

*На правах рукописи*

**Овчинникова Лейла Александровна**

*Структурно-функциональный анализ В-клеточного репертуара  
при рассеянном склерозе*

1.5.3 Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2024

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

**Научный руководитель:**

**Ломакин Яков Анатольевич**, кандидат биологических наук.

**Официальные оппоненты:**

**Филатов Александр Васильевич**, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России.

**Тикунова Нина Викторовна**, д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита состоится «22» января 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Рассеянный склероз (РС) – самое распространенное аутоиммунное неврологическое заболевание – поражает в среднем 35.9 человек на 100 тысяч населения (Walton C et al., 2020). Во всем мире с этим диагнозом живут порядка 2.8 млн человек. Средний возраст постановки диагноза – 32 года, при этом риск заболеть у женщин в 2 раза выше, чем у мужчин. Такая высокая заболеваемость среди населения трудоспособного возраста делает РС социально значимой патологией. В настоящий момент этиология и молекулярные механизмы данного заболевания до конца не ясны, однако существуют неоспоримые доказательства участия В-клеточного звена в прогрессировании данного заболевания. Пробелы в знании молекулярных механизмов развития РС приводят к тому, что терапия данного заболевания сводится лишь к увеличению периодов ремиссии у пациентов и не приводит к полному выздоровлению. Большой интерес представляет изучение отдельных субпопуляций В-клеток, и в особенности, В-регуляторных клеток (Vreg). Ранее было показано, что дефицит Vreg или снижение их противовоспалительной активности может приводить к иммунологическим дисфункциям. При этом, точные механизмы развития и функционирования Vreg изучены лишь частично. Также, очень мало известно о репертуаре их В-клеточных рецепторов (BCR) у пациентов с РС. Подробное изучение репертуаров Vreg может способствовать прояснению молекулярных механизмов развития и прогрессирования РС, что в дальнейшем позволит скорректировать терапию данного заболевания с учетом особенностей его протекания.

Для осуществления успешной терапии практически любого заболевания, в том числе и РС, крайне важна его ранняя диагностика. Для пациентов с РС это особенно важно, так как воспалительные процессы в ЦНС приводят к утрате жизненно важных функций и инвалидизации. Первостепенной задачей терапии РС является снижение темпов развития нейровоспаления и, соответственно, инвалидизации пациентов. Однако при поздней диагностике РС некоторые функции могут быть утрачены безвозвратно. Имеющийся арсенал потенциальных биомаркёров РС, основанный на характерных белках и аутоантителах, не является универсальным для всех пациентов с РС. Даже классические антимиелиновые антитела, не присутствуют постоянно у пациентов с РС и могут также быть обнаружены у здоровых доноров. Таким образом, определение спектра целевых аутоантигенов, вызывающих аутоиммунное воспаление, имеет решающее значение как для фундаментальной науки, так и для клинической диагностики.

В связи с вышесказанным, нам представляется крайне важным изучение особенностей репертуаров иммуноглобулинов у пациентов с РС и поиск новых, ранее не изученных потенциальных мишеней аутоиммунного ответа.

### **Цель работы и поставленные задачи**

**Цель** данной работы заключалась в изучении репертуаров В-клеток человека в норме и при РС. Для достижения поставленной цели были предложены следующие экспериментальные **задачи**:

1. Разработка и оптимизация протокола эффективной амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии для возможности создания библиотек перекрывающихся пептидов с равномерным распределением индивидуальных клонов.
2. Создание фаг-дисплейной библиотеки белков человека, ассоциированных с аутоиммунными патологиями, для поиска потенциальных мишеней аутоантител у пациентов с РС.
3. Разработка платформы для высокопроизводительного скрининга репертуаров антиген-специфичных иммуноглобулинов человека.
4. Поиск потенциальных мишеней аутоиммунной агрессии у пациентов с РС с использованием полученной фаг-дисплейной библиотеки аутоантигенов и технологии фаговой иммунопреципитации.
5. Сравнительный анализ субпопуляций транзитных регуляторных В-клеток пациентов с РС и здоровых доноров.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

В данной работе приводятся результаты исследований репертуаров иммуноглобулинов у пациентов с РС. Для выполнения поставленных задач нами разработан и оптимизирован метод амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии, позволяющий добиться уменьшения количества ПЦР-ошибок и увеличения выхода продукта реакции. С использованием данного метода создана пептидная фаг-дисплейная библиотека потенциальных аутоиммунных мишеней человека и впервые выявлены 3 ранее не ассоциированных с РС кандидатных маркера: альфа цепь спектрина 1 (SPTAN1<sub>601-644</sub>), периаксин (PRX<sub>451-494</sub>), тирозинкиназа-6 (PTK6<sub>301-344</sub>). Также нами разработана платформа, позволяющая осуществлять высокопроизводительный скрининг антиген-специфичных иммуноглобулинов. Далее мы сосредоточились на изучении транзитных регуляторных В-клеток (tBreg) с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> у пациентов с РС. В этой части работы

приводятся данные, демонстрирующие замедленное созревание популяции tBreg при развитии РС. Результаты, представленные в данной диссертационной работе, расширяют понимание молекулярных механизмов, способствующих развитию РС, и углубляют существующие знания о гетерогенности аутоиммунного ответа при РС, а также о роли В-клеток в его формировании.

### **Методы исследования**

В работе использованы методы молекулярной биологии, биотехнологии и геной инженерии. Генетические векторы создавались методами молекулярного клонирования; использованные в работе белки получали в прокариотической или эукариотической системах экспрессии, чистили с использованием аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Существенная часть работы выполнена с использованием В-клеток пациентов и здоровых доноров, для их анализа использовалась технология проточной цитофлуориметрии. Связывание антител с исследуемыми антигенами анализировали при помощи ИФА и поверхностного плазмонного резонанса. В диссертации также использовались методы лентивирусного и фагового дисплея, в том числе его современная модификация PhIP-Seq. Статистический анализ выполнен с помощью GraphPad Prism 8.0.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Показано, что проведение ПЦР в каплях эмульсии способствует более равномерной амплификации сложных матриц ДНК. Оптимизирован протокол амплификации сложных матриц ДНК в каплях эмульсии.
2. Создана платформа для высокопроизводительного скрининга иммуноглобулинов, позволяющая отбирать антиген-специфичные антитела.
3. С использованием фаг-дисплейной библиотеки идентифицированы потенциальные аутоантигены, которые могут участвовать в развитии РС (альфа цепь спектрина 1 (SPTAN1<sub>601-644</sub>), периаксин (PRX<sub>451-494</sub>), тирозинкиназа-6 (PTK<sub>6301-344</sub>)).
4. Обнаружено повышенное содержание субпопуляции tBreg (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) в периферической крови пациентов с РС.
5. Широкомасштабное секвенирование В-клеточных рецепторов tBreg (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) показало, что вариабельные фрагменты тяжёлых и лёгких каппа цепей иммуноглобулинов у пациентов с РС менее мутированы по сравнению с таковыми у здоровых доноров.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность и воспроизводимость полученных результатов обеспечена набором методов на основе современных исследований в смежной тематике, указанными материалами и статистической обработкой.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы были представлены на 3 конференциях в формате устных и стендовых докладов: V Международный форум “Дни вирусологии 2024” (30 сентября – 1 октября 2024) Санкт-Петербург, Россия), III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (3–8 октября 2021, Дагомыс, Россия), Международный конгресс “The 43rd FEBS Congress” (2018, Прага, Чехия). По теме диссертационной работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах.

