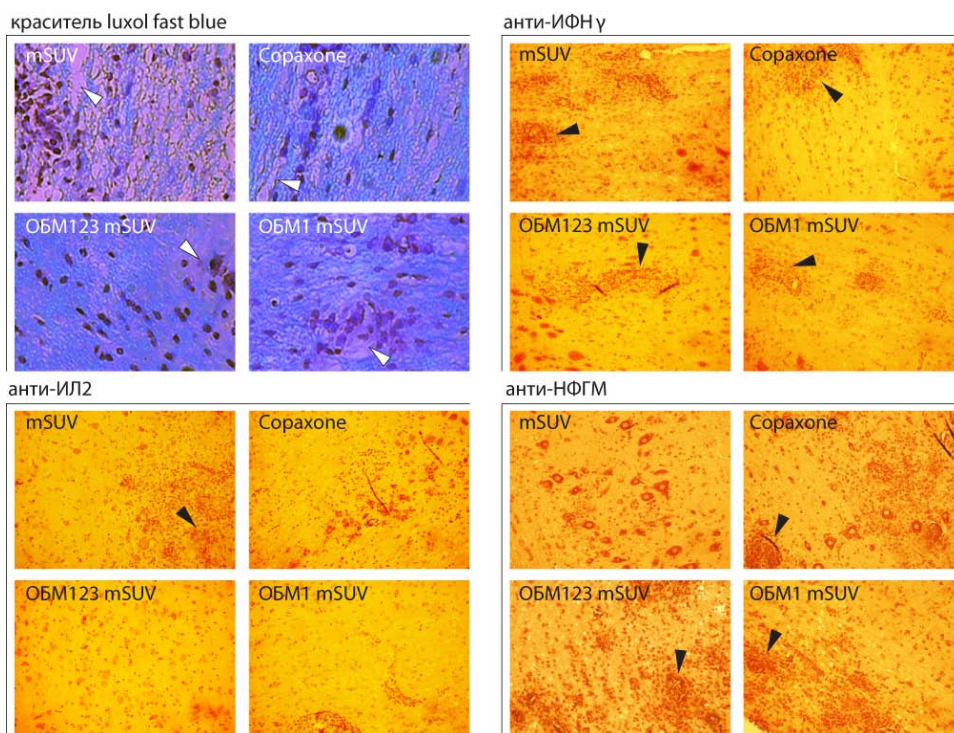


Рис. 9. Гистологические срезы спинного мозга крыс DA из групп mSUV, Сораконе, ОБМ1 mSUV и ОБМ123 mSUV. Для выявления повреждений миелиновой оболочки аксонов использовали краситель luxol fast blue. Гибридизация срезов с антителами, специфичными к ИФН γ , ИЛ-2 и НФГМ, для определения цитокинового статуса ЦНС.

Таким образом, в настоящей работе нам удалось впервые определить иммунодоминантные фрагменты ОБМ при развитии ЕАЕ у крыс линии DA. На основании проведенных экспериментов были отобраны пептиды ОБМ для создания препаратов антиген-специфичной терапии ЕАЕ. Совместное введение данных пептидов в составе маннозилированных однослойных липосом существенно снижает общее течение заболевания, улучшает выход опытных животных из стадии обострения, подавляет демиелинизацию, а также снижает уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИФН γ и стимулирует секрецию нейротропного фактора мозга в ЦНС. Наши данные свидетельствуют, что введение пептидов ОБМ в составе маннозилированных липосом способствует увеличению терапевтического эффекта вследствие экспонированных остатков маннозы. Так как АПК имеют на своей поверхности большое количество маннозных рецепторов, адресная доставка антигена в этом случае проходит наиболее эффективно. В нашем исследовании липосомы вводили подкожно, поэтому представляется маловероятным, что они могли проникнуть через гематоэнцефалический барьер

в ЦНС. Предположительно, после интернализации фрагменты ОБМ презентуются на поверхности АПК в составе МНС II класса, после чего происходит стимуляция образования популяции регуляторных клеток, способных проникать через ГЭБ и подавлять аутореактивные клетки (Рис. 10).

Полученные результаты послужили основой для дальнейшего продвижения разработанных композиций в качестве перспективного лекарственного средства для терапии рассеянного склероза, которое на сегодняшний день находится во второй стадии клинических испытаний.

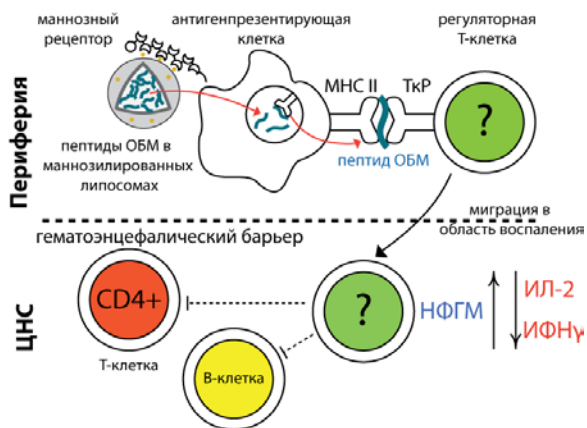
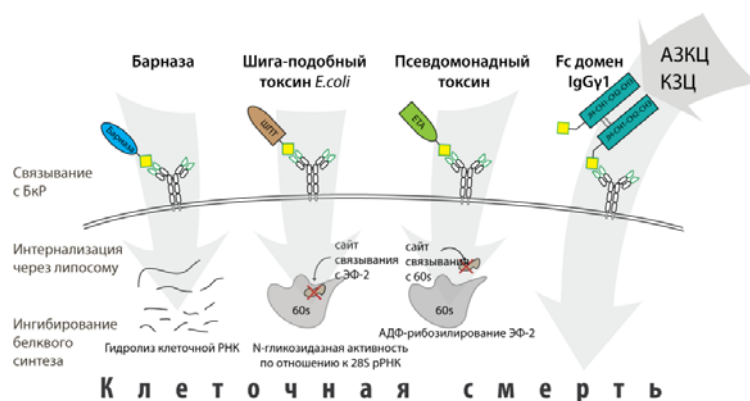


Рис. 10. Предположительный механизм терапевтического действия пептидов ОБМ, инкапсулированных в маннозилированные липосомы.

