

УДК 612.017.1:612.112.31

Направленная элиминация миелин-реактивных В-клеток с применением иммунотоксинов – лигандов антигенных рецепторов

А. В. Степанов^{1,2*}, А. А. Белогуров^{1,2,3}, Р. Kothapalli⁴, О. Г. Шамборант¹, В. Д. Кнорре¹, Г. Б. Телегин¹, А. А. Овсепян¹, Н. А. Пономаренко¹, С. М. Деев¹, S. V. Kaveri⁴, А. Г. Габибов^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Россия, Казань, ул. Кремлевская, 18

³Институт биологии гена РАН, 119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 34/5

⁴Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, UMR S 1138, F-75006 Paris, France

*E-mail: stepanov.aleksei.v@gmail.com

Поступила в редакцию 05.05.2015

РЕФЕРАТ В-клетки играют важную роль в развитии и патогенезе как системных, так и орган-специфических аутоиммунных заболеваний. Аутореактивные В-клетки не только продуцируют аутоантитела, но также секретируют провоспалительные цитокины и эффективно презентуют специфические аутоантигены Т-клеткам. Существующая на сегодняшний день терапия аутоиммунных заболеваний путем элиминирования большинства аутореактивных В-клеток моноклональным анти-CD19/20-антителом Ритуксимаб (Rituximab) приводит к системным побочным проявлениям и требует значительного пересмотра. Терапия, направленная на селективную элиминацию патологических аутореактивных В-клеток, потенциально может стать универсальным подходом к лечению целого ряда аутоиммунных заболеваний. В данной работе нами создан рекомбинантный иммунотоксин на основе константного фрагмента антитела, слитого с иммунодоминантным эпитопом основного белка миелина. На животной модели рассеянного склероза – мышах линии SJL/J с индуцированным экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ), показано, что созданный рекомбинантный иммунотоксин способен направленно элиминировать популяцию патологических лимфоцитов *in vivo*. Предложенная концепция может лечь в основу дальнейшего развития препаратов для специфической терапии рассеянного склероза и ряда других аутоиммунных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аутоантигены, В-лимфоциты, иммуноглобулины, иммунотоксины, рассеянный склероз. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЕАЕ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; ИФА – иммуноферментный анализ; МВР – основной белок миелина; ПАФ – полный адъювант Фрейнда; РС – рассеянный склероз.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы аутоиммунной природы, при котором основными аутоантигенами являются белки миелиновой оболочки нервных волокон [1]. В Российской Федерации насчитывается более 200000 человек, больных рассеянным склерозом [2]. Несмотря на успехи в терапии РС, достигнутые в последние годы, существующие методики не позволя-

ют добиться полного выздоровления пациента [3]. Современные подходы к терапии РС, включающие введение рекомбинантных антител и других низкомолекулярных агентов, специфически действующих на компоненты иммунной системы, крайне затратны для бюджетов развитых стран, а с учетом необходимости длительного лечения ставят под угрозу всю систему реабилитации. Более того, уровни инвалидизации пациентов не дают основания для позитивного прогноза в социальной сфере.

Важно отметить, что на сегодняшний день методики, применяемые при РС, включают в себя в основном иммуносупрессирующие препараты ненаправленного действия, часто вызывающие системные осложнения [4].

Основную роль в патогенезе РС долгое время отводили CD4⁺Т-клеткам, однако на настоящий момент очевидно, что В-клеточный ответ несомненно играет не менее важную роль в развитии данного заболевания. Аутореактивные В-клетки не только вырабатывают аутоантитела, но также способны эффективно функционировать в качестве антиген-презентирующих клеток, активируя Т-клетки [5]. Кроме того, В-клетки могут секретировать провоспалительные цитокины и усиливать патологические процессы саморазрушения [6]. Терапия, направленная на определенную популяцию лимфоцитов, в перспективе является универсальным средством при целом ряде В-клеточных заболеваний. На сегодняшний день элиминацию аутореактивных В-клеток осуществляют с помощью введения моноклонального анти-CD19/20-антитела Ритуксимаб (Rituximab, Rituxan, MabThera), которое активно используется в терапии лимфом и аутоиммунных заболеваний [7–12]. Клиническое применение данного препарата в значительной степени ограничено и осуществляется в исключительных случаях, так как приводит к элиминации большинства В-лимфоцитов организма и, как следствие, широкому спектру побочных эффектов [13]. В этой связи проблема создания препаратов специфической терапии рассеянного склероза и других аутоиммунных заболеваний остается крайне актуальной.