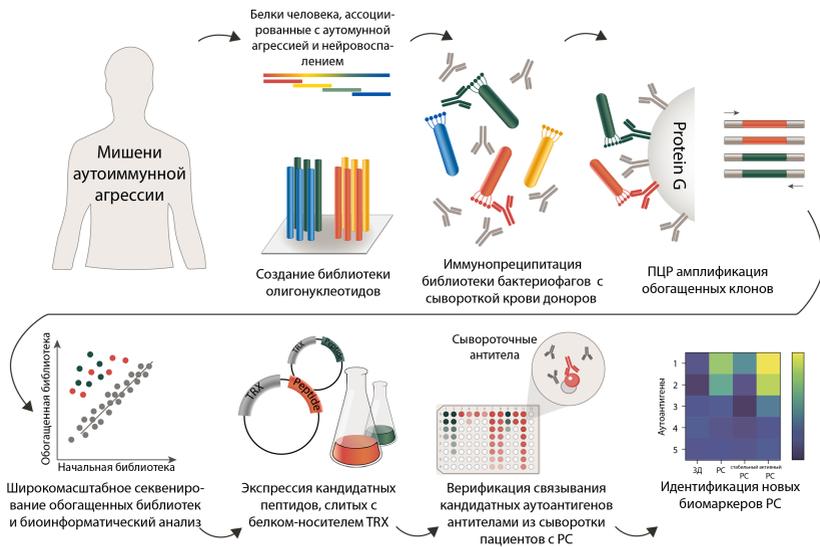
### **Структура и объем диссертации**

Текст диссертации изложен на 154 страницах, содержит 41 рисунок и 12 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, сокращений, списка литературы, включающего 221 источник, и приложений.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Поиск новых мишеней аутоиммунной агрессии при рассеянном склерозе

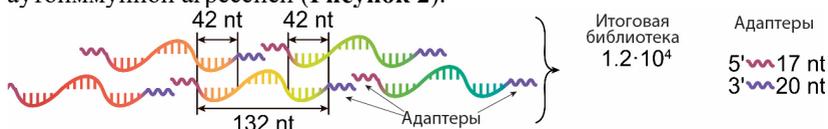
РС – крайне гетерогенное заболевание, этиология которого до конца не изучена, и все ещё существует потребность в более качественной своевременной диагностике. Идентификация и расширение панели аутоиммунных мишеней, для которых характерен повышенный титр антител при РС, является актуальной проблемой. Для поиска аутоантигенных мишеней мы применили технологию PhIP-Seq с созданием фаговой библиотеки белков человека, ассоциированных с аутоиммунными патологиями (**Рисунок 1**).



**Рисунок 1. Схема эксперимента по поиску новых аутоантигенных мишеней у пациентов с рассеянным склерозом.** Библиотека аутоантигенных мишеней человека состоит из перекрывающихся пептидов длиной 44 а.о., экспонированных на поверхности бактериофага fd. Очищенные образцы антител из сыворотки крови пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров инкубировали с библиотекой бактериофагов. Бактериофаги, связанные антителами сыворотки, обогащали при помощи аффинной смолы Protein G, взаимодействующей с Fc-фрагментом антител человека. Фаговая ДНК, кодирующая отобранные пептиды, амплифицировалась для последующего широкомасштабного секвенирования (NGS). На основании данных NGS, идентифицированные последовательности, соответствующие целевым аутоиммунным антигенам-кандидатам, экспрессировали в прокариотической системе, слитыми с белком-носителем TRX, для последующей верификации связывания при помощи ИФА. ЗД – здоровые доноры; РС – рассеянный склероз.

### ***Создание ДНК-библиотек, кодирующих перекрывающиеся фрагменты белков, ассоциированных с аутоиммунной агрессией***

Нами была создана ДНК-кодирующая библиотека белков человека, ассоциированных с различными аутоиммунными патологиями, из базы данных аутоантигенов человека (AAgAtlas project – <http://biokb.ncpsb.org/aagatlas>) и белков, участвующих в деградации и клеточном цикле. Кодирующие последовательности разделили на фрагменты длиной 132 нуклеотида с перекрытием в 42 нуклеотида. Итоговая библиотека состояла из ~12000 уникальных ДНК-последовательностей, кодирующих пептиды, ассоциированные с аутоиммунной агрессией (**Рисунок 2**).



**Рисунок 2.** Схематическое изображение синтезированной библиотеки перекрывающихся олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды длиной 132 нуклеотида фланкированы адаптерами и имеют перекрывающиеся участки по 42 нуклеотида. nt – нуклеотид.

Для создания библиотеки аутоантигенов человека в фаговом векторе было необходимо амплифицировать пул синтезированных олигонуклеотидов, представляющих из себя сложную ДНК-матрицу. Для предотвращения неравномерной амплификации и образования химерных последовательностей нами был оптимизирован метод амплификации сложных матриц в эмульсиях (эмПЦР).

Для оптимизации протокола эмПЦР сравнивали две наиболее распространенные стратегии эмульгирования: **перемешивание с использованием магнитной мешалки (m)** и **перемешивание с использованием вихревого смесителя – вортекса (v)**. Для сравнения стабильности получаемых эмульсий и качества амплифицированной библиотеки ДНК использовали смесь из минерального масла с добавлением 3 % **Abil EM 180 (масло А)** или смесь из минерального масла с добавлением 4.5 % **Span 80**, 0.4 % **Tween 80**, 0.05 % **Triton X-100 (масло Т)**.

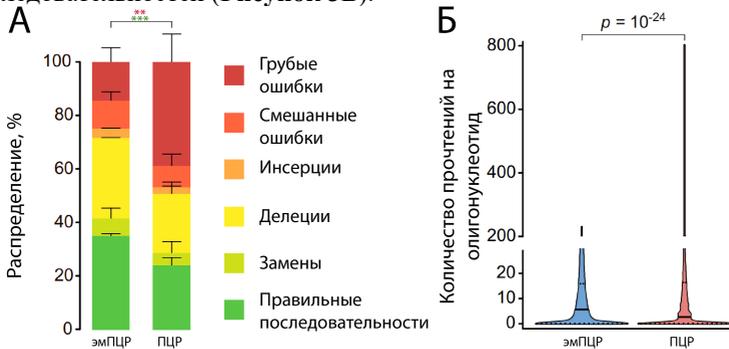
Постановка эмПЦР с маслом А приводила к более воспроизводимыми результатам независимо от метода эмульгирования. Постановка реакции в масле Т приводила к образованию высокомолекулярных побочных продуктов и к потере качества амплифицированной ДНК после 25 циклов, что могло быть вызвано нестабильностью масла Т. Для более глубокого анализа качества амплифицируемой ДНК и получения данных о частоте и распределении

ошибок, возникающих во время амплификации библиотек, мы провели секвенирование полученных библиотек методом NGS.

Несмотря на хорошее качество продукта ПЦР, наблюдаемое при проведении электрофореза, после эмульгирования с помощью магнитной мешалки (Am), фактическое распределение прочтений, оцененное с помощью NGS, было менее равномерным по сравнению с эмульгированием, полученным при вихревом перемешивании (Av).

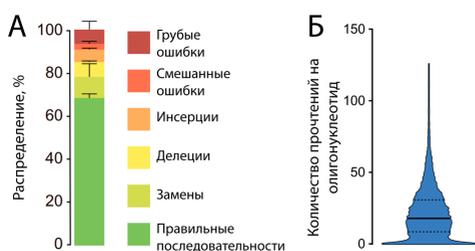
Слияние капель эмульсии во время циклов эмПЦР, вызванное более низкой стабильностью масла T, привело к меньшему покрытию последовательностей исходной библиотеки в образцах с маслом T. Таким образом, нами были подобраны оптимальные условия постановки эмПЦР: использование масла A и вихревого перемешивания на вортексе для получения эмульсии (Av).