Направленная элиминация В-клеток белками-киллерами.

Вторым перспективным направлением разработки препаратов для лечения РС является создание цитотоксических молекул высокой избирательности, способных направленно удалять популяцию аутореактивных В-клеток с заранее известной специфичностью. Молекулы данного класса состоят из двух функциональных частей – цитотоксического агента и сигнальной последовательности, направляющей белок-киллер к клетке-мишени.

В результате анализа литературных данных в качестве цитотоксической составляющей белков-киллеров были выбраны: РНКаза барназа, каталитические домены псевдомонадного токсина (ETA) и шига-подобного токсина (*E.coli*) (ШПТ), а также константный домен иммуноглобулина мыши и человека (Fc домен IgG).



псевдомонадного токсина (ETA) и шига-подобного токсина *E.coli* (ШПТ), а также константный домен иммуноглобулина мыши и человека (Fc домен IgG).

Рис. 11. Схематическое изображение выбранных механизмов специфической элиминации В-клеток.

Таким образом, нами был отобран ряд цитотоксических белков-киллеров, каждый из которых приводит к гибели клетки-мишени по различному механизму (Рис. 11).

Для сравнения эффективности различных цитотоксических молекул и подтверждения работоспособности предложенной концепции, нами были созданы ре-

комбинантные молекулы на основе барназы, ЕТА, ШПТ и Fc домена IgG, слитные с сигнальной последовательностью – пептидом, содержащим тус эпитоп (CEQKLISEEDL) (Рис. 12 и Рис. 13). В свою очередь, в качестве модельной линии В-клеток была выбрана гибридома С-МУС, имеющая на своей поверхности БкР, специфичный к тус эпитопу. Сравнительный анализ эффективности цитотоксических агентов на модельной системе С-МУС позволил выбрать лучший агент для дальнейшей элиминации природных антиген-специфичных В-клеток при ЕАЕ.

Создание генетических конструкций рекомбинантных белков-киллеров.

Для получения генетической конструкции, кодирующей рекомбинантный шига-подобный токсин *E.coli*, слитный с тус эпитопом, была использована геномная ДНК *E.coli* штамма серотипа O157:H7, которую любезно предоставили Скрябин К.Г. и Равин Н.В. Источником нуклеотидной последовательности Fc домена человеческого антитела класса IgG γ 1 послужил вектор pBudCE4.1/CMV LeadH, созданный ранее в нашей лаборатории, в который была дополнительно интегрирована последовательность тус эпитопа (Рис. 12). Генетические конструкции, кодирующие барназу и псевдомонадный токсин, слитных с тус эпитопом (Рис. 12), были любезно предоставлены заведующим лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН д.б.н. чл-корр. РАН профессором Деевым С.М.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков-киллеров.

Полученные генетические конструкции были использованы для препаративной наработки рекомбинантных белков-киллеров в клетках *E.coli*.

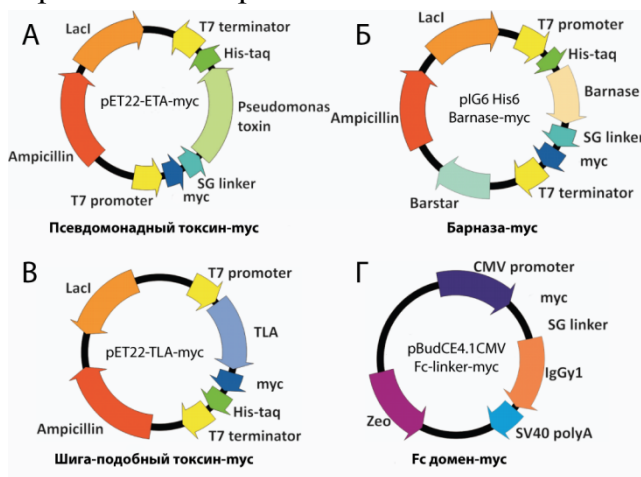


Рис. 12. Карты генетических конструкций, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие рекомбинантный псевдомонадный токсин А), барназу Б), шига-подобный токсин *E.coli* В) и константный домен иммуноглобулина человека Г), слитных с тус эпитопом.

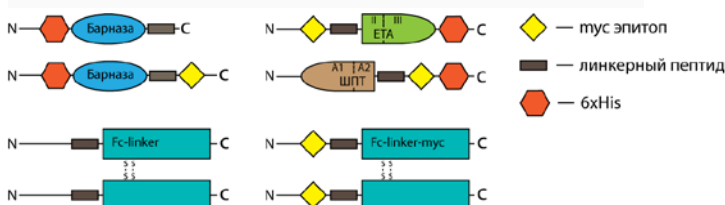


Рис. 13. Схематическое изображение структуры созданных белков-киллеров В-клеток.

