



УДК 577.27

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ ПЕПТИДОВ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В НАНОКОНТЕЙНЕРЫ, НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА В КРЫСАХ ЛИНИИ DA

© 2012 г. 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. Габиров\*, \*\*

\* Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* Институт биологии гена, 119334, Москва, Вавилова, 34/5

\*\*\* Медицинский центр им. Асаф Арофе, Израиль

\*\*\*\* МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет

\*\*\*\*\* "Липоксен", Лондонский центр биологических инноваций

\*\*\*\*\* Кафедра неврологии и нейрохирургии Российского государственного медицинского университета Московский городской центр рассеянного склероза на базе Городской клинической больницы № 11

Поступила в редакцию 30.06.2011 г. Принята к печати 13.10.2011 г.

Рассеянный склероз (РС) — это тяжелое воспалительное и нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы, возникающее преимущественно у лиц молодого возраста. Разработка новых подходов к патогенетическому лечению РС имеет большое значение в фундаментальной иммунологии и современной фармакологии. В работе показан терапевтический эффект иммунодоминантных пептидов основного белка миелина (МВР), включенных в состав маннолизированных однослойных липосом, на течение экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) у крыс линии DA. МВР входит в состав мембраны олигодендроцитов, которые, в свою очередь, формируют миелиновую оболочку аксонов. Данный белок является одним из основных аутоантигенов при РС. Используя созданную ранее в нашей лаборатории эпипептидную библиотеку МВР, мы проанализировали панель сывороточных антител, связывающих МВР, полученных из крови больных РС. Аналогичным образом был изучен пул сывороточных анти-МВР-антител у мышей SJL/J и C57BL/6, а также у крыс линии DA с развивающимся ЕАЕ. Анализ спектра аутоантител к МВР продемонстрировал, что самой близкой к РС моделью является ЕАЕ, индуцированный у DA-крыс. Для последующей терапии ЕАЕ на верифицированной модели DA были отобраны три фрагмента МВР, которые были инкапсулированы в состав маннозильированных однослойных липосом (SUV). Фрагмент МВР-(46–62) обладал наиболее эффективным терапевтическим эффектом на начальных этапах развития ЕАЕ, в то время как фрагменты МВР-(124–139) и МВР-(147–170) предотвращали развитие патологии на стадии ремиссии. Совместное введение данных иммунодоминантных липосомированных фрагментов МВР значительно снижало уровень анти-МВР-аутоантител. Синергетический эффект пептидов снижал интегральную тяжесть заболевания, ингибируя первую волну ЕАЕ и ослабляя последующее обострение, что открывает новые возможности для эффективной патогенетической терапии рассеянного склероза.

*Ключевые слова:* основной белок миелина, липосомная технология, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), рассеянный склероз, глатирамера ацетат.

### ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз — это хроническое воспалительное нейродегенеративное заболевание

Сокращения: DA — крысы линии Dark Aguti; ЕАЕ — экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; IL — интерлекин; IFN — интерферон; GPMVP — основной белок миелина морской свинки; МВР — основной белок миелина; SUV — маннозильированные однослойные липосомы; Tix — тиоредоксин; АПК — антигенпрезентирующие клетки; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; ИПЛ — измененные пептидные лиганды; РС — рассеянный склероз; ТкР — Т-клеточные рецепторы.

# Автор для связи (тел.: (499) 724-72-99; эл. почта: belogurov@mx.ibch.ru).

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 [1]. Список потенциальных аутоантигенов постоянно расширяется и включает в себя раз-

личные белки, ассоциированные с мембраной олигодендроцитов. Среди них особо выделяют основной белок миелина (МВР) и миелин-олигодендроцитарный гликопротеин. Аутореактивные лимфоциты, специфичные к данным белкам, совместно с макрофагами проникают через гемато-энцефалический барьер и индуцируют процессы воспалительной демиелинизации в ЦНС.

Известно, что по отношению к олигодендроцитам Т-клетки осуществляют острый иммунный ответ, а В-клетки продуцируют патогенные аутоантитела и являются активными антигенпрезентирующими (АПК) и цитокинпродуцирующими клетками [2]. Еще одним подтверждением важности В-клеток при патологии РС является наличие в сыворотке больных каталитических антител к МВР, которые могут не только связывать МВР, но и гидролизовать его [3–5].

Современное понимание особенностей механизмов индукции и патогенеза РС значительно изменили взгляды на терапию заболевания. На сегодняшний день существует несколько подходов к его лечению.