Основной подход к терапии рассеянного склероза заключается в подкожном введении иммуномодулирующего препарата глатирамера ацетата (GA, glatiramer acetate). GA – это полипептид длиной 40–100 аминокислотных остатков, включающий случайную комбинацию аланина, лизина, глутамата и тирозина в соотношении 4.5 : 3.6 : 1.5 : 1 соответственно. Структурно GA имитирует один из основных аутоантигенов при РС, сильно положительно заряженный основной белок миелина (myelin basic protein, MBP). Действие GA предположительно состоит в конкуренции с фрагментами основного белка миелина за связывание с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II DR, а также в индукции регуляторных Т-клеток (тип Тх2/3), секретирующих противовоспалительные цитокины ИЛ-4, ИЛ-10 и нейротрофический фактор головного мозга [14]. Следует отметить, что степень эффективности терапии GA сильно варьирует, вплоть до полной резистентности пациентов к используемому препарату [14].

В данной работе нами предложен и успешно реализован подход к созданию рекомбинантных полипептидов, способных осуществлять специфическую элиминацию патологических лимфоцитов *in vivo*. В качестве мишени адресной доставки цитотоксических агентов нами был выбран поверхностный иммуноглобулин аутореактивных В-лимфоцитов (В-клеточный рецептор, BCR) – уникальный рецептор, отличающий определенную клонально-гомогенную популяцию В-клеток от всех других клеток организма. В ряде научных работ уже была доказана высокая эффективность направленной элиминации лимфоцитов с помощью BCR-специфичных иммунотоксинов *in vitro* [15, 16]. Ранее уже было показано, что в сыворотке больных РС обнаруживается высокий титр аутоантител [17–19], специфичных к MBP. Одна из наиболее признанных животных моделей рассеянного склероза – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), индуцированный у мышей линии SJL/J [20, 21]. При развитии ЕАЕ у мышей SJL/J также формируются аутоантитела, специфичные к MBP. С помощью созданной нами ранее библиотеки рекомбинантных эпитопов MBP методом иммуноферментного анализа (ИФА) проведен сравнительный анализ специфичности сывороточных аутоантител, полученных от пациентов с РС и различных животных с ЕАЕ к различным эпитопам аутоантигена [22]. Основываясь на полученных данных, в качестве высокоспецифичного лиганда поверхностных BCR аутореактивных В-клеток выбрали иммунодоминантный фрагмент [QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQ] MBP⁸²⁻¹⁰⁵. Далее нами был создан химерный белок, состоящий из последовательности MBP⁸²⁻¹⁰⁵, слитой с константным фрагментом антитела, который обладает хорошими фармакодинамическими показателями и, вместе с тем, способен эффективно запускать механизмы антитело-зависимой цитотоксичности. В настоящей работе изучен терапевтический потенциал созданного белка-киллера в терминах селективной элиминации аутореактивных MBP-специфичных В-клеток *in vivo* у мышей линии SJL/J с индуцированным ЕАЕ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание генетической конструкции, кодирующей константный фрагмент иммуноглобулина, слитого с MBP⁸²⁻¹⁰⁵

Нуклеотидная последовательность, кодирующая фрагмент MBP⁸²⁻¹⁰⁵, получена путем ПЦР-амплификации с взаимно перекрывающимися внешними и внутренними праймерами 5'-ATTAGGTACCCAAGATGAAAAC-

СССГТАГТССАСТТСТТСААГА-3',
5' -CGTAGTССАСТТСТТСААГАА-
САТТGTGACGCCTCGCACACC-3' и 5'-ТААТ-
GTСGACTCCСТGCGACGGGGGTGGTGTGC-
GAGGCGTCACA-3'. ПЦР-продукт был обработан
эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BglII, а затем
лигирован с обработанным аналогичным образом
вектором pFUSE.

Получение клонов-продуцентов рекомбинантных молекул

Для получения стабильной линии клеток CHO, продуцирующей рекомбинантные молекулы MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (pFUSE-MBP₈₂₋₁₀₅-Fc) и Fc (pFUSE-Fc), клетки линии CHO трансфицировали методом липофекции соответствующими генетическими конструкциями. Для этого за день до трансфекции клетки CHO рассеивали в лунки 6-луночного планшета (Nunc) в концентрации 0.5 млн/мл. При достижении 80% конfluenceности клетки трансфицировали методом липофекции с помощью набора Lipofectamine LTX (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя. Спустя 72 ч к клеткам добавляли среду с селективным антибиотиком зеоцином. Устойчивые к антибиотику клетки переносили в 96-луночные плашки (Corning). Полученные клоны тестировали на наличие продукции рекомбинантных молекул методом ИФА с помощью моноклональных анти-Fc-антител.