Так как молекулы барназы-тус, ЕТА-тус и ШПТ-тус содержали в своем составе 6-ти гистидиновый кластер (Рис. 13), то качестве первой стадии очистки белков из клеточных лизатов применяли металлохелатную хроматографию, с последующей финальной очисткой на гель-фильтрационной колонке Superdex75.

Для получения стабильной линии клеток, продуцирующих рекомбинантную молекулу Fc-linker-*mys* и контрольную молекулу Fc-linker, клетки линии CHO трансфицировали методом липофекции с помощью набора Lipofectamine LTX (Invitrogen) генетическими конструкциями pBudCE4.1CMV LeadH-linker-c-*mys* и pBudCE4.1CMV LeadH-linker соответственно. Fc-содержащие молекулы очищали из ростовой среды методом аффинной хроматографии на смоле с иммобилизованным G белком и далее на гель-фильтрационной колонке Superdex200. После очистки наличие рекомбинантного белка нужного размера определяли с помощью электрофоретического разделения очищенных фракций в 12% ПААГ по Лэммли и окраской красителем Кумасси (Рис. 14А).

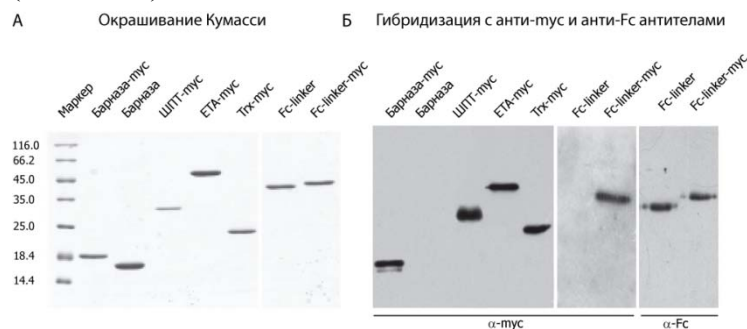


Рис. 14.
А) Электрофоретический анализ степени гомогенности очищенных молекул.
Б) Гибридизация рекомбинантных молекул с анти-*mys* и анти-Fc антителами.

Анализ функциональной активности полученных белков-киллеров.

Все очищенные рекомбинантные белки были протестированы на наличие *mys* эпитопа гибридизацией с моноклональными анти-*mys* антителами, методом иммуноблоттинга по Вестерну с использованием моноклональных антител к *mys* эпитопу (Рис. 14Б).

Функциональную активность выделенных рекомбинантных белков на основе барназы подтверждали инкубацией с РНК в отсутствие и с добавлением ингибитора РНКазы А. Было показано, что барназа эффективно гидролизует дрожжевую РНК, при этом ингибитор РНКазы А не оказывает ощутимого влияния на ее ферментативную активность (Рис. 15).

Для анализа эффективности подавления трансляции *in vitro* созданными иммунотоксинами, различные концентрации рекомбинантной барназы, псевдомонадного и шига-подобного токсинов добавляли к S30 экстракту клеток мышинового асцита, содержащего экзогенную мРНК, кодирующую люциферазу светлячка. После чего измеряли люциферазную активность (Рис. 16).

Для подтверждения функциональной активности рекомбинантных Fc в формате ИФА была определена степень их связывания с C1q компонентом системы комплемента в сравнении с полноразмерными антителами (Рис. 17).

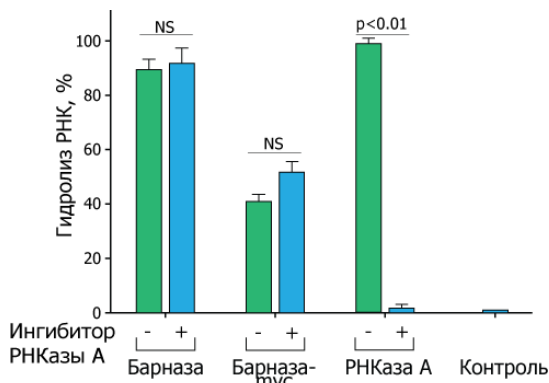


Рис. 15. РНК-гидролизующая активность рекомбинантных молекул барназы и барназы-мус.

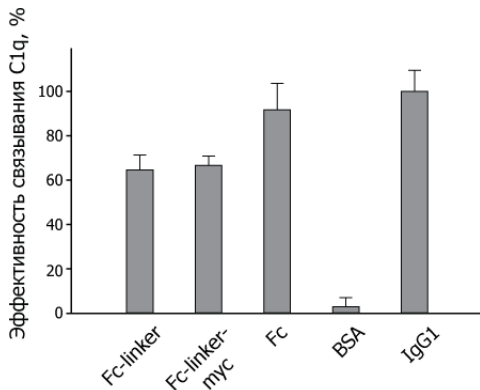


Рис.17. Связывание C1q компонента системы комплемента рекомбинантными молекулами Fc-linker и Fc-linker-с-мус.

Исследование цитотоксических свойств белков-киллеров ex vivo.

Для сравнения цитотоксического потенциала полученных иммунотоксинов выделенные рекомбинантные белки инкубировали с гибридной линией клеток С-МУС, в качестве отрицательного контроля применяли гибридную линию клеток 1В4F4, не несущую на своей поверхности анти-мус БкР.

Согласно полученным данным были построены кривые зависимости процента живых клеток в зависимости от концентрации цитотоксических молекул (Рис. 18). В качестве отрицательного контроля для молекул барназа-мус и Fc-linker-мус использовали молекулы барназы и Fc-linker, не содержащих мус эпитопа (Рис. 18Б,Г).