(1) Введение так называемых “измененных пептидных лигандов” (ИПЛ), взаимодействующих с Т-клеточными рецепторами (ТкР). По структуре ИПЛ соответствуют модифицированным [6], мутированным [7] или укороченным [8] участкам последовательностей, связывающихся с ТкР. ИПЛ могут частично активировать Т-клетки, переключая их с фенотипа Тх1 на Тх2, а также в некоторых случаях индуцировать переход Т-клетки в анаргию. Ранее были проведены клинические испытания ИПЛ, содержащего аминокислотную последовательность энцефалитогенного фрагмента МВР-(89–98), на пациентах с РС, имеющих гаплотип HLA-DR2-DR4. Препарат в некоторых случаях ингибировал развитие заболевания, тем не менее 3-я стадия клинических испытаний была признана неуспешной [9]. Есть свидетельства, что двойная замена аминокислот в пептиде МВР-(83–99) вызывает выработку IL-4 и ингибирование продукции INF $\gamma$  [10].

(2) В настоящее время среди препаратов патогенетического лечения РС (препаратов, изменяющих течение РС) активно используется копаксон (глатимера ацетат) – синтетический сополимер L-аминокислот Glu, Lys, Ala и Tug. Копаксон стимулирует образование популяции регуляторных Тх2-клеток, способных проникать через ГЭБ и продуцировать противовоспалительные цитокины: IL-4, IL-6, IL-10 и нейротрофический фактор мозга [11].

(3) Введение IFN $\gamma$ .

(4) Применение моноклональных антител, специфичных к поверхностным клеточным рецепторам: Rituximab (антитело к CD20, содержится на мембране зрелых В-клеток) [12], Daclizumab (антитело к CD25, альфа-субъединица ре-

цептора IL-2, презентирован на активированных Т-клетках) [13], Alemtuzumab (антитело к CD52, гликопротеин с неизвестной функцией, представленный на поверхности всех зрелых лимфоцитов и моноцитов) [14].

(5) Терапия *per os* использует ряд препаратов: FTY720 (в фосфорилированной форме – ингибитор SP1-ассоциированных G-опосредованных рецепторов); Teriflunomide – ингибитор пролиферации Т клеток; BG-12, индуцирует продукцию цитокинов Тх2-типа; Laquinimod, блокирует способность Т-клеток и макрофагов перемещаться через ГЭБ, а также переключает фенотип Тх2 на Тх3; Cladribine, субстрат для дезоксицитидинкиназы, влияющий на ДНК репарацию и опосредованно индуцирующий смерть лимфоцитов (все подходы описаны в работе [9]).

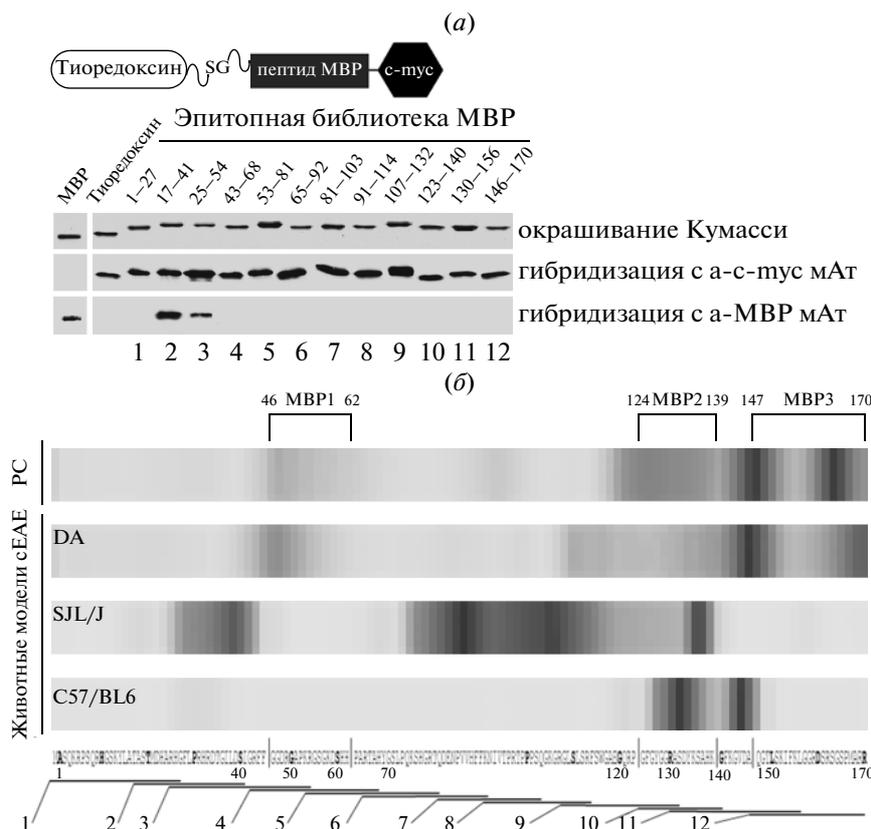
(6) Введение инактивированных Т-клеток или вакцинация гипервариабельными регионами ТкР для стимуляции ТкР-специфичных CD8<sup>+</sup>-клеток.