Далее мы сравнили ДНК, амплифицированные методами эмПЦР и традиционной ПЦР (Рисунок 3). Постановка эмПЦР с подобранными нами условиями (масло A, вихревое перемешивание – Av) позволяет сократить количество «грубых ошибок», а также достоверно увеличивает выход последовательностей с идеальным правильным прочтением (Рисунок 3А). Более того, постановка эмПЦР привела к более равномерному распределению амплифицированных последовательностей (Рисунок 3Б).



**Рисунок 3. Сравнение качества библиотек ДНК, полученных в реакции эмПЦР или традиционной ПЦР.** (А) Распределения различных типов ошибок, наблюдаемых при NGS образцов, полученных в реакции традиционной ПЦР или эмПЦР с подобранным условиям (масло А, вихревое перемешивание). Распределение ошибок анализировалось с помощью t-критерия Стьюдента; приведены р-значения для идеальных прочтений и грубых ошибок.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . (Б) Данные NGS по распределению прочтений индивидуальных последовательностей амплифицированных библиотек, представленные в виде скрипичных диаграмм. Приведены р-значения критерия суммы рангов Вилкоксона между традиционной ПЦР и эмПЦР.

Метод эмульгирования должен удовлетворять критериям совместимости с ПЦР (не ингибировать реакцию), быть высокопроизводительным и позволять генерировать монодисперсную эмульсию мелких (~5 мкм) капель. Заполняемость капель матрицей ДНК должна быть оптимизирована для достижения максимального выхода эмПЦР. Эмульгирование на основе вихревого смесителя (вортекса) с использованием поверхностно-активного вещества Abil EM 180 при концентрации матрицы ~60 пМ удовлетворяет этим критериям и было выбрано нами для дальнейших манипуляций с библиотеками ДНК и амплификации итоговой библиотеки аутоантигенов человека (**Рисунок 4**).



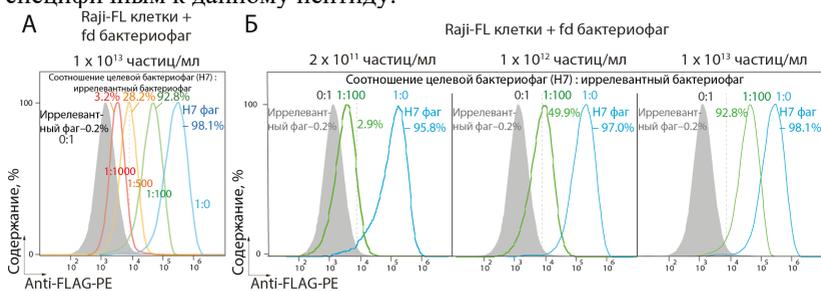
**Рисунок 4.** Характеристика полученной библиотеки аутоантигенов человека. **(А)** Распределение различных типов ошибок, наблюдаемых с помощью NGS библиотеки аутоантигенов человека, амплифицированной эмПЦР с оптимизированными условиями. **(Б)** Распределение прочтений NGS полученной библиотеки, представленное в виде скрипичной диаграммы.

### **Создание фаг-дисплейной библиотеки перекрывающихся фрагментов аутоантигенов на основе вектора *fADL***

Для поиска потенциальных мишеней аутоиммунной агрессии при РС мы сконструировали фаг-дисплейную библиотеку потенциальных аутоантигенов на основе бактериофага fd. Добавление перед геном рIII фага fd последовательности, кодирующей пептиды библиотеки, позволяет получить бактериофаги, экспонирующие эти пептиды на своей поверхности.

Для того, чтобы обеспечить наибольший выход фаговых частиц, позволяющий производить манипуляции с библиотекой, содержащей порядка 12000 уникальных последовательностей, нами были подобраны условия наработки наибольшего количества фаговых частиц в клетках *E. coli* (инкубация при 30°C в течение 16-24 часов). Далее мы проверили функциональность полученных бактериофагов на модельных клетках линии *Raji* с рекомбинантным BCR известной специфичности (*Raji-FL*). Мы наработали фаговые частицы, несущие на своей поверхности лиганд данного BCR (пептид H7), и верифицировали специфичность узнавания данного пептида в составе фаговых частиц при помощи цитофлуориметрии (**Рисунок 5**). В качестве отрицательного контроля использовали иррелевантный бактериофаг, не

обладающий сродством к рецептору клеток *Raji-FL*. Такая система позволила детектировать специфический сигнал с использованием бактериофагов Н7, взятыми в соотношении 1:100 с иррелевантными бактериофагами для 92.8 % антиген-специфичных клеток. Соотношение целевых фагов к иррелевантным 1:500 обеспечивало детекцию 28.2 % антиген-специфичных клеток, соотношение 1:1000 – 3.2 %. (**Рисунок 5А**). Далее мы проверили, как повлияет на уровень сигнала уменьшение концентрации фаговых частиц в растворе. Мы сравнили 3 концентрации фаговых частиц ( $10^{13}$ ,  $10^{12}$  и  $2 \cdot 10^{11}$  частиц в 1 мл). Уменьшение концентрации бактериофагов в 100 раз позволило детектировать сигнал на уровне 95.8 %. Однако при такой концентрации частиц, разведение целевых фагов иррелевантными (1:100) снижает сигнал до уровня 2.9 % (**Рисунок 5Б**). Таким образом, функциональность собираемых фаговых частиц была подтверждена на модельном фаге, несущем пептид Н7 и линии клеток *Raji-FL* с BCR, специфичным к данному пептиду.



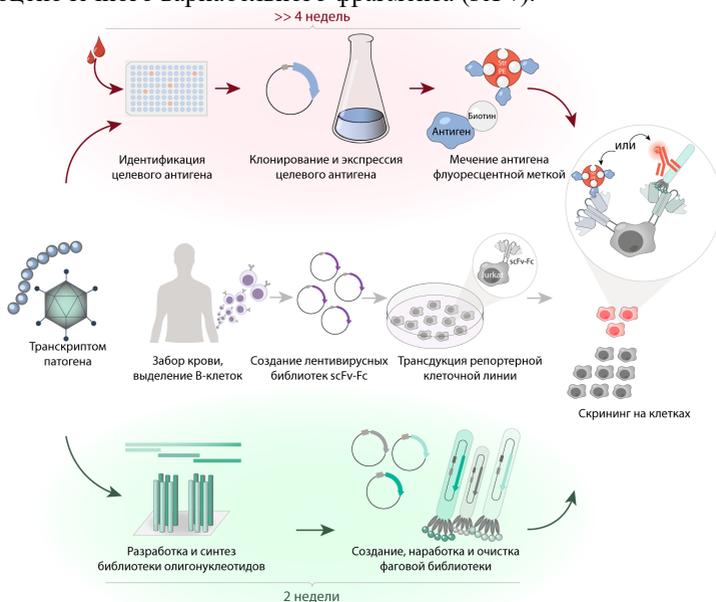
**Рисунок 5. Верификация сборки фаговых частиц и их функциональности на примере бактериофага с пептидом Н7-FLAG и клеточной линии *Raji-FL*.** Клетки *Raji-FL*, с которыми связались бактериофаги Н7-FLAG, окрашиваются при помощи anti-FLAG-PE. В качестве отрицательного контроля использовались бактериофаги, несущие иррелевантный пептид с меткой FLAG. (**А**) Подбор различных соотношений бактериофагов Н7 к иррелевантным бактериофагам, где соотношение 0:1 (серый цвет) соответствует связыванию только с иррелевантным бактериофагом, а 1:0 (голубой) – только с бактериофагом Н7. (**Б**) Подбор различных концентраций фаговых частиц, инкубируемых с клетками.