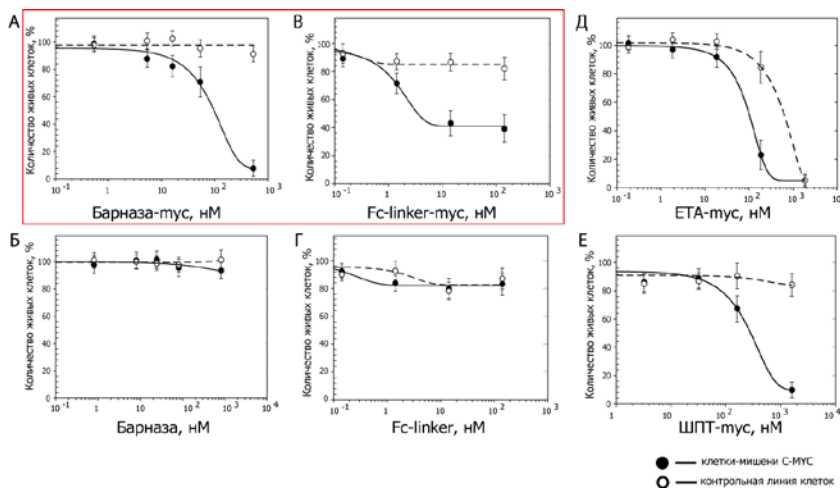


Рис. 18. Зависимость процента выживших клеток С-МУС (сплошная линия) и 1В4F4 (пунктирная линия) от концентрации рекомбинантных белков-киллеров. Время инкубации 72 часа.

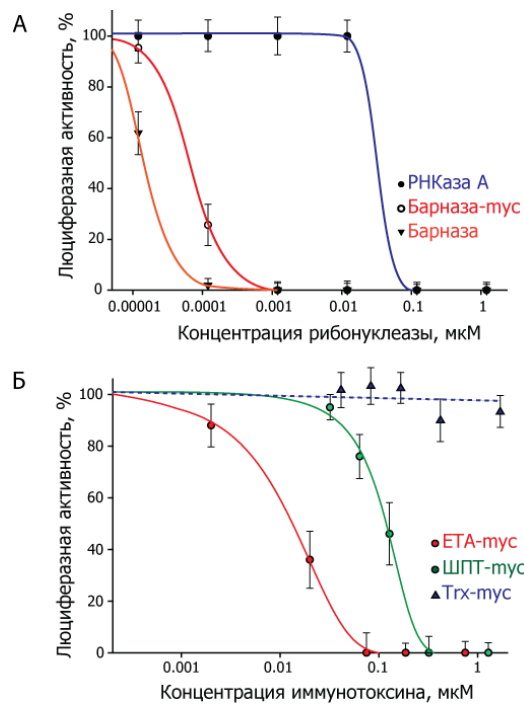


Рис. 16. Влияние барназы, барназы-мус А), псевдомонадного и шига-подобного токсинов Б) на трансляцию люциферазы в клеточном экстракте.

Анализ функциональной активности панели рекомбинантных белков-киллеров, проведенной на модельных клетках С-МҮС, продемонстрировал высокую степень специфической цитотоксичности созданных молекул. На основании полученных результатов была определена LD₅₀ рекомбинантных иммунотоксинов для клеток линии С-МҮС (Табл. 2). Наиболее сильным цитотоксическим действием обладал рекомбинантный псевдомонадный токсин, однако данная молекула продемонстрировала и наиболее высокую неспецифическую цитотоксичность. Шига-подобный токсин показал средние показатели специфичности и цитотоксичности на модельных клетках. Поэтому для дальнейшей работы нами были выбраны белки-киллеры на основе барназы и Fc домена антитела, так как они показали наименьшую степень неспецифического цитотоксического действия, и эффективно элиминировали клетки-мишени (Табл. 2).

Табл. 2. Значения LD₅₀ действия полученных иммунотоксинов на модельную линию клеток С-МҮС.

Рекомбинантная молекула	Наличие мус эпитопа	LD ₅₀ для клеток линии С-МҮС
псевдомонадный токсин	+	0,05 мкМ
шига-подобный токсин <i>E.coli</i>	+	0,44 мкМ
барназа	+	0,11 мкМ
	-	> 10 мкМ
Fc домен IgGγ1	+	~0.002 мкМ
	-	> 10 мкМ

Селективная элиминация целевых В-клеток в культуре спленоцитов.

В дальнейшем для достоверного подтверждения разрабатываемой концепции нами был предложен ряд дополнительных экспериментов на нативных В-клетках.

Для идентификации мус-специфичных В-клеток был создан химический конъюгат БСА-ФИТЦ-мус (Рис. 19).

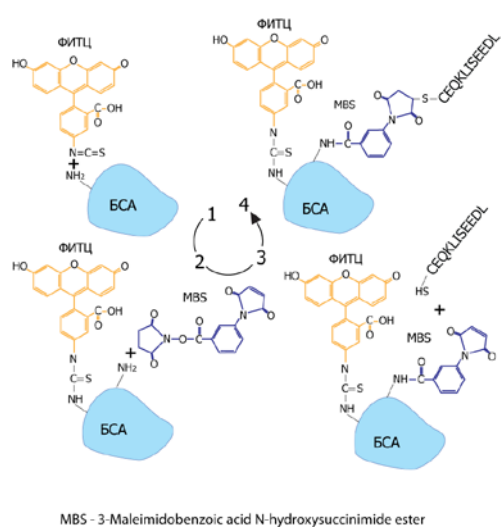


Рис 19. Схематическое изображение получения молекулы БСА-ФИТЦ-мус.