Выделение молекул Fc, MBP₈₂₋₁₀₅-Fc

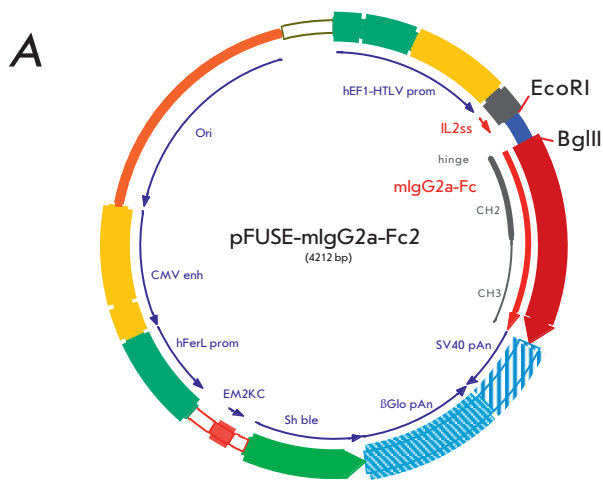
Выделение белков-киллеров, содержащих Fc-фрагмент антитела класса IgG2a, проводили по следующей схеме. Первоначально отбирали супернатант клеток CHO, трансфицированных плазмидами, содержащими нуклеотидные последовательности, кодирующие константный фрагмент антитела, соединенный с последовательностью пептида. Отобранную фракцию центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин. Супернатант отбирали и наносили на колонку для аффинной хроматографии с иммобилизованным белком G (HiTrap Protein-G Sepharose (Amersham, США)) в буфере PBS со скоростью 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали 80–100 объемами PBS на скорости 2.5 мл/мин для отделения неспецифически сорбированных белков. Фракцию элюировали с колонки 100 мМ раствором глицин-HCl pH 2.5 и незамедлительно нейтрализовали 2 М раствором трис-основания до pH 7.3–7.7. Все хроматографические стадии выделения проводили на системе DuoFlow BioRad. Идентификацию препаратов Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc, а также оценку их чистоты проводили с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром и иммуоферментным анализом.

Индукция и терапия ЕАЕ у мышей линии SJL

Эксперименты проводили в научно-производственном подразделении филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова – питомнике лабораторных животных «Пушино» (Россия, Пушино) и научном центре Centre de Recherche des Cordeliers de Jussieu (CRC) (Франция, Париж) с соблюдением всех регламентированных этических норм. ЕАЕ индуцировали у самок мышей линии SJL в возрасте от 6 до 8 недель со статусом SPF (specified pathogen free) в соответствии с протоколом [23] путем двукратного введения 100 мкг гомогената спинного мозга мыши (ГСММ) в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), содержащем туберкулин в концентрации 4 мг/мл. В 1-й день ГСММ вводили подкожно в две точки вдоль позвоночного столба, а на 3-й день в подошвы задних лап. Дополнительно в день инъекций ГСММ в ПАФ мышам вводили внутривенно раствор коклюшного токсина (Pertussis toxin, Calbiochem, США) в количестве 500 нг/мышь. Мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на четыре группы по 10 животных в каждой: без инъекций (группа без терапии); животным однократно вводили 200 мкг GA (Teva); животным в группах Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc на 5 и 10 день с момента индукции ЕАЕ внутривенно вводили 50 мкг препарата. Тяжесть развития аутоиммунной патологии оценивали ежедневно в соответствии со следующей шкалой: 0 – норма, 1 – потеря тонуса хвоста, 2 – слабость задних ног или их паралич, 3 – сильный паралич конечностей, 4 – полный паралич (неспособность двигаться), 5 – смерть.