(7) Индукция “назальной” или “оральной толерантности” аутоантигеном. В качестве примера можно привести ДНК-вакцинацию плазмидой ВНТ-3009, кодирующей полноразмерную молекулу МВР и вызывающей толерантность Т-клеток и снижение титра аутоантител к ряду миелиновых аутоантигенов.

Тем не менее, стоит отметить, что 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 препарата, способного полностью остановить патологические процессы при РС. Таким образом, дальнейшее совершенствование существующих подходов или же разработка новых перспективных методов терапии РС является задачей первостепенной важности. В данной работе мы осуществили успешное лечение DA-крыс с развивающимся ЕАЕ, путем введения маннолизированных липосом, содержащих иммунодоминантные пептиды МВР.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что введение миелиновых антигенов может индуцировать развитие ЕАЕ у грызунов и млекопитающих многих видов. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит безусловно не является полным аналогом рассеянного склероза, тем не менее данная модель с успехом используется для широкого круга исследований в этой области. Выбор экспериментальных животных и схемы иммунизации во многих случаях являются решающими факторами, поскольку ряд обнадеживающих исследований, проведенных на животных с индуцированным ЕАЕ при попытке аналогичной терапии человека вызывали сильное обострение заболевания.



**Рис. 1.** Сравнительный анализ спектров антител, специфичных к фрагментам МВР, из пациентов с РС и грызунов с индуцированным ЕАЕ. Панель (а), сверху вниз. Схематическое изображение эпиптопной библиотеки фрагментов МВР содержащих серин-глициновый линкер (SG), слитных с белком-носителем тиоредоксином. Электрофоретический анализ белков эпиптопной библиотеки в 12% ПААГ, окрашенный Кумасси. Вестерн-блот анализ белков эпиптопной библиотеки с контрольными анти-с-мус и анти-МВР антителами. (б) Анализ спектра связывания с эпиптопной библиотекой анти-МВР аутоантител из сывороток крови пациентов с РС, крысы линии DA, мышей линии C57/BL6 и SJL/J. Пептиды МВР1-3, выбранные для последующей терапии, отмечены рамками. Внизу представлена аминокислотная последовательность МВР и его эпиптопная библиотека (фрагменты 1–12).

Ранее в нашей лаборатории была создана эпиптопная библиотека фрагментов МВР, слитных с белком-носителем тиоредоксином (рис. 1а) [15]. Тестирование сывороток пациентов с применением данной библиотеки показало, что спектр аутоантител к МВР является уникальной характеристикой патологического В-клеточного ответа при РС. Библиотека эпиптопов была верифицирована на наличие связывания с контрольными анти-МВР- и анти-с-мус-антителами (рис. 1а) и использована для дальнейшего тестирования панели аутоантител у грызунов с индуцированным ЕАЕ (рис. 1б). В результате биоинформатического анализа полученных данных у мышей линии C57BL/6 был обнаружен один иммунодоминантный эпиптоп МВР-(124–147), в то время как у мышей линии SJL/J и у крыс линии DA – по два: МВР-(24–44), МВР-(72–139) и МВР-(40–60), МВР-(107–170) соответственно.

У пациентов с рассеянным склерозом выявлены два иммунодоминантных эпиптопа: МВР-(43–64) и МВР-(115–170), что оказалось очень близко

к спектру связывания аутоантител из DA-крыс. Таким образом, в работе [15] было показано, что развитие В-клеточного ответа при РС наиболее схоже с ЕАЕ, индуцированным в крысах линии DA. Необходимо отметить, что в работе [16] авторы продемонстрировали, что миелинспецифичные Т-клетки высокой аффинности образуются в первую очередь к пептидам МВР-(111–129) и (146–170), последовательность которых значительно перекрывается с обнаруженными нами иммунодоминантными пептидами, что является свидетельством значительной кроссреактивности В- и Т-клеток.

Ранее было показано, что из пептидов – фрагментов белков миелина морской свинки, только GPBP-(62–84) и существенно в меньшей степени GPBP-(68–88) способны индуцировать ЕАЕ в DA-крысах [17]. Нам не удалось отметить значимую активность аутоантител к данным фрагментам, что соответствует ранее опубликованным данным, свидетельствующим о энцефалитогенном, но не иммунодоминантном значении фраг-



**Таблица 1.** Физические характеристики липосомальных композиций и протокол их введения экспериментальным группам крыс линии DA с индуцированным ЕАЕ

Код группы	Размер, нм	Потенциал, мВ	Эффективность инкапсуляции пептидов, %	Доза на одну крысу в день (суммарно 6 инъекций), мкг				
				MBP1	MBP2	MBP3	копаксон	Липосомы SUV
А	—	—	—	—	—	—	—	—
Б	95	−10.5	91	150	—	—	—	+
В	85	−8.3	93	—	150	—	—	+
Г	81	−9.2	90	—	—	150	—	+
Д	73	−7.5	93	150	150	150	—	+
Е	—	—	—	—	—	—	450	—
Ж	—	—	—	150	—	—	—	—