### **Разработка платформы для скрининга антиген-специфичных иммуноглобулинов на основе модельной библиотеки иммуногенов**

Для дальнейшей верификации функциональности получаемых фаговых библиотек для отборов антиген-специфичных иммуноглобулинов нами была создана модельная библиотека пептидов S-белка вируса SARS-CoV-2 (PhAgL – англ. Phage antigen library – фаговая антигенная библиотека). Известно, что S-белок и его домены, могут успешно применяться для отбора вирус-нейтрализующих

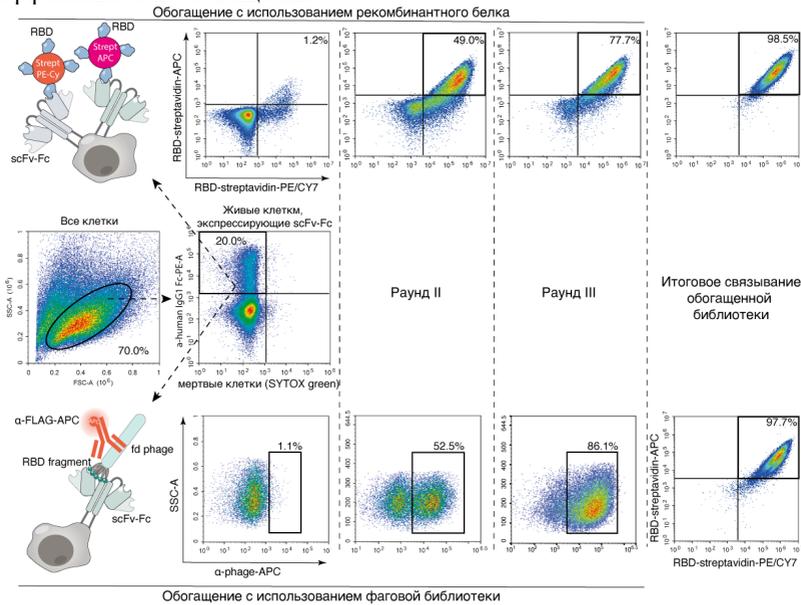
антител. Однако “традиционный” метод отбора антиген-специфичных антител предполагает идентификацию конкретного иммуногена, экспрессию и очистку полноразмерного белка для проведения дальнейших раундов отборов. Предложенная нами платформа для поиска антиген-специфичных иммуноглобулинов не требует идентификации конкретной антигенной мишени и позволяет сократить подготовительный этап до двух недель (**Рисунок 6**).

Мы сравнили два подхода для отбора антиген-специфичных антител – при помощи рекомбинантного RBD и созданной фаговой библиотеки перекрывающихся фрагментов S-белка, PhAgL. После подтверждения вирус-нейтрализующей активности сывороток крови нами были созданы лентивирусные библиотеки антител. Для этого В-клетки доноров обогащали на RBD-связывающие клоны, случайные комбинации VH-VL из которых клонировали в вектор pLV2 в формате одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv).



**Рисунок 6.** Схема выделения антиген-специфичных иммуноглобулинов с использованием библиотеки фаговых антигенов (PhAgL) и проточной цитометрии. Библиотека антител доноров, представляет собой трансгенную линию клеток *Jurkat*, экспрессирующих на своей поверхности мембраносвязанные scFv-Fc. “Традиционный” метод выделения антиген-специфичных моноклональных антител предполагает идентификацию целевого антигена, его наработку и очистку (верхняя панель, выделенная красным), при этом для скрининга антиген-специфичных антител при помощи библиотеки PhAgL требуется только создание библиотеки антигенов на основе транскриптома патогена (нижняя панель, выделенная зеленым).

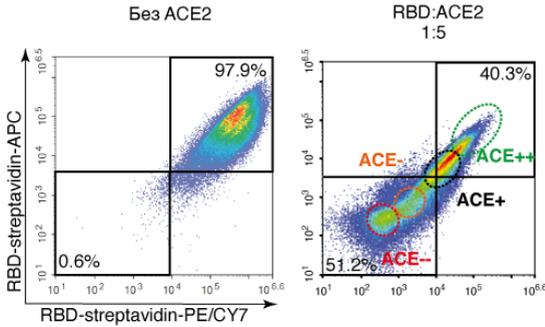
Для проведения отборов с помощью рекомбинантного RBD мы сконструировали тетрамеры RBD-стрептавидин с двумя различными флуорофорами и отбирали субпопуляцию клеток, связавших оба тетрамера RBD. Для отборов с использованием фаговой библиотеки мы выделяли субпопуляцию клеток, окрашивающих FLAG-эпитоп (экспонированный на поверхности фагов fd). Независимо от протокола обогащения, каждую библиотеку подвергали одинаковому количеству раундов отборов для получения 95–99 % антиген-специфичных клонов (**Рисунок 7**). Далее мы сравнили связывание клеток, обогащенных по обоим протоколам – использование каждого обеспечивало одинаковую эффективность обогащения.



**Рисунок 7. Стратегия отбора клеток, несущих RBD-специфичные иммуноглобулины.** Диаграммы построены на основе связывания RBD клетками *Jurkat*, трансдуцированными библиотекой scFv. RBD-специфичные клетки были отсортированы по следующей схеме: разделение живых и мёртвых клеток производили при окрашивании SYTOX Green, далее выделяли клетки, экспонирующие заякоренный за мембрану scFv-Fc. RBD-специфичные клетки обогащали и сортировали отдельно на основе связывания с рекомбинантной молекулой RBD (верхняя панель) и фаговой библиотекой PhAgL (нижняя панель). Крайние правые диаграммы – контрольное связывание с рекомбинантным RBD в окончательных обогащённых библиотеках scFv.

Функциональность отобранных библиотек, оценивалась также в конкурентных тестах с человеческим ACE2. Для этого мы отсортировали четыре фракции RBD-положительных клонов из каждой

библиотеки в зависимости от их конкуренции с рекомбинантным ACE2 при связывании RBD: “ACE++” – RBD не вытесняется ACE2; “ACE+” – RBD частично вытесняется ACE2; “ACE-” – RBD вытесняется ACE2; “ACE--” – RBD полностью вытесняется ACE2 (**Рисунок 8**).



**Рисунок 8.** Стратегия клеточного сортирования RBD-связывающих клонов в зависимости от их конкуренции с рекомбинантным ACE2. Обозначены области, из которых отбирали популяции ACE-, ACE-, ACE+, ACE++.

Последовательности VH-VL из обогащенных и исходных библиотек анализировали с использованием NGS. Для дальнейшего анализа были выбраны наиболее представленные комбинации VH-VL из всех обогащенных библиотек. Выбранные комбинации VH-VL проэкспрессировали в виде полноразмерных IgG человека в клетках линии *HEK293F* и оценивали связывание полученных моноклональных антител с рекомбинантным RBD с помощью ИФА. Функциональность отобранных антител сохраняется в полноразмерном формате IgG. Для наиболее универсальных нейтрализующих антител Vac-3.1 и Vir-1.7 были измерены константы связывания с RBD методом поверхностного плазмонного резонанса (**Таблица 1**).

**Таблица 1.** Константы связывания антител Vac-3.1 и Vir-1.7, полученные с разными вариантами RBD при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса.