Проточная цитофлуориметрия

У мышей SJL/J из каждой экспериментальной группы выделяли селезенку. Далее селезенку переносили в чашки Петри и гомогенизировали для получения суспензии спленоцитов. Изолированные спленоциты ресуспендировали в среде DMEM, 1 млн клеток центрифугировали в течение 10 мин при 400 g, осадок дважды отмывали PBS. К клеткам добавляли раствор биотинилированных пептидов MBP (7-TQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPS или 12-DAQG-TLSKIFKLGGGRDSRSGSPMARR) в фосфатном буфере, содержащем 1% БСА. Клетки инкубировали в течение 40 мин при +4°C, центрифугировали (10 мин, 400 g) и ресуспендировали в физиологическом буфере. К клеточной суспензии добавляли анти-B220-APC-антитела (eBioscience, США) и конъюгат Streptavidin-Pacific Blue™, инкубировали (40 мин при +4°C), центрифугировали (10 мин, 400 g), ресуспендировали в буфере FACS (0.1% БСА, 0.02% азида натрия, 50 мкг/мл йодида пропидия в фосфатном буфере) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSdiva (Becton Dickinson, США).



Б
QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG - MBP₈₂₋₁₀₅

ASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTG
 ILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHNPARTAHYGS
 L POKSHGRT **QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG** KGRG
 LSLSRFSWGAEGQRPFGFYGGRASDYKSAHKGFKGV
 DAQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR

Рис. 1. Карта плазмидного вектора pFUSE, содержащего ген константного фрагмента иммуноглобулина мыши (А). Последовательность полноразмерного MBP и фрагмента MBP₈₂₋₁₀₅ (выделен жирным), интегрированного в вектор pFUSE (Б)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание генетической конструкции, кодирующей константный фрагмент иммуноглобулина, слитого с пептидом MBP

Для создания цитотоксических белков высокой избирательности, способных направленно удалять популяцию аутореактивных В-клеток с заранее известной специфичностью, нами была получена генетическая конструкция, кодирующая константный фрагмент (Fc) антитела мыши, слитый с фрагментом MBP₈₂₋₁₀₅. С этой целью использовали коммерчески доступный плазмидный вектор pFUSE, содержащий ген константного фрагмента иммуноглобулина мыши класса IgG2a (Invivogen) (рис. 1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая фрагмент MBP₈₂₋₁₀₅ (QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG), была амплифицирована методом ПЦР с взаимно перекрывающимися праймерами. Полученные фрагменты ДНК встроили в плазмидный вектор pFUSE-mIgG2a по сайтам эндонуклеаз рестрикции EcoRI и BglII.

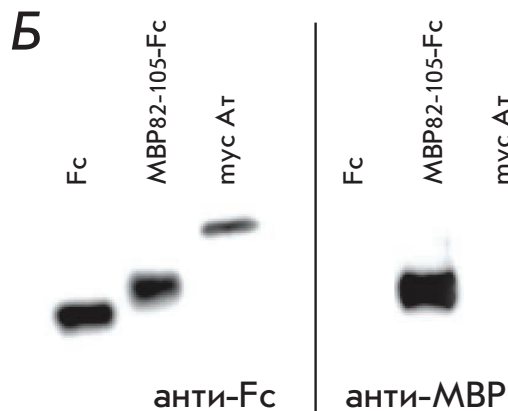
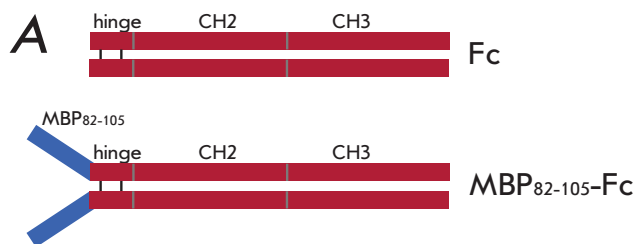


Рис. 2. Схематическое изображение строения рекомбинантных слитых белков Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (А). Гибридизация Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc с анти-Fc- и анти-MBP-антителами (Б)

Для получения стабильной линии клеток CHO, продуцирующей рекомбинантные белки MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (pFUSE-MBP₈₂₋₁₀₅-Fc) и Fc (pFUSE-Fc), клетки линии CHO трансфицировали методом липофекции соответствующими генетическими конструкциями. Трансфицированные клетки отбирали на среде с антибиотиком зеоцином. Устойчивые к антибиотику клетки клонировали. Полученные клоны тестировали на наличие продукции рекомбинантных белков методом ИФА. Отобранные клоны-продуценты использовали для препаративной продукции белка в 125 см² флаконах в течение 9 дней. Fc-содержащие белки последовательно очищали из ростовой среды с помощью аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованным G-белком и на гель-фильтрационной колонке Superdex 200. Согласно электрофоретическому анализу, гомогенность препаратов составила более 95%. Наличие фрагмента MBP в выделенных рекомбинантных белках оценивали методом блоттинга по Вестерну с использованием анти-MBP (рис. 2Б) и анти-Fc (рис. 2Б) антител. Гибридизация с анти-MBP-антителами подтвердила, что слитый белок MBP₈₂₋₁₀₅-Fc содержит иммунодоминантный участок MBP, в то время как в составе контрольного Fc его фрагменты отсутствуют.