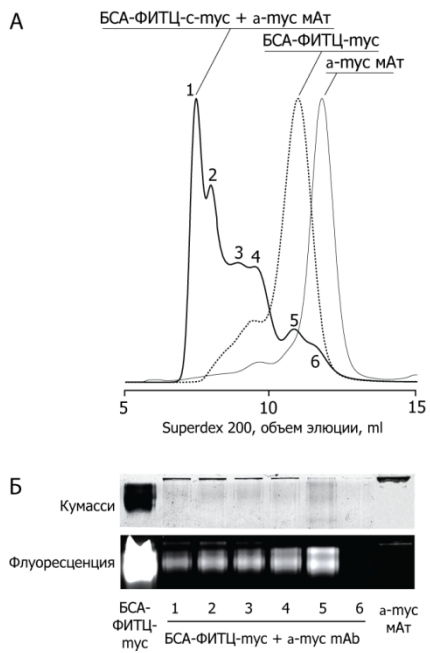


Рис. 20. Подтверждение функциональной активности молекулы БСА-ФИТЦ-мус.
А) Изменения профиля хроматографии молекулы БСА-ФИТЦ-мус после гибридизации с анти-мус антителами по сравнению с контрольными разделениями.
Б) Анализ хроматографических фракций в ПААГ на наличие флуоресцентной группы в составе белковых молекул.

В результате проведенного анализа было подтверждено, что созданный конъюгат взаимодействует с анти-тус антителами и несет на себе флуоресцентные группы (Рис. 20). Подобные свойства могут быть использованы для визуализации популяции тус-специфичных В-клеток при анализе на проточном цитофлуориметре.

У мышей линии BALB/c стимулировали иммунный ответ к тус пептиду путем их иммунизации химически конъюгированным белком KLN-тус. Через 3 недели после иммунизации из селезенки опытных мышей была получена культура спленоцитов, содержащая популяцию В-клеток, специфичных к тус эпитопу. В качестве основных подходов для анализа эффективности действия иммунотоксинов применяли два метода: проточная цитофлуориметрия и анализ концентрации суммарных и тус-специфических антител. Для подсчета процента тус-специфичных В-клеток выделенные спленоциты инкубировали с молекулой БСА-ФИТЦ-тус и анти-B220-АПС антителами (B220 – поверхностный маркер В-клеток, eBioscience), после чего клетки анализировали на проточном цитофлуориметре FACSDiva (BD). В результате проведенных экспериментов, нами было показано наличие В-клеток, специфичных к тус эпитопу в культуре спленоцитов из иммунизированной мыши (Рис. 21 секция 1), в то время как в культуре клеток, изолированных из неиммунизированной мыши, данная популяция клеток отсутствовала (Рис. 21 секция 2). Для изучения цитотоксического действия созданных белков-киллеров культуру спленоцитов инкубировали с барназой и константным доменом иммуноглобулина, слитными с тус эпитопом. Как видно из представленных данных, инкубация клеток с контрольными молекулами барназы (Рис. 21 секция 4) и Trx-тус (Рис. 21 секция 5) не приводит к статистически значимому подавлению целевой популяции. В то время как инкубация клеток с молекулой барназа-тус приводит к значительному, приблизительно трехкратному, уменьшению популяции целевых клеток (Рис. 21 секция 3).

Для изучения цитотоксического действия молекулы Fc-linker-тус на тус-специфичные В-клетки данная молекула была аналогичным образом добавлена в культуру спленоцитов, изолированных из мыши линии BALB/c, иммунизированной конъюгатом KLN-тус. В качестве отрицательного контроля цитотоксического действия мы использовали молекулу Fc-linker. Инкубацию спленоцитов с Fc-linker-тус и Fc-linker производили в течение 72 часов, ежедневно отбирая образец культуральной среды. Далее в отобранных образцах методом ИФА был определена тотальная концентрация иммуноглобулинов, а также концентрация специфических анти-тус антител (Рис. 22).

Как видно из Рис. 22, при инкубации изолированных спленоцитов с молекулой Fc-linker-тус в сравнении с контролями происходит значительное снижение продукции тус-специфичных антител, в то время как общая концентрация IgG остается неизменной. Данный факт однозначно свидетельствует о способности молекулы Fc-linker-тус селективно подавлять экспрессию тус-специфичных антител.