Моноклональное антитело	Штамм SARS-CoV-2	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
Vac-3.1	Wuhan RBD	$3.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^{-6}$	$4.2 \times 10^{-12}$
	Alpha RBD	$3.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-6}$	$4.7 \times 10^{-12}$
	Gamma RBD	$3.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-6}$	$4.7 \times 10^{-12}$
	Delta RBD	$1.2 \times 10^3$	1.00	$8.3 \times 10^{-4}$
	Omicron RBD	$2.7 \times 10^5$	$1.3 \times 10^{-6}$	$4.8 \times 10^{-12}$
Vir-1.7	Wuhan RBD	$1.0 \times 10^6$	$2.5 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-11}$
	Alpha RBD	$0.9 \times 10^6$	$6.0 \times 10^{-5}$	$6.7 \times 10^{-11}$
	Gamma RBD	$0.7 \times 10^6$	$2.4 \times 10^{-4}$	$3.4 \times 10^{-10}$
	Delta RBD	$1.2 \times 10^6$	$1.3 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-9}$
	Omicron RBD	$2.0 \times 10^4$	$1.2 \times 10^{-2}$	$6.0 \times 10^{-7}$

Исходя из функциональных свойств отобранных антител, можно сделать вывод, что обогащение с использованием фаговой библиотеки PhAgL не уступает “традиционному” обогащению рекомбинантными белками, а также позволяет сохранить разнообразие связывающих антител и отобрать лучшие нейтрализующие антитела с сопоставимой эффективностью.

Таким образом, нами разработана платформа для поиска высокоэффективных терапевтических антител, которая потенциально не требует информации о структуре целевого антигена. Дополнительно мы подтвердили функциональность полученной фаговой библиотеки антигенов для отборов антиген-специфичных антител.

### ***Идентификация кандидатных маркёров РС на основе данных PhIP-Seq***

Для идентификации новых потенциальных мишеней при РС мы получили библиотеку белков человека, ассоциированных с аутоиммунными патологиями, в формате фаговой библиотеки, в которой рекомбинантные пептиды экспонируются на поверхности нитчатого бактериофага fd в составе белка рIII, и воспользовались методикой фаговой иммунопреципитации-секвенирования (PhIP-Seq). Для отбора пептидов, специфически узнаваемых антителами пациентов с РС, мы проинкубировали полученную фаговую библиотеку аутоантигенов с антителами из сывороток крови пациентов с разными вариантами течения РС (стабильный РС или высокоактивный РС) и здоровых доноров. Бактериофаги, экспонировавшие на своей поверхности пептиды, с которыми связались антитела сыворотки крови, выделяли из раствора при помощи смолы Protein G. Далее с выделенными бактериофагами ставили ПЦР для амплификации целевой последовательности, кодирующей пептидный фрагмент из библиотеки, и добавления адаптеров NGS. По результатам NGS сравнивали уровень обогащения для каждого отдельного пептида (**Рисунок 1**). Большинство идентифицированных антигенов были специфичны для каждого конкретного донора. Однако, нам удалось выделить несколько антигенов, в значительной степени обогащенных у группы пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами: SPTAN1<sub>601-644</sub>, DPP4<sub>481-524</sub>, GPI<sub>31-74</sub>, HAVCR1<sub>31-74</sub>, POU4F1<sub>91-134</sub>, PRX<sub>451-494</sub>, PTK6<sub>301-344</sub>, KRT1<sub>301-344</sub>. Дополнительно в анализ был включен пептид INSR<sub>301-344</sub>, обогащённый как в группе с РС, так и у здоровых доноров (**Таблица 2**). Перечисленные белки ранее не ассоциировались с аутоиммунной агрессией при РС. Для проверки кандидатных пептидов мы проэкспрессировали их в прокариотической системе в

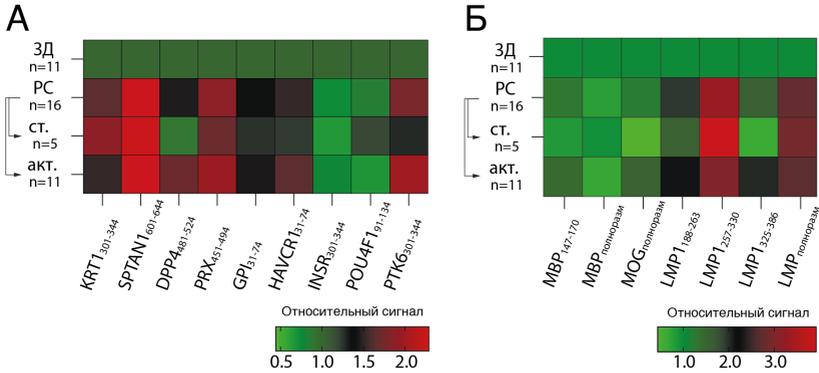
виде рекомбинантных белков, слитых с белком носителем тиоредоксином (TRX).

**Таблица 2. Отобранные потенциальные мишени аутоиммунного ответа при РС.**

Uniprot ID	Название гена	Полное название белка
P04264	<i>KRT1</i>	Keratin, type II cytoskeletal 1
Q13813-3	<i>SPTAN1</i>	Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1, Isoform 3
P27487	<i>DPP4</i>	Dipeptidyl peptidase 4
Q9BXM0	<i>PRX</i>	Periaxin
P06744	<i>GPI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase
Q96D42	<i>HAVCR1</i>	Hepatitis A virus cellular receptor 1
P06213	<i>INSR</i>	Insulin receptor
Q01851	<i>POU4F1</i>	POU domain, class 4, transcription factor 1
Q13882	<i>PTK6</i>	Protein-tyrosine kinase 6

При помощи ИФА мы верифицировали специфическое узнавание отобранных антигенов антителами из сыворотки крови пациентов с РС (**Рисунок 9А**). Для большинства отобранных пептидов, за исключением *INSR*<sub>301-344</sub> и *POU4F1*<sub>91-134</sub>, у части пациентов с РС детектировался повышенный титр антиген-специфичных антител, однако статистически значимая разница была показана только для пептида *SPTAN1*<sub>601-644</sub>. Для пептидов *KRT1*<sub>301-344</sub> и *SPTAN1*<sub>601-644</sub> мы обнаружили усиление антительного ответа в обеих группах РС (со стабильным течением РС и активным РС) по сравнению со здоровыми донорами, тогда как антитела к *DPP4*<sub>481-524</sub>, *PRX*<sub>451-494</sub>, *HAVCR1*<sub>31-74</sub>, *PTK6*<sub>301-344</sub>, и *GPI*<sub>31-74</sub> были обнаружены преимущественно у подгруппы пациентов с активной формой РС. Мы также проанализировали связывание сывороточных антител с антигенами миелиновой оболочки – *MBP* (основной белок миелина) и *MOG* (миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин) (**Рисунок 9Б**). Повышенный уровень связывания удалось идентифицировать только с иммунодоминантным фрагментом *MBP*<sub>147-170</sub> у одного пациента с активным РС.

Ранее, была показана прямая ассоциация между ВЭБ и развитием РС. В связи с этим измерение титра антител к *LMP1* ВЭБ у пациентов с РС также было включено в анализ (**Рисунок 9Б**). Мы обнаружили статистически значимое различие в связывании полноразмерной молекулы *LMP1* антителами из крови пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами.