**Таблица 2.** Средняя максимальная и кумулятивная степень развития ЕАЕ у крыс линии DA при введении различных липосомальных композиций в сравнении с копаксоном и контрольной группой

Код группы	Терапия	Количество животных в группе	Средняя максимальная степень развития заболевания (IQR <sup>3</sup> )	Средняя кумулятивная степень развития заболевания (IQR <sup>3</sup> )	Число летальных исходов
А	Без терапии	17	3 (0.5)	22 (12.5)	3/17
Б	MBP1-SUV	12	2 (1) <sup>1</sup>	17 (5.5) <sup>1</sup>	0/12
В	MBP2-SUV	12	3 (0.75) <sup>2</sup>	17.5 (26.75) <sup>2</sup>	1/12
Г	MBP3-SUV	12	3 (0) <sup>2</sup>	15 (11) <sup>2</sup>	0/12
Д	MBP1/2/3-SUV	18	3 (0.75) <sup>1</sup>	14 (5.25) <sup>1</sup>	0/18
Е	Копаксон	12	2 (1.25) <sup>1</sup>	18.5 (12.5) <sup>2</sup>	0/12
Ж	MBP1	15	3 (0.5) <sup>2</sup>	19.5 (22) <sup>2</sup>	1/15

<sup>1</sup>  $p < 0.05$  статистически достоверное различие в сравнении с отрицательным контролем; дисперсионный анализ для непараметрической статистики методом Вилкоксона.

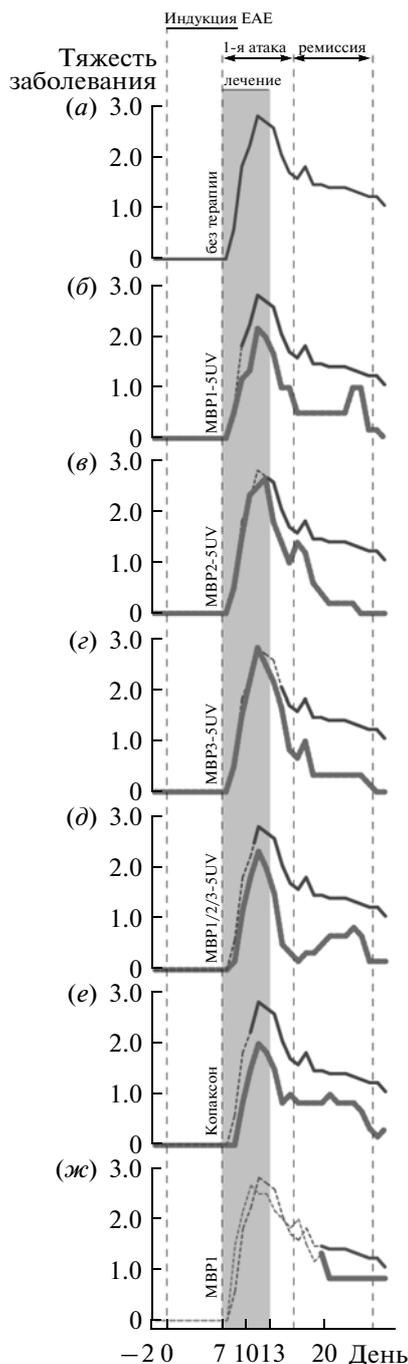
<sup>2</sup>  $p > 0.05$  статистически недостоверное различие в сравнении с отрицательным контролем; дисперсионный анализ для непараметрической статистики методом Вилкоксона.

<sup>3</sup> Интерквартильное значение.