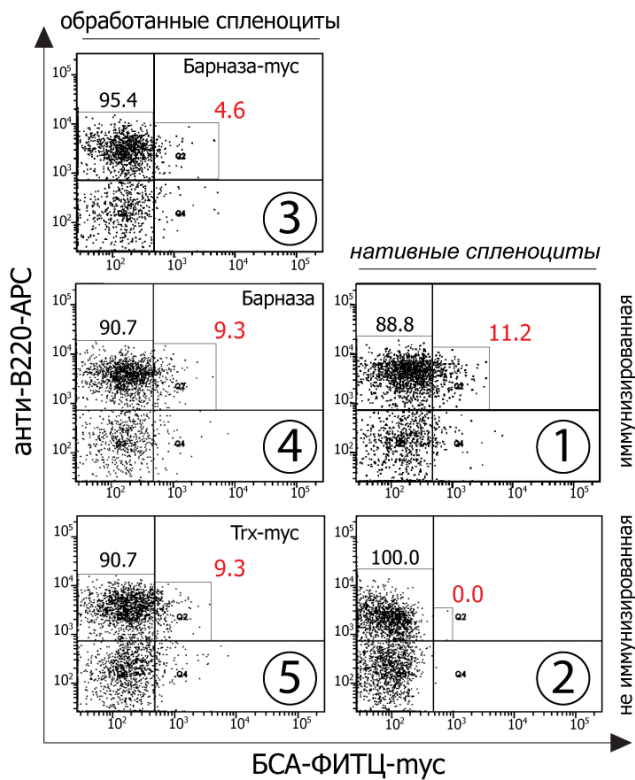


Рис. 21. Анализ подавления популяции В-клеток, специфичных к мус эпитопу, в культуре спленоцитов после инкубации с рекомбинантными молекулами барназа-мус (3), барназа (4) и Тrx-мус (5), по сравнению с контрольной культурой (1) и интактными спленоцитами из неиммунизированной мыши (2).

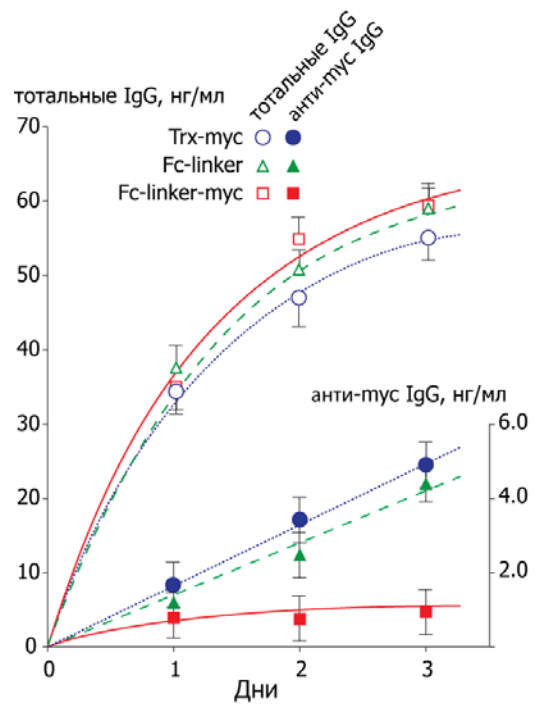


Рис. 22. Снижение титра анти-мус антител в культуре спленоцитов при инкубации с молекулой Fc-linker-мус (квадраты) по сравнению с контрольными белками Fc-linker (треугольники) и Тrx-мус (круги). Тотальный уровень иммуноглобулинов в культуре оставался неизменным во всех образцах

Элиминация аутореактивных В-клеток *in vivo*.

Заключительной стадией изучения терапевтического потенциала созданных белков-киллеров являлось проведение селективной элиминации аутореактивных ОБМ-специфичных В-клеток *in vivo* у мышей линии SJL с индуцированным ЕАЕ. В результате тестирования панели созданных белков-киллеров на предыдущих этапах наиболее перспективными оказались молекулы барназы и константного домена иммуноглобулина. Для финального теста из двух озвученных кандидатов нами был выбран константный домен иммуноглобулина. Основное преимущество Fc при проведении экспериментов *in vivo* состоит в меньшей иммуногенности и в значительной молекулярной массе, превышающей 60 кДа, что позволяет молекуле долгое время не отфильтровываться в почечных гломерулах.

При проведении предварительных *in vitro* и *ex vivo* экспериментов нами был использован Fc домен иммуноглобулина человека. Для предотвращения иммунной реакции организма мыши на вводимый препарат нами были созданы генетические конструкции, кодирующие Fc домен антитела мыши, слитный с фрагментами ОБМ. Для этой цели нами был использован коммерчески доступный плазмидный вектор pFUSE (Invivogen), содержащий константный домен иммуноглобулина мыши класса IgG2a. В данный вектор была интегрирована нуклеотидная последовательность фрагментов ОБМ 7 (QDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPSQG) и 11 (RASDYKSAHKGFGVDAQGTLISKIFKL). Рекомбинантные молекулы pFm-7 и pFm-

11 были наработаны и очищены по аналогичному протоколу получения молекул Fc-linker-мус и Fc-linker. Гомогенность полученных препаратов, согласно электрофоретическому анализу, составила более 95%. Все выделенные рекомбинантные белки тестировали на наличие пептида ОБМ путем их блоттинга по Вестерну и дальнейшей гибридизации с анти-ОБМ (Рис. 23Б) и анти-Fc (Рис. 23А) антителами. Гибридизация с анти-ОБМ антителами подтвердила, что молекулы pFm-7 и pFm-11 содержат пептиды ОБМ, в то время как контрольная молекула pFm не содержит его фрагментов в своем составе.

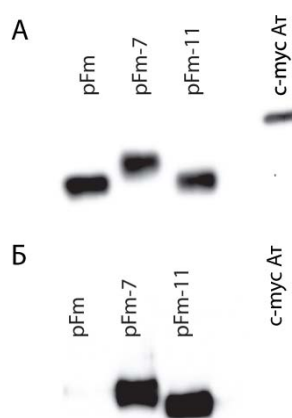


Рис. 23. Гибридизация рекомбинантных молекул pFm-7, pFm-11 и pFm с анти-Fc А) и анти-ОБМ антителами Б).