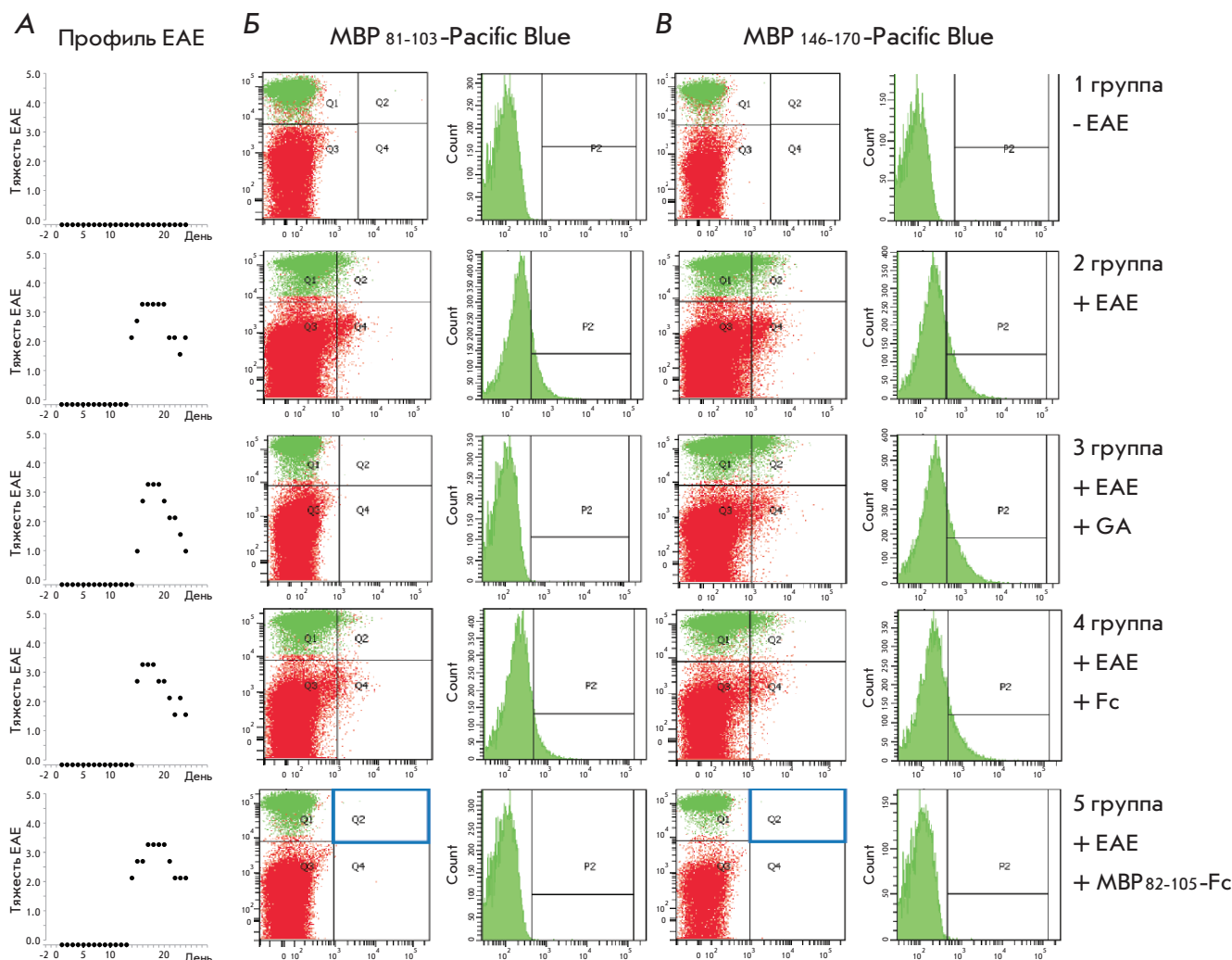


Рис. 3. Степень развития ЕАЕ у мышей линии SJL, отобранных из каждой экспериментальной группы (А). Репрезентативный анализ изолированных спленоцитов на наличие В-клеток, специфичных к фрагментам MBP₈₁₋₁₀₃ (Б) и MBP₁₄₆₋₁₇₀ (В), методом проточной цитофлуориметрии