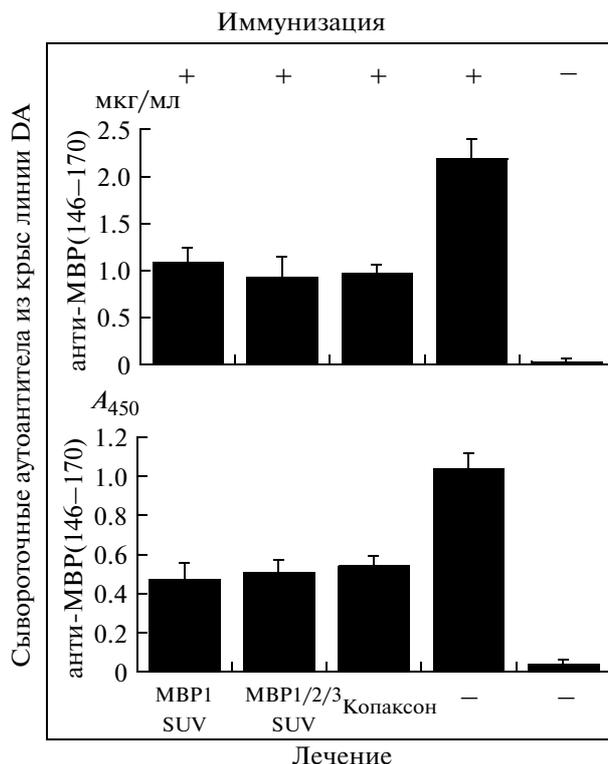
мированию многослойных липосом. (3) Обработка липосом высоким давлением с образованием однослойных липосом. (4) Криосушка однослойных липосом с добавленными пептидами. В результате осуществления данной стадии пептиды расположены между сжатыми однослойными липосомами. (5) Инкапсуляция пептидов в однослойные липосомы размера 60–100 нм, содержащие 1% маннозных остатков на своей поверхности, происходит во время вторичной регидратации. Для проведения дальнейших экспериментов нами были созданы четыре варианта композиций липосом с пептидами: в липосомы инкапсулировали три пептида по отдельности, а также эквимольную смесь пептидов.

Для изучения терапевтических свойств отобранных фрагментов MBP мы проводили подкожные инъекции пептидов в составе липосом крысам линии DA с индуцированным ЕАЕ (табл. 1). В отличие от предварительных экспериментов, иммунизацию животных осуществляли

пептидом MBP-(63–81) для получения более воспроизводимой клинической картины. В качестве положительного и отрицательного контроля были использованы копаксон и липосомы без пептидов. Терапию пептидами начинали в момент проявления первых признаков развития заболевания. В группе животных, которым вводили пустые липосомы, наблюдалась наибольшая смертность (3/17), один смертельный случай был зарегистрирован в группе MBP2-SUV (1/11), в остальных группах все животные выжили (табл. 2). В группах животных, которым вводили MBP1-SUV, MBP1/2/3-SUV и копаксон, наблюдалось максимальное и статистически достоверное снижение уровня развития заболевания (рис. 3, табл. 2). Для супрессии заболевания на начальной стадии наиболее эффективным оказалось введение MBP1-SUV (рис. 3б), в то время как пептиды MBP2 и MBP3 снижали уровень развития заболевания на стадии вторичного обострения (рис. 3в, г).



**Рис. 3.** Терапия ЕАЕ в крысах линии DA иммунодоминантными пептидами МВР, инкапсулированными в наноконтейнеры. Экспериментальные группы животных оценивали по интегральной степени развития симптомов заболевания. Значения для контрольной группы животных (а) обозначены черной линией на всех графиках (а–ж). Терапия иммунодоминантными инкапсулированными фрагментами МВР1, МВР2, МВР3, а также смесью пептидов МВР1/2/3 (б–д). В качестве положительного контроля эффективности терапии использовали копаксон (е). Эффект пептида МВР1 без инкапсуляции в липосомы показан на рисунке (ж). На всех панелях сплошная линия обозначает наличие статистически достоверного различия, пунктирная – его отсутствие.



**Рис. 4.** Сравнение титра сывороточных антител к полноразмерному МВР и его фрагменту 146–170 в крысах линии DA с ЕАЕ, которым вводили МВР1-SUV, МВР1/2/3-SUV и копаксон, а также в контрольной группе с индуцированным и неиндуцированным ЕАЕ.

Совместное введение пептидов МВР1/2/3 (рис. 3д) значительно снизило степень развития патологии на всех стадия развития ЕАЕ, о чем свидетельствует значение средней кумулятивной степени развития заболевания (табл. 2). Применение копаксона (рис. 3е) оказалось близким по эффективности к действию смеси МВР1/2/3 в составе липосом.

Основным преимуществом терапии инкапсулированными пептидами над копаксоном является полное восстановление крыс после проведения терапии. Как и ожидалось, введение пептида МВР1 без предварительной инкапсуляции в липосомы значительно снижает его терапевтический эффект (рис. 3ж), что свидетельствует о важности использования процесса липосомирования в предложенном подходе. Дополнительно нами были сопоставлены титры сывороточных антител к полноразмерному МВР и его фрагменту МВР-(146–170) (рис. 4). При введении МВР1/2/3 и копаксона в сравнении с контрольной группой наблюдалось значительное снижение титра анти-МВР-антител (рис. 4).

В настоящей работе нам удалось впервые определить фрагменты МВР, иммунодоминантные при развитии ЕАЕ у крыс линии DA. Совместное

введение данных пептидов в составе маннозилированных однослойных липосом существенно снижает общее течение заболевания, улучшает выход опытных животных из стадии обострения, а также понижает титр сывороточных аутоантител к МВР. Полученные результаты могут служить основой для дальнейшего продвижения разработанных композиций в качестве перспективного лекарственного средства для терапии рассеянного склероза.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**В работе использованы:** адьювант Фрейнда (Sigma), туберкулин,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , БСА (Sigma),  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Tween (Helicon), крысиные анти-МВР-антитела (Abscam), анти-крысиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma), ТМВ – тетраметилбензидин (Иммунотек), фосфорная кислота, фосфатидил животного происхождения, ManDOG,  $\text{CHCl}_3$  (все Sigma), копаксон™ (Teva, Израиль).