Для формирования популяции аутореактивных В-клеток, специфичных к ОБМ, ЕАЕ был индуцирован у мышей линии SJL. Для этого животным производили двукратные подкожные инъекции гомогената спинного мозга мыши в эмульсии ПАФ, дополнительно для усиления развития ЕАЕ в те же дни животным внутривенно вводили раствор Pertussis toxin. В качестве отрицательного контроля была использована группа интактных мышей без заболевания (группа – Контроль). Мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на 5 экспериментальных групп по 10 голов в каждой: (1) без терапии; (2) животным однократно вводили 200 мкг Сораконе (Teva) (группа - Сораконе); животным в каждой группе дважды внутривенно вводили (3) pFm (группа - pFm), (4) pFm-7 (группа - pFm) или (5) pFm-11 (группа - pFm-11) (Табл. 3).

Табл. 3. Экспериментальные группы.

Группа	Животных в группе	ЕАЕ	Инъекции	Количество инъекций	День инъекции	мкг/гол
Контроль	5	-	-	-	-	-
Без терапии	10	+	-	-	-	-
Сораконе	10	+	Сораконе	1	1	200 мкг
pFm	10	+	pFm	2	5 и 10	50 мкг
pFm-7	10	+	pFm-7	2	5 и 10	50 мкг
pFm-11	10	+	pFm-11	2	5 и 10	50 мкг

На седьмой день с начала индукции ЕАЕ и до окончания эксперимента во всех группах производили оценку развития симптомов ЕАЕ по 5 бальной шкале. На 14-15 день после индукции заболевания у мышей во всех группах начинали развиваться симптомы ЕАЕ, а на 17-19 дни заболевание достигало пика обострения. На 23 день после начала эксперимента из каждой экспериментальной группы были отобраны мыши SJL с одинаковой клинической картиной развития ЕАЕ (Рис. 24А). Культуры спленоцитов, полученные из этих мышей, анализировали на наличие В-клеток, специфичных к иммунодоминантной и С-концевой последовательностям ОБМ. Для этого клетки инкубировали с фрагментами ОБМ 7 и 12, конъюгированных с биотином. Для визуализации В-клеток использовали конъюгат анти-V220 антител с флуорофором APC (eBioscience), в свою очередь биотинилированные пептиды ОБМ, связанные

с поверхностными рецепторами, детектировали добавлением конъюгата стрептавидина с флуорофором Pacific Blue™ (eBioscience). Образцы анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSDiva (BD), результаты представлены на (Рис. 24Б).

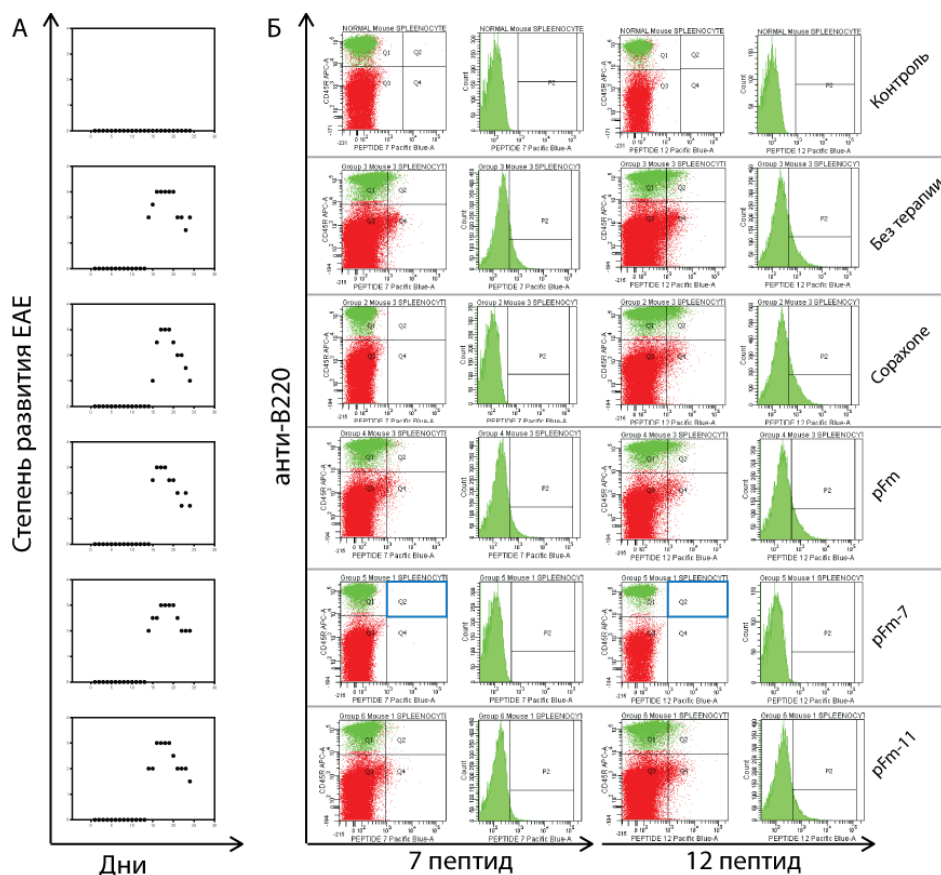


Рис. 24.
А) Степень развития EAE у мышей линии SJL, отобранных из каждой экспериментальной группы.
Б) Анализ изолированных спленоцитов на наличие В-клеток, специфичных к 7 и 12 фрагментам ОБМ, методом проточной цитофлуориметрии.