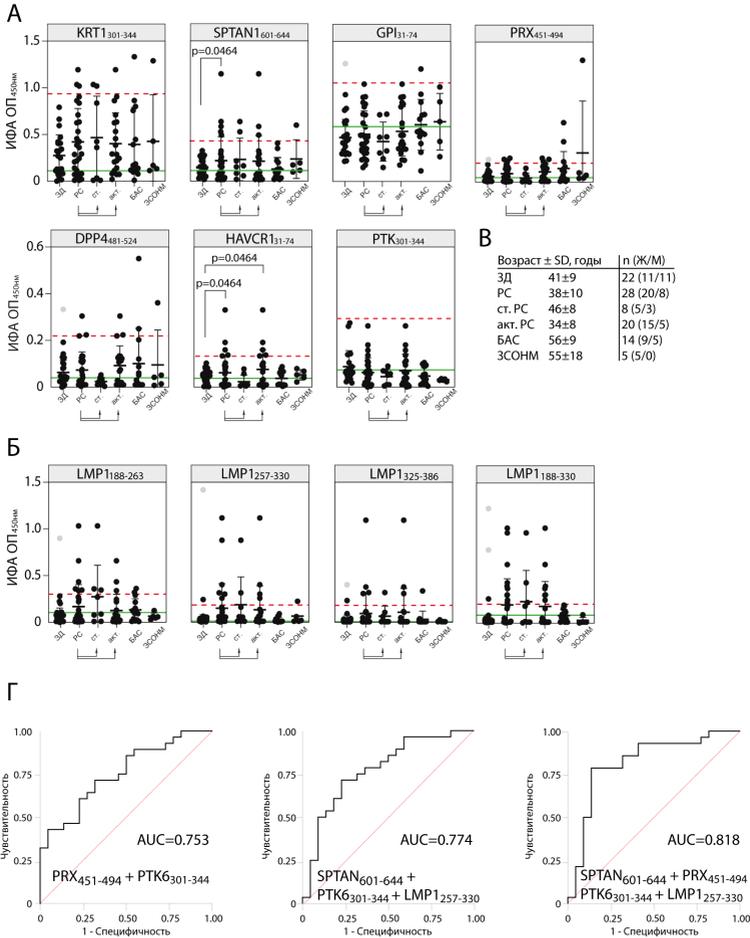


**Рисунок 9.** Иммунный ответ пациентов с РС на потенциальные мишени аутоагрессии. Тепловая карта, характеризующая титр антител на (А) потенциальные мишени аутоиммунной агрессии, впервые выявленные в данном исследовании, и (Б) классические миелиновые антигены (MVP, фрагмент MVP<sub>147-170</sub>, MOG) и антигены ВЭБ – С-концевые фрагменты LMP1. Анализовали сыворотку крови пациентов со стабильным рассеянным склерозом (ст.), высокоактивным рассеянным склерозом (акт.) и здоровых доноров (ЗД).

### *Независимая валидация выявленных антигенов методом ИФА и их значение в качестве клинических биомаркёров*

Для оценки прогностической ценности идентифицированных антигенов в качестве диагностических биомаркёров РС мы провели дополнительную валидацию на независимой выборке пациентов. В новую выборку были включены здоровые доноры, пациенты с РС, боковым амиотрофическим склерозом (БАС) и заболеваниями спектра оптиконевромиелимита (ЗСОНМ). Мы обнаружили повышенный антительный ответ против пептида SPTAN1<sub>601-644</sub> у пациентов с РС по сравнению со здоровыми донорами (**Рисунок 10**). Также был показан высокий уровень сигнала для пептида NAVCR1<sub>31-74</sub> у пациентов с РС.

Для дальнейшей оценки диагностической ценности выявленных антигенов мы провели ROC-анализ (**Рисунок 10Г**). Одновременное использование четырёх биомаркёров (SPTAN1<sub>601-644</sub>, PRX<sub>451-494</sub>, PTK6<sub>301-344</sub> и LMP1<sub>257-330</sub>) показало наибольшую прогностическую ценность при чувствительности 78.6% и специфичности 86.4% (AUC = 0.818).



**Рисунок 10. Независимая валидация выявленных антигенов.** ИФА связывающей активности сывороточных антител пациентов с РС, БАС, ЗСОНМ и здоровых доноров с обнаруженными аутоантигенами (А) и с С-концевыми фрагментами LMP1 ВЭБ (Б). Каждая точка соответствует отдельному донору. Показаны средние значения ± SD. Красная пунктирная линия – среднее значение контрольного сигнала здоровых доноров + 3 стандартных отклонения. Зелёная линия – дополнительное контрольное отрицательное связывание препаратом IVIG (объединенные IgG от 1000 здоровых доноров). Точный тест Фишера использовался для определения статистической значимости различий в количестве совпадений, превышающих три пороговых значения стандартного отклонения между группами доноров. Указаны только значения  $p < 0.05$ . (В) Сравнение возраста и пола пациентов с РС, БАС, ЗСОНМ и здоровых доноров, взятых для данной независимой валидации. (Г) ROC-кривые, полученные для лучших комбинаций обнаруженных маркёров. РС – рассеянный склероз; ст. – стабильный РС; акт. – активный РС; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЗСОНМ – заболевание спектра оптиконевромиелита.

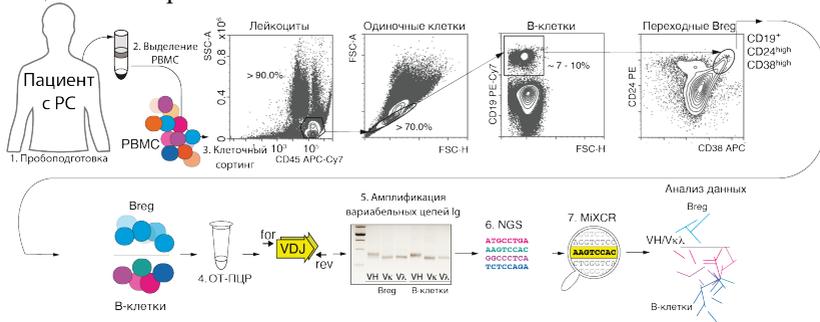
Таким образом, используя метод PhIP-Seq, мы охарактеризовали профиль иммунного ответа В-клеток периферической крови пациентов с РС и здоровых доноров. Несмотря на высокую гетерогенность иммунного ответа, некоторые аутоантигены были общими для части пациентов с РС. Насколько нам известно, новые аутоантигены, идентифицированные в этой работе, ранее не считались ассоциированными с РС. Один из наиболее ценных потенциальных аутоантигенов при РС – фрагмент SPTAN1, мембранного белка, распространенного в нейронах ЦНС и периферической нервной системы (ПНС). Являясь структурным белком, SPTAN1 располагается во внутреннем пространстве аксонов и в норме не подвергается воздействию иммунной системы, однако возможно, при развитии воспалительных процессов при РС, становится доступной мишенью аутоантител. Мы также обнаружили аутоантитела к PRX, нейрональному белку ПНС, который необходим для нормальной ремиелинизации нервного волокна после повреждения. Таким образом, аутоантитела против фрагментов SPTAN1 и PRX могут указывать на повреждение нервной ткани в ЦНС и ПНС. Наше исследование также выявило аутоантитела к РТК6 в сыворотке пациентов с РС. РТК6 в основном связывают с онкологическими заболеваниями, но он также экспрессируется в В-клетках, трансформированных ВЭБ, что указывает на возможную косвенную связь между этим антигеном и заболеванием РС.

***Анализ репертуаров иммуноглобулинов транзитных В-регуляторных клеток пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров***

К функциям В-клеток в организме человека, помимо продукции антител, относят также регуляторную функцию. Особый интерес в связи с этим представляет регуляторная субпопуляция В-клеток (Breg). Субпопуляции Breg у пациентов с РС плохо охарактеризованы; опубликовано чрезвычайно мало информации об их специфичности и последовательностях В-клеточных рецепторов. Чтобы лучше понять природу развития и охарактеризовать процесс созревания Breg, мы проанализировали субпопуляцию  $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$  – один из наиболее подтвержденных фенотипических портретов транзитных Breg (tBreg).