**Оборудование.** ИФА проводили с использованием 96-луночных планшетов (MaxiSorp, Nunc), на качалках Biosan. Значения оптического поглощения измеряли на планшетном спектрофотометре Varioscan (Thermo, USA). Средний поверхностный заряд и диаметр липосом был измерен на приборе Brookhaven ZetaPlus zeta sizer. Для создания SUV использовали гомогенизатор высокого давления серии TS. Лиофилизацию липосом проводили на приборе Labconco Freeze Dry Systems. Хроматографию проводили на приборе Waters 1525.

**Пациенты с рассеянным склерозом.** Замороженные образцы сыворотки крови 10 пациентов с достоверным диагнозом РС были любезно предоставлены Московским городским центром рассеянного склероза при Городской клинической больнице № 11. Средний возраст больных составил 36.3 года (от 25 до 55 лет). В соответствии с расширенной шкалой инвалидизации (Expanded disability status scale – EDSS) тяжесть поражения ЦНС у данных пациентов варьировалась от 0 до 4 (при градации от 0 до 10) [21]. Все пациенты имели ремитирующий или вторично-прогрессирующий тип течения болезни с обострениями. Данные пациенты не получали кортикостероидные препараты в течении месяца, предшествовавшего забору крови. В соответствии с этическим комитетом клинической больницы №11 и согласно указаниям Министерства Здравоохранения РФ от всех пациентов было получено подтверждающее информационное соглашение.

**Индукция и терапия ЕАЕ в крысах линии DA.** Эксперименты проводили в медицинском центре им. Асаф Арофе Израиль (Assaf Harofeh Medical Center, Zerifin, Israel) с соблюдением всех регла-

ментированных этических норм. Индукцию ЕАЕ проводили в 8–9 недельных самках крыс линии Dark Aguti. Крысам подкожно вводили в основание хвоста 200 мкл инокулята, содержащего гомогенат спинного мозга крысы, приготовленного по стандартной методике, либо 50 мкг пептида МВР-(63–81) (ANASPEC) в смеси физиологического буфера с полным адьювантом Фрейнда (1 : 1). Для экспериментов отбирали животных, у которых развивались первичные симптомы ЕАЕ. Сформированным экспериментальным группам на 6 день после индукции ЕАЕ делали в основание хвоста ежедневные подкожные инъекции липосом с различными композициями пептидов, копаксона, а также плацебо (суммарно 6 инъекций) (табл. 1). Тяжесть развития аутоиммунной патологии определяли 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.

**Индукция ЕАЕ в мышцах линии SJL и C57BL/6.** Эксперименты проводили в медицинском центре им. Асаф Арофе (Израиль) с соблюдением всех регламентированных этических норм. ЕАЕ индуцировали в самках мышей линии SJL в возрасте от 6 до 8 недель с SPF (specified pathogen free) статусом в соответствии с протоколом [22] путем введения 50 мкг МВР в полном адьюванте Фрейнда, содержащем туберкулин в концентрации 2 мг/мл. Самки мышей линии C57BL/6 с SPF статусом для индукции ЕАЕ были иммунизированы в соответствии с установленным протоколом [23]. Животным вводили 100 мкг внеклеточного домена миелинолигодендрокитарного гликопротеина в полном адьюванте Фрейнда, содержащем 0.5 мг/мл туберкулина. Между 14 и 28 днем после иммунизации животные с развивающимися симптомами заболевания были использованы для дальнейших исследований.

**Иммуноферментный анализ.** В 96-луночные планшеты вносили по 50 мкл раствора, содержащего 10 мкг/мл МВР или пептида-фрагмента МВР в карбонатном буфере с pH 9.6 и инкубировали 14 ч при +4°C. Лунки 3 раза промывали раствором PBS–0.15% Tween 20, далее блокировали 1 ч путем добавления 250 мкл раствора 2% БСА в карбонатном буфере при +37°C. После отмывки в лунки вносили разбавления интактных сывороточных антител в растворе PBS–15% Tween, содержащем 0.5% БСА. Антитела добавляли в объеме 50 мкл в разведениях от 1 : 1000 до 1 : 50000, в качестве контроля были использованы моноклональные крысиные анти-МВР-антитела. После инкубации 1 ч при +37°C и отмывки в лунки вносили 50 мкл антител, специфичных к крысиным IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 4000. После инкубации 1 ч при +37°C и отмывки в лунки вносили по 50 мкл

ТМВ. После 10-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10% фосфорной кислоты. Значения оптического поглощения были измерены на планшетном спектрофотометре. Блоттинг по Вестерну проводили по стандартной методике с использованием системы детекции ECL Plus (Amersham). Моноклональные антитела к с-тус-эптиопу и МВР использовали в разведениях 1 : 10000 и 1 : 5000 соответственно.