Как видно из Рис. 24Б у мыши из группы “контроль” отсутствовала популяция В-клеток, специфичных к ОБМ, в то время как в культуре спленоцитов, полученной у животного из группы “без терапии”, существует большая популяция В-клеток, специфичных к обоим пептидам ОБМ. При однократном введении препарата Сораксоне в культуре клеток оставалась популяция В-клеток, имеющих на своей поверхности БкР, специфичный только к 12 фрагменту. Данное наблюдение в очередной раз подтверждает, что терапевтическое действие Сораксоне направленно на популяцию В-клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу ОБМ (7 пептиду). Как и ожидалось, внутривенные инъекции контрольной молекулы rFm, не содержащей пептиды ОБМ, а также контрольной молекулы rFm-11 не привело к подавлению целевой популяции В-клеток. В свою очередь введение молекулы rFm-7 приводило к полной элиминации В-клеток, специфичных не только к 7 фрагменту, который присутствует в составе молекулы rFm-7, но и к 12 фрагменту. Таким образом, после терапии молекулой rFm-7, пул В-клеток, специфичных к ОБМ, в культуре спленоцитов из леченой мыши совпало с профилем здорового животного. Полученные результаты позволяют предположить, что молекула rFm-7 наряду с селективной элиминацией В-клеток, специфичных к иммунодоминантному фрагменту ОБМ (7), также подавляет формирование В-клеток, специфичных к 12 фрагменту ОБМ.

III. ВЫВОДЫ

1. При развитии ЕАЕ у крыс линии DA, а также мышей линии SJL и C57BL/6 определены иммунодоминантные фрагменты ОБМ, определяющие вектор экспансии аутореактивных В-клеток. Показано, что характер В-клеточного ответа при рассеянном склерозе наиболее схож с ЕАЕ, индуцированным в крысах линии DA и мышах линии SJL.
2. Иммунодоминантные фрагменты ОБМ, инкапсулированные в однослойные маннозилированные липосомы, существенно снижали тяжесть протекания ЕАЕ в крысах линии DA. Продемонстрировано, что применение липосомных композиций понижает титр сывороточных анти-ОБМ аутоантител, подавляет демиелинизацию, а также снижает уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИФН γ и индуцирует выработку нейротропного фактора мозга в ЦНС.
3. Была создана панель рекомбинантных молекул, способных к специфической элиминации В-клеток, на основе барназы, каталитических доменов псевдомонадного и шига-подобного токсинов, а также константных доменов иммуноглобулинов мыши и человека. В результате *ex vivo* экспериментов на культуре спленоцитов наиболее перспективными признаны белки-киллеры на основе барназы и константного домена иммуноглобулина. Показано, что введение мышам линии SJL с индуцированным ЕАЕ рекомбинантной молекулы константного домена иммуноглобулина мыши, слитной с иммунодоминантным фрагментом ОБМ, селективно подавляет популяцию ОБМ-специфичных аутореактивных В-клеток.

IV. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи:

Stepanov A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., Sashchenko L.P., Tonevitsky A.G., Friboulet A., Gabibov A.G., Deyev S.M. Design of targeted B cell killing agents. *PLoS One*. 2011; 6(6):e20991.

А.В. Степанов, А.А. Белогуров, А.Э. Мамедов, Д. Меламед, И.В. Смирнов, Е.С. Кузина, Д.Д. Генкин, А.Н. Бойко, С.Н. Шаранова, А. Бэкон, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов. Терапевтический эффект иммунодоминантных пептидов основного белка миелина, инкапсулированных в наноконтейнеры, на развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита в крысах линии DA. *Биоорганическая химия*. 2012 Май-Июнь; 38(3):306-14.

Belogurov A.A. Jr., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Voitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., Boyko A.N., Dubina M.V., Friboulet A., Genkin D.D., Gabibov A.G. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis. *FASEB Journal*. 2013 Jan; 27(1):222-31

Опубликованные тезисы конференций и доклады:

Stepanov A.V., Belogurov A.A. Jr., Ponomarenko N.A., Kozlov L.V., Dmitriev S.E., Stremovsky O.A., Deyev S.M. and Gabibov A.G. Approaches to Multiple Sclerosis therapy by selective autoreactive B-cells depletion. Poster. Biocatalysis 2009: Fundamentals & Applications, 2007, Arkhangelsk, Russian Federation.

Степанов А.В., Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Козлов Л.В., Дмитриев С.Е., Стрёмовский О.А., Деев С.М., Габибов А.Г. Подходы к терапии рассеянного склероза путем селективной элиминации аутореактивных В-клеток. Постер. Российская школа молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии», 2010, Казань, Российская Федерация.

Belogurov A.A., Stepanov A.V., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G. Myelin basic protein peptide 46-62 ameliorates ongoing experimental allergic encephalomyelitis in DA rats. *FEBS Journal*. 2010. 277:54-54

Степанов А.В., Белогуров А.А. Мл., Пономаренко Н.А., Козлов Л.В., Дмитриев С.Е., Стрёмовский О.А., Деев С.М., Габибов А.Г. Направленная элиминация аутореактивных В-клеток. Доклад. V Российский симпозиум «Белки и пептиды», 8-12 августа (2011), Петрозаводск, Российская Федерация.

Степанов А.В., Белогуров А.А. Мл., Пономаренко Н.А., Козлов Л.В., Дмитриев С.Е., Стрёмовский О.А., Деев С.М., Габибов А.Г. Направленная элиминация аутореактивных В-клеток. Доклад. Научная конференция «X чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова», 14-17 ноября (2011), Москва, Российская Федерация.