

УДК 612.017.1

ДНК вакцинация как наиболее эффективный и приемлемый метод при болезни Альцгеймера

А.А.Овакимян

*НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии
им. А.Б. Алексаняна МЗ РА
0060, Ереван, ул. Худякова, 1*

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, иммунотерапия, ДНК-вакцина, эпитоп, электропорация, антитело

Доклинические и клинические данные свидетельствуют о том, что развитие безопасной и эффективной анти-амилоид-бета (Аβ) иммунотерапии для лечения болезни Альцгеймера (БА) требует терапевтических уровней анти-Аβ антител, избегая при этом образования аутореактивных Т-клеток. Первое клиническое испытание по средствам активной иммунизации с применением AN1792 вакцины было остановлено, так как у 6% больных БА развился асептический менингоэнцефалит, связанный с активацией аутоиммунных Т-клеток типа Т-хелпер 1 (Тх1) [4]. Первое пассивное иммунотерапевтическое испытание с применением бацинеузамаба, гуманизированного моноклонального антитела против Аβ, столкнулось с дозозависимым препятствием [22]. Однако активная иммунизация в отличие от пассивной имеет ряд таких существенных преимуществ, как низкая стоимость и типичный стойкий протокол иммунизации пациентов. Очевидно, что усовершенствование структуры вакцины против БА требует повышения как безопасности, так и эффективности анти-Аβ иммунотерапии. Активная вакцина может быть основана на пептиде, рекомбинантном белке или же на ДНК, которая обеспечит *in vivo* синтез антигена. Однако ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ по сравнению с белковыми и вирусными вакцинами. ДНК-плазмиды относительно безопасны, экономически выгодны и способны поддерживать приемлемые уровни экспрессии антигена в клетках [1,5,13,14,17,20,26,28]. ДНК-вакцинами можно легко манипулировать с целью модификации генов для индуцирования нужного типа иммунной реакции. Учитывая эти факты, считается, что в настоящее время создание ДНК-вакцины является наиболее актуальным и доступным.

Целью данной работы является изучение гуморального ответа при использовании MultiTER ДНК-вакцины, разработанной научной группой под руководством докторов М.Агаджаняна и А.Гочикян [8].

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенной формой слабоумия у пожилых людей и клинически характеризуется постепенным началом и прогрессивным снижением когнитивных функций, в конечном итоге приводящих к смерти, как правило, в течение 10 лет после установления диагноза. По прогнозам, количество больных во всем мире к 2025 году достигнет 32 млн. Нейропатологические особенности болезни включают нейрофибриллярные клубки, отложение А β в сенильные бляшки и гибель нейрональных клеток пораженных областей центральной нервной системы [18]. Критической целью для разработки направлений терапевтического вмешательства на данный момент является идентификация подходящих мишеней. А β пептид, который образуется в

результате протеолиза белка-предшественника – APP β - и γ -секретазами [7,23,24]

по «амилоидной гипотезе», играет ключевую роль в возникновении и прогрессировании БА [9-11]. Соответственно, многие методы лечения в настоящее время направлены на снижение уровня А β в мозге [3,12]. В настоящее время не существует эффективного лечения БА. Поэтому новые терапевтические подходы для лечения БА имеют важное значение. Анти-А β иммунотерапия представляет собой потенциально мощную стратегию сокращения патологической формы А β в мозге пациентов с БА [15,21,22].

Испытания ДНК-вакцины, состоящей из чужеродного Т-клеточного эпитопа и небольшого собственного В-клеточного эпитопа, показали ее иммуногенность, безопасность и эффективность в мышинных [16] и кроличьих моделях [8]. Для того, чтобы повысить эффективность трансфекции ДНК в клетки, была использована TriGrid система электропорации (ЭП) [2,27]. ЭП может увеличить экспрессию генов *in vivo* от 100 до 1000 раз по сравнению с инъекцией плазмиды ДНК посредством иглы [19,29]. С целью дальнейшего внедрения этой вакцины в клинические испытания мы проверили ее В-клеточный иммунный ответ на макаках-резусах.

Материал и методы

В данном исследовании были использованы восемь макак (самцы) в возрасте от 2 лет и 8 месяцев до 3 лет и 9 месяцев, массой 3.4-5.7 кг. Макак содержали в соответствии со стандартными нормами и ежедневным мониторингом состояния их здоровья, включающими проверку приема пищи, активности, внешнего вида и консистенции стула. Масса тела животных измерялась до начала первой вакцинации, до последующей вакцинации и после забора крови.

Первая группа, состоящая из 5 макак, была иммунизирована MultiTER ДНК-вакциной (4 мг ДНК на одно животное). Вторая группа, состоящая из 3 макак, в качестве отрицательного контроля была иммунизирована пустым pVAX1 вектором (4 мг pVAX1 на одно животное). Обе

экспериментальные группы с помощью ЭП внутримышечно были вакцинированы на 0, 2 и 6-й неделе. Сыворотки, изолированные из крови макак на 0, 2, 4, 8, 17 и 26-й неделе, были использованы для анализа специфичного ответа антител (рис. 1).

Детекция и изотипирование анти-Аβ антител. Концентрации анти-Аβ антител были определены иммуноферментным анализом (ИФА) [6]. 96-луночные микропланшеты (Immunol 2HB; Fisher Scientific, Chino, CA) были покрыты 50 мкл (100 мкг/мл) растворимым Аβ₄₂ (pH 9.7) и были инкубированы на всю ночь при 4°C. Лунки были промыты и блокированы солевым буферным раствором с 3% бычьим сывороточным альбумином и инкубированы на ночь при 4°C. Затем в лунки было добавлено 50 мкл сыворотки из контрольной и экспериментальной групп с разными разведениями. После инкубации и промывки были