**Приготовление липосом.** Маннозилированные однослойные липосомы (SUV) были реконструированы из смеси фосфатидилхолина животного происхождения и синтетического маннозилированного DOG (в молярном соотношении 1 : 100) методом гомогенизации высоким давлением [24]. Липидная смесь (100 мг/мл) в  $\text{CHCl}_3$  была выпарена и затем ресуспендирована в mQ до конечной концентрации липидов 50 мг/мл с последующей гомогенизацией высоким давлением ( $2 \times 20000$  PSI). Полученные SUV были смешаны с пептидами в массовом соотношении 330 : 1 соответственно и подвергнуты криогенной сушке. После вторичной регидратации полученные SUV осадили ультрацентрифугированием. Полученный осадок растворяли в PBS. Включение пептидов было установлено методом высокоэффективной обращено-фазовой хроматографии. Средний поверхностный заряд и диаметр липосом был измерен на приборе Brookhaven ZetaPlus zeta sizer при 25°C путем разбавления 20 мкл суспензии липосом 0.001 М раствором PBS.

### ВЫВОДЫ

В настоящей работе нам удалось впервые определить фрагменты МВР, иммунодоминантные при развитии ЕАЕ у крыс линии DA. Совместное введение данных пептидов в составе маннозилированных однослойных липосом существенно снижает общее течение заболевания наравне с ко-паксоном. Применение липосомированных препаратов улучшает выход опытных животных из стадии ремиссии, а также понижает титр сывороточных аутоантител к МВР. Полученные результаты могут служить основой для дальнейшего продвижения разработанных композиций в качестве перспективного лекарственного средства для терапии рассеянного склероза.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена в рамках госконтракта ГК от 02 марта 2009 г. № 02.512.12.2026, “Работы по проведению проблемно-ориентированных поисковых исследований и созданию научно-технического задела в области геномных и постгеномных технологий создания лекарственных средств с участием организаций Франции”. А также при поддержке грантов РФФИ 10-04-

00673-а Искусственные ферменты; 07-04-92168-НЦНИ\_a Каталитические антитела при аутоиммунных заболеваниях: характеристика, терапевтический потенциал, селекция пептидных ингибиторов и терапевтических пептидомиметиков; CRP/RUS09-01 The role of B cell response in Multiple Sclerosis; Программа фундаментальных исследований Президиума РАН No. 27 “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов”; Нанолечение для лечения нейродегенеративных заболеваний, сконструированные на основе фрагментов основного белка миелина компартиментализованных в липосомные контейнеры.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hohlfeld R., Wekerle H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101(2). P. 14599–14606.
2. *Frohman E.M., Racke M.K., Raine C.S.* // N. Engl. J. Med. 2006. V. 354(9). P. 942–955.
3. *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.
4. *Belogurov A.A., Kurkova I.N., Misikov V.K., Suchkov S.V., Telegin G.B., Alekhine A.I., Goncharov N.G., Knorre V.D., Gabibov A.G., Ponomarenko N.A.* // Dokl. Biochem. Biophys. 2007. V. 413. P. 61–64.
5. *Legostaeva G.A., Polosukhina D.I., Bezuglova A.M., Doronin B.M., Buneva V.N., Nevinsky G.A.* // J. Cell. Mol. Med. 2010. V. 14(3). P. 699–709.
6. *Luca M.E., Kel J.M., van Rijs W., Wouter Drijfhout J., Koning F., Nagelkerken L.* // J. Neuroimmunol. 2005. V. 160. P. 178–187.
7. *Katsara M., Deraos G., Tselios T., Matsoukas M.T., Friligou I., Matsoukas J., Apostolopoulos V.* // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 214–218.
8. *Warren K.G., Catz I., Ferenczi L.Z., Krantz M.J.* // Eur. J. Neurol. 2006. V. 13(8). P. 887–895.
9. *Fontoura P., Garren H.* // Results Probl. Cell. Differ. 2010. V. 51. P. 259–285.
10. *Katsara M., Yuriev E., Ramsland P.A., Deraos G., Tselios T., Matsoukas J., Apostolopoulos V.* // J. Neuroimmunol. 2008. V. 200(1–2). P. 77–89.
11. *Aharoni R., Kayhan B., Eilam R., Sela M., Arnon R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100(24). P. 14157–14162.
12. *Hauser S.L., Waubant E., Arnold D.L., Vollmer T., Antel J., Fox R.J., Bar-Or A., Panzara M., Sankar N., Agarwal S. et al.* // N. Engl. J. Med. 2008. V. 358(7). P. 676–688.
13. *Rose J.W., Watt H.E., White A.T., Carlson N.G.* // Ann. Neurol. 2004. V. 56(6). P. 864–867.
14. *Coles A., Deans J., Compston A.* // Clin. Neurol. Neurosurg. 2004. V. 106(3). P. 270–274.
15. *Belogurov A.A., Jr., Kurkova I.N., Friboulet A., Thomas D., Misikov V.K., Zakharova M.Y., Such-*