Элиминация аутореактивных В-клеток у мышей SJL с индуцированным ЕАЕ

Для формирования популяции аутореактивных В-клеток, специфичных к MBP, у мышей линии SJL индуцировали экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит. С этой целью животным делали две подкожные инъекции гомогената спинного мозга мыши в эмульсии полного адъюванта Фрейнда. Дополнительно для усиления развития ЕАЕ в те же дни животным внутривенно вводили раствор коклюшного токсина (Pertussis toxin). В качестве отрицательного контроля использовали группу (1), в которую входили неиммунизированные интактные мыши. Далее мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на четыре экспериментальные группы по 10 животных в каждой: (2) без терапии; (3) животным

однократно вводили 200 мкг GA (Teva) (группа GA); животным в каждой группе дважды внутривенно вводили Fc (4) и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (5) (таблица).

На 7 день с начала индукции ЕАЕ и до окончания эксперимента во всех группах оценивали развитие симптомов ЕАЕ по пятибалльной шкале.

На 14–15 день после индукции у мышей во всех группах начинали развиваться симптомы ЕАЕ, на 17–19 дни заболевание достигало пика. На 23 день из каждой экспериментальной группы были отобраны мыши SJL с одинаковой клинической картиной ЕАЕ (рис. 3А). В культурах спленоцитов, полученных из этих мышей, выявляли В-клетки, специфичные к иммунодоминантному и С-концевому фрагментам MBP. Для этого клетки инкубировали с пептидами MBP₈₁₋₁₀₃ и MBP₁₄₆₋₁₇₀, конъюгированными с био-

Экспериментальные группы

| Группа | Число мышей | ЕАЕ | Инъекции | Количество инъекций | День инъекции | Доза, мкг/мышь |
|--------|-------------|-----|---------------------------|---------------------|---------------|----------------|
| 1 | 5 | - | - | - | - | - |
| 2 | 10 | + | - | - | - | - |
| 3 | 10 | + | GA | 1 | 1 | 200 |
| 4 | 10 | + | Fc | 2 | 5 и 10 | 50 |
| 5 | 10 | + | MBP ₈₂₋₁₀₅ -Fc | 2 | 5 и 10 | 50 |

тином. Для визуализации В-клеток использовали конъюгат анти-B220-антител с флуорофором APC (eBioscience), в свою очередь, биотинилированные пептиды MBP, связанные с поверхностным BCR, детектировали, добавляя конъюгат стрептавидина с флуорофором Pacific Blue™ (eBioscience). Образцы анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSDiva (BD), результаты представлены на (рис. 3Б,В).

Как видно из рис. 3Б,В у мыши из группы «контроль» отсутствовала популяция В-клеток, специфичных к MBP, в то время как в культуре спленоцитов, полученной от животного из группы «без терапии», выявлена значимая популяция В-клеток, специфичных к обоим пептидам MBP. Как и ожидалось, внутривенные инъекции контрольного Fc, не содержащего пептиды MBP, не привели к какому-либо изменению популяции MBP-реактивных В-клеток. При однократном введении препарата GA в культуре клеток исчезала популяция, специфичная к MBP₈₁₋₁₀₃, но оставалась популяция В-клеток, содержащих на поверхности BCR, специфичный к С-концевому фрагменту MBP₁₄₆₋₁₇₀. Данное наблюдение в очередной раз подтверждает, что терапевтическое действие GA направлено на популяцию В-клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу MBP₈₁₋₁₀₃ [24]. Введение слитого белка MBP₈₁₋₁₀₃-Fc привело к полной элиминации В-клеток, специфичных не только к фрагменту MBP₈₁₋₁₀₃, входящего в состав вводимого иммунотоксина, но и к фрагменту MBP₁₄₆₋₁₇₀. Таким образом, профиль популяции В-клеток, специфичных к MBP,

в культуре спленоцитов мыши, подвергнутой терапии белком MBP₈₁₋₁₀₃-Fc, совпал с профилем здорового животного. Полученные результаты позволяют утверждать, что иммунотоксин MBP₈₁₋₁₀₃-Fc наряду с селективной элиминацией В-клеток, специфичных к иммунодоминантному фрагменту MBP₈₁₋₁₀₃, подавляет также формирование В-клеток, специфичных к фрагменту MBP₁₄₆₋₁₇₀.