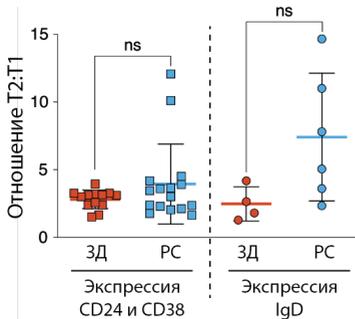
Мононуклеарные клетки здоровых доноров и пациентов с РС окрашивали на поверхностные маркеры CD45, CD19, CD24 и CD38; стратегия выделения субпопуляций при таком окрашивании показана на **Рисунке 11**. Мы обнаружили, что **количество клеток**

**CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>** среди общего пула В-клеток было значительно увеличено у пациентов с РС ( $4.5 \pm 2.4$  %) по сравнению со здоровыми донорами ( $2.6 \pm 1.8$  %). При этом мы не наблюдали различий в абсолютном количестве В-клеток между здоровыми донорами и пациентами с различным течением РС.



**Рисунок 11. Схема эксперимента по изучению tBreg.** Общий пул В-клеток (CD19<sup>+</sup>) и субпопуляция tBreg (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) из периферической крови были отсортированы по отдельности при помощи метода проточной цитофлуориметрии. Из отсортированных клеток выделяли РНК и затем ставили реакцию ОТ-ПЦР. Далее гены переменных фрагментов тяжёлых и лёгких цепей иммуноглобулинов амплифицировали и подвергали широкомасштабному секвенированию.

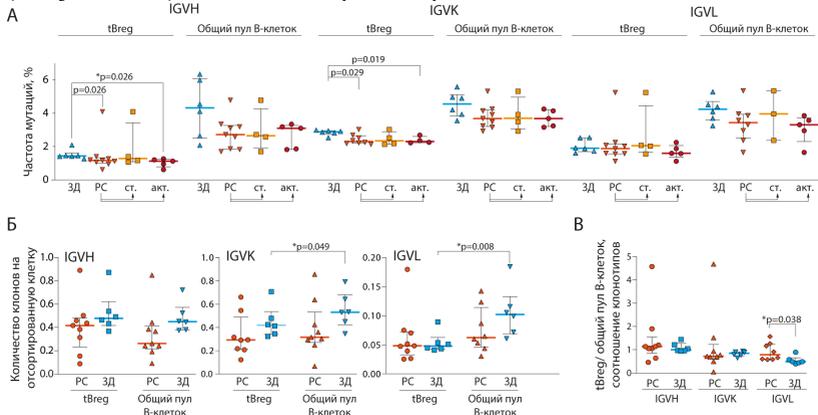
Ранее было показано, что активность регуляторных В-клеток изменяется в зависимости от состава субпопуляции tBreg. Снижение отношения более зрелых tBreg (T2) к менее зрелым (T1) T2(CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>)/T1(CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>IgD<sup>low/-</sup>) было связано с повышенной продукцией IL-10 и наиболее эффективным подавлением Т-клеток. Мы изучили относительное соотношение между переходными субпопуляциями T1 и T2 на основе уровня экспрессии IgD и CD24, CD38 (**Рисунок 12**). Хотя среднее значение отношения T2/T1 повышается при прогрессировании РС, статистически значимой разницы между этими субпопуляциями не наблюдалось.



**Рисунок 12. Анализ субпопуляций T1 и T2.** Относительная доля T1 и T2 tBreg, выделенных на основе уровня экспрессии CD24 и CD38 или экспрессии IgD – T2(CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>) / T1(CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>IgD<sup>low/-</sup>). Указано среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическую значимость различий между группами доноров оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

### Анализ репертуаров BCR транзитных В-регуляторных клеток

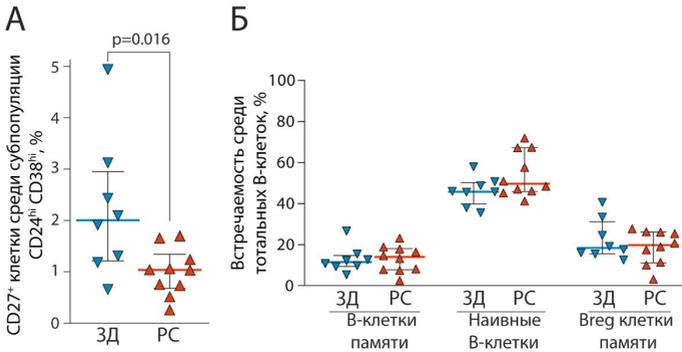
Для более глубокого понимания особенностей развития tBreg при РС мы проанализировали последовательности BCR данной субпопуляции клеток. Для этого методом проточной цитофлуориметрии выделяли две субпопуляции: тотальные В-клетки ( $CD19^+$ ) и tBreg ( $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ ). Для анализа репертуара иммуноглобулинов варибельные фрагменты тяжёлых и лёгких цепей антител подвергались широкомасштабному секвенированию. tBreg представляют собой популяцию незрелых клеток и, следовательно, несут меньше соматических гипермутаций, чем общий пул В-клеток из периферической крови. Нам удалось показать, что гены  $V_H$  и  $V_K$  tBreg, полученных из периферической крови пациентов с РС, менее мутированы по сравнению со здоровыми донорами (Рисунок 13А). Нами было выявлено примерно одинаковое количество клонотипов IG $V_H$  в tBreg и в общем пуле В-клеток у пациентов с РС и здоровых доноров (Рисунок 13Б). Однако анализ разнообразия репертуаров лёгких цепей показал, что соотношение между числом клонотипов IG $V_K$  и IG $V_L$  в общем пуле  $CD19^+$  клеток было выше, чем у tBreg, и повышено у здоровых доноров, оставаясь неизменным у пациентов с РС (Рисунок 13В). Наименьшее разнообразие наблюдалось для IG $V_L$ .



**Рисунок 13. Задержка созревания  $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$  у пациентов с РС. (А)** Частота мутаций генов  $V_H$ ,  $V_K$  и  $V_L$ . **(Б)** Количество уникальных клонотипов на отсортированную клетку. **(В)** Отношение клонотипов tBreg/общий пул В-клеток пациентов с рассеянным склерозом (РС) и здоровых доноров (ЗД). Статистическую значимость различий между группами доноров оценивали с помощью критерия Манна-Уитни **(А, Б)** и парного t-критерия Стьюдента **(В)**. Значения  $p < 0,05$  после поправки на множественные сравнения считались статистически значимыми и обозначались звездочками.

### Анализ зрелости субпопуляции транзитных В-регуляторных клеток у пациентов с РС и здоровых доноров

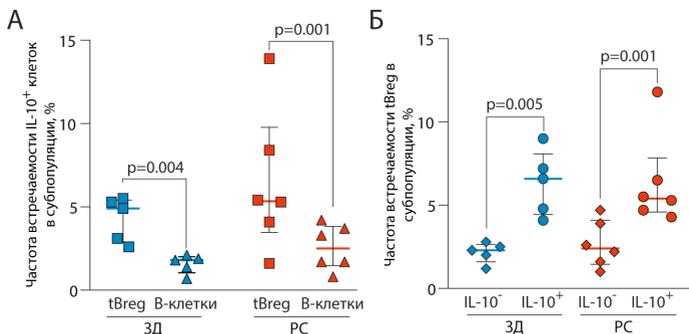
Чтобы изучить фенотипическую стадию созревания tVreg, мы проанализировали вклад CD27<sup>+</sup> клеток в эту субпопуляцию (**Рисунок 14А**). Мы обнаружили, что содержание CD27<sup>+</sup> клеток в субпопуляции tVreg у пациентов с РС достоверно снижено ( $1.0 \pm 0.5$  %) по сравнению со здоровыми донорами ( $2.2 \pm 1.4$  %). При этом, процентное содержание и абсолютное количество Vreg памяти, наивных В-клеток и В-клеток памяти были одинаковыми у здоровых доноров и пациентов с РС (**Рисунок 14Б**).