- kov S.V., Kotov S.V., Alehin A.I., Avalle B.* // *J. Immunol.* 2008. V. 180(2). P. 1258–1267.
16. *Bielekova B., Sung M.H., Kadom N., Simon R., McFarland H., Martin R.* // *J. Immunol.* 2004. V. 172(6). P. 3893–3904.
17. *Miyakoshi A., Yoon W.K., Jee Y., Matsumoto Y.* // *J. Immunol.* 2003. V. 170(12). P. 6371–6378.
18. *Sercarz E.E., Lehmann P.V., Ametani A., Benichou G., Miller A., Moudgil K.* // *Annu. Rev. Immunol.* 1993. V. 11. P. 729–766.
19. *St. Louis J., Chan E.L., Singh B., Strejan G.H.* // *J. Neuroimmunol.* 1997. V. 73(1–2). P. 90–100.
20. *Avrilionis K., Boggs J.M.* // *J. Neuroimmunol.* 1991. V. 35(1–3). P. 201–210.
21. *Kurtzke J.F.* // *Neurology.* 1983. V. 33(11). P. 1444–1452.
22. *Coligan J.E. and National Institutes of Health (U.S.)* // *Curr. Protoc. Immunol.* 1992. V 5.
23. *Oliver A.R., Lyon G.M., Ruddle N.H.* // *J. Immunol.* 2003. V. 171(1). P. 462–468.
24. *Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A. et al.* // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47(1). P. 87–95.

## Therapeutic Effect of Encapsulated into the Nanocontainers MBP Immunodominant Peptides on EAE Development in DA Rats

**A. V. Stepanov\***, **A. A. Belogurov\***, \*\*, #, **A. E. Mamedov\***, **D. Melamed\*\*\***, **I. V. Smirnov\***, **E. S. Kuzina\***, \*\*\*\*, **D. D. Genkin\*\*\*\*\***, **A. N. Boyko\*\*\*\*\***, **S. N. Sharanova\*\*\*\*\***, **A. Bacon\*\*\*\*\***, **N. A. Ponomarenko\***, **A. G. Gabibov\***, \*\*

# Phone: (499) 724-72-99; e-mail: belogurov@mx.ibch.ru

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova, 34/5, Moscow, 119334 Russia

\*\*\*Assaf Harofeh Medical Center, Zerifin, 70300 Israel

\*\*\*\*Chemistry department of Moscow State University, Leninskie Gory, 1, build. 3, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*\*\*Lipoxen plc, London Bioscience Innovation Centre, 2 Royal College Street, London, NW1 0NH United Kingdom

\*\*\*\*\*Russian State Medical University department of neurology and neurosurgery; Moscow city center for multiple sclerosis, State Clinical Hospital № 11, Dvintsev 6, Moscow, 127018 Russia

Multiple Sclerosis (MS) is a severe autoimmune neurodegenerative disease. Development of innovative approaches of MS treatment is of a high priority in the modern immunology and pharmacy. In the present study we showed high therapeutic efficiency of immunodominant peptides of myelin basic protein (MBP) incorporated into the monolayer mannosylated liposomes on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in DA rats. MBP is a component of oligodendrocytes' membrane, which form axonal sheath, and is one of the major autoantigens in MS. We analyzed binding pattern of anti-MBP autoantibodies from MS patients using previously designed MBP epitope library. Utilizing the same approach we investigated pool of anti-MBP antibodies from SJL/J and C57/BL6 mice and DA rats with induced EAE. The most relevant rodent model to MS was EAE in DA rats according to the autoantibodies' binding pattern. We selected three immunodominant MBP fragments encapsulated in monolayer mannosylated liposomes for the following treatment of verified DA rodent model. MBP fragment 46–62 was the most effective in reducing of the first EAE attack, whereas MBP 124–139 and 147–160 inhibited development of pathology during remission stage. Simultaneous administration of these peptides in liposomes significantly decreased level of anti-MBP antibodies. Synergetic therapeutic effect of MBP fragments reduced integral disease score by inhibiting first EAE wave and subsequent remission, thus, our findings disclosure novel approaches for efficient treatment of Multiple Sclerosis.

*Keywords: myelin basic protein, liposome technology, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), multiple sclerosis, glatiramer acetate.*