ВЫВОДЫ

В последнее десятилетие при создании препаратов для лечения больных рассеянным склерозом и другими аутоиммунными заболеваниями все большее место отводится антиген-специфичной терапии. На животной модели нами протестирован один из наиболее актуальных на сегодняшний день подходов к терапии рассеянного склероза – селективная элиминация аутореактивных В-клеток. На основе константного фрагмента иммуноглобулина, слитого с иммунодоминантной последовательностью MBP, получен высоко-селективный белок-киллер В-клеток. Введение данного рекомбинантного иммунотоксина мышам линии SJL/J с индуцированным ЕАЕ приводило к полному подавлению популяции В-клеток, специфичных к фрагментам MBP. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что предложенная концепция может быть успешно реализована при создании препаратов направленной терапии рассеянного склероза и других аутоиммунных заболеваний. ●

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (проект № RFMEFI60714X0061).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nylander A., Hafler D.A. // J. Clin. Invest. 2012. V. 122. P. 1180–1188.
- Kingwell E., Marriott J.J., Jette N., Pringsheim T., Makhani N., Morrow S.A., Fisk J.D., Evans C., Beland S.G., Kulaga S. // BMC Neurol. 2013. V. 13. P. 128.
- Ransohoff R.M., Hafler D.A., Lucchinetti C.F. // Nat. Rev. Neurol. 2015. V. 11. P. 134–142.
- Sorensen P.S. // Curr. Opin. Neurol. 2014. V. 27. P. 246–259.
- Krumbholz M., Derfuss T., Hohlfeld R., Meinl E. // Nat. Rev. Neurol. 2012. V. 8. P. 613–623.
- Marino E., Grey S.T. // Autoimmunity. 2012. V. 45. P. 377–387.

7. Arkfeld D.G. // *Rheumatol. Int.* 2008. V. 28. P. 205–215.
8. Wang M., Fowler N., Wagner-Bartak N., Feng L., Romaguera J., Neelapu S.S., Hagemester F., Fanale M., Oki Y., Pro B. // *Leukemia*. 2013. V. 27. P. 1902–1909.
9. Ransohoff R.M., Zamvil S.S. // *Neurotherapeutics*. 2007. V. 4. P. 569–570.
10. Cross A.H., Stark J.L., Lauber J., Ramsbottom M.J., Lyons J.A. // *J. Neuroimmunol.* 2006. V. 180. P. 63–70.
11. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
12. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. № 1. С. 1–26.
13. Castillo-Trivino T., Braithwaite D., Bacchetti P., Waubant E. // *PLoS One*. 2013. V. 8. e66308.
14. Sela M., Mozes E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 14586–14592.
15. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. e20991.
16. Zocher M., Baeuerle P.A., Dreier T., Iglesias A. // *Int. Immunol.* 2003. V. 15. № 7. P. 789–796.
17. Johnson A.B., Dal Canto M.C. // *Nature*. 1976. V. 264. P. 453–454.
18. Abramsky O., Lisak R.P., Silberberg D.H., Pleasure D.E. // *New Engl. J. Med.* 1978. V. 298. P. 743.
19. Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A. Jr., Kurkova I.N., Petrenko A.G., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 2. P. 281–286.
20. Miller S.D., Karpus W.J., Davidson T.S. // *Curr. Protoc. Immunol.* 2010. Ch. 15. V. 15. P. 11.
21. Stromnes I.M., Goverman J.M. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 1810–1819.
22. Belogurov A.A., Jr., Kurkova I.N., Friboulet A., Thomas D., Misikov V.K., Zakharova M.Y., Suchkov S.V., Kotov S.V., Alehin A.I., Avalue B., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 1258–1267.
23. Yasuda T., Tsumita T., Nagai Y., Mitsuzawa E., Ohtani S. // *Japan J. Exp. Med.* 1975. V. 45. P. 423–427.
24. Sela M., Teitelbaum D. // *Expert Opin. Pharmacother.* 2001. V. 2. P. 1149–1165.