**Рисунок 14. Анализ субпопуляций В-клеток в периферической крови больных РС и здоровых лиц. (А)** Процент CD27<sup>+</sup> клеток в субпопуляции CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>tVreg. **(Б)** Количество клеток памяти (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup>CD27<sup>+</sup>), наивных (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+/low</sup>CD27<sup>-</sup>) или клеток памяти Vreg (CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>) в периферических В-клетках пациентов с рассеянным склерозом (РС) и здоровых доноров (ЗД).

### Повышение продукции IL-10 в субпопуляции CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>

Поскольку регуляторные свойства В-клеток не ограничиваются исключительно субпопуляцией CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>, мы проанализировали частоту встречаемости IL-10-секретирующих клеток среди общего пула В-клеток после кратковременной стимуляции CpG. Такая короткая стимуляция (менее 24 часов) позволяет оценить продукцию IL-10 только в Vreg, но не в В-клетках, предрасположенных к экспрессии IL-10. Статистически значимых различий в продукции IL-10 В-клетками пациентов с РС и В-клетками здоровых доноров обнаружено не было. При этом в субпопуляции CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> наблюдалось больше IL-10-позитивных В-клеток, чем в пуле тотальных В-клеток (**Рисунок 15А**). И наоборот, IL-10-положительные В-клетки у пациентов с РС и здоровых доноров были обогащены клетками субпопуляции CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (**Рисунок 15Б**).



**Рисунок 15. Анализ продукции IL-10 tBreg и общим пулом В-клеток.** (А) Процент IL-10<sup>+</sup> клеток в субпопуляции CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (tBreg) и общем пуле В-клеток. (Б) Процент CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> tBreg в IL-10<sup>+</sup> и IL-10<sup>-</sup> В-клетках. Статистическую значимость различий между группами доноров оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, а значимость различий между субпопуляциями В-клеток – с помощью парного t-теста. ЗД – здоровые доноры, РС – пациенты с рассеянным склерозом.

Существование нескольких альтернативных методов дифференцировки Вreg может привести к сосуществованию различных субпопуляций В-клеток с регуляторными функциями. В данной работе мы сфокусировались на репертуаре tBreg с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>. Мы охарактеризовали репертуары В-клеточных рецепторов tBreg методом NGS и показали, что в генах зародышевых линий тяжёлых и лёгких каппа цепей в области вариабельных фрагментов у пациентов с РС содержится меньше мутаций по сравнению со здоровыми донорами. На основании полученных нами данных можно предложить 3 возможных варианта нарушения развития tBreg: (1) нарушенное созревание tBreg – меньшее количество В-клеток становится зрелыми; (2) задержка созревания tBreg – процесс созревания растягивается во времени; (3) повышение количества tBreg, которое компенсирует нарушения созревания. Компенсация нарушений при созревании кажется нам наиболее вероятным сценарием, так как соотношение T1/T2 и особенно процентное и абсолютное количество tBreg повышены у пациентов с РС, тогда как количество клеток памяти и наивных В-клеток остается неизменным.

## ВЫВОДЫ

- 1 Оптимизирован метод амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии, позволяющий сохранить разнообразие библиотеки, уменьшить количество ПЦР-ошибок и увеличить выход продукта. С использованием данного метода создана пептидная фаг-дисплейная библиотека потенциальных аутоиммунных мишеней человека, размером 11973 уникальных последовательностей.
- 2 Разработана платформа для высокопроизводительного скрининга антиген-специфичных иммуноглобулинов.
- 3 С использованием полученной библиотеки человеческих аутоантигенов методом фаговой иммунопреципитации (PhIP-Seq) впервые выявлены 3 кандидатных биомаркёра РС (SPTAN1<sub>601-644</sub>, PRX<sub>451-494</sub>, РТК<sub>6301-344</sub>). Предложена панель антигенов (SPTAN1<sub>601-644</sub> + РТК<sub>6301-344</sub> + PRX<sub>451-494</sub> + LMP1<sub>257-330</sub>), позволяющая с высокой чувствительностью идентифицировать РС (AUC=0.818, SE=0.786, SP=0.864).
- 4 При анализе транзистных регуляторных В-клеток (tBreg) с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> впервые показано их повышенное содержание в периферической крови пациентов с активной формой РС.
- 5 Выдвинуто предположение о том, что развитие РС сопряжено с замедленным созреванием субпопуляции tBreg, что подтверждено пониженным содержанием гипермутаций в переменных фрагментах тяжёлой цепи репертуара иммуноглобулинов данной субпопуляции.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Lomakin Y.A., **Ovchinnikova L.A.**, Terekhov S.S., Dzhelad S.S., Yaroshevich I., Mamedov I., Smirnova A., Grigoreva T., Eliseev I.E., Filimonova I.N., Mokrushina Y.A., Abrikosova V., Rubtsova M.P., Kostin N.N., Simonova M.A., Bobik T.V., Aleshenko N.L., Alekhin A.I., Boitsov V.M., Zhang H., Smirnov I.V., Rubtsov Y.P., Gabibov A.G. Two-dimensional high-throughput on-cell screening of immunoglobulins against broad antigen repertoires // **Commun. Biol**, 2024. V.7., № 842.
2. **Овчинникова Л.А.**, Джелад С.С., Симанив Т.О., Захарова М.Н., Габибов А.Г., Ломакин Я.А. Уровень противовирусных антител к белку EBNA-1 в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом не зависит от тяжести заболевания // **Доклады российской академии наук. Науки о жизни**, 2024. Т. 515., С. 92–96.
3. Lomakin Y.A., Zvyagin I.V., **Ovchinnikova L.A.**, Kabilov M.R., Staroverov D.B., Mikelov A., Tupikin A.E., Zakharova M.Y., Bykova N.A., Mukhina V.S., Favorov A.V., Ivanova M., Simaniv T., Rubtsov Y.P., Chudakov D.M., Zakharova M.N., Illarioshkin S.N., Belogurov A.A., Gabibov A.G. Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation // **Front Immunol**, 2022. V.13.
4. **Ovchinnikova L.A.**, Zalevsky A.O., Lomakin Y.A. Extracellular Vesicles in Chronic Demyelinating Diseases: Prospects in Treatment and Diagnosis of Autoimmune Neurological Disorders // **Life (Basel)**, 2022. V.12., № 11.
5. Ломакин Я.А., **Овчинникова Л.А.**, Захарова М.Н., Иванова М.В., Симанив Т.О., Кабилов М.Р., Быкова Н.А., Мухина В.С., Каминская А.Н., Тупикин А.Е., Захарова М.Ю., Фаворов А.В., Иллариошкин С.Н., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Смещение репертуара генов зародышевой линии В-клеточных рецепторов при рассеянном склерозе // **Acta Naturae**, 2022. Т. 14., № 4. С. 84–93.
6. Terekhov S.S., Eliseev I.E., **Ovchinnikova L.A.**, Kabilov M.R., Prjibelski A.D., Tupikin A.E., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Severinov K.V., Lomakin Y.A., Altman S., Gabibov A.G. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information. // **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2020. V. 117., № 44. P. 27300-27306.
7. Ishina I.A., Filimonova I.N., Zakharova M.Y., **Ovchinnikova L.A.**, Mamedov A.E., Lomakin Y.A., Belogurov A.A. Exhaustive Search of the Receptor Ligands by the CyCLOPS (Cytometry Cell-Labeling Operable Phage Screening) Technique // **Int J Mol Sci**, 2020. V. 21., № 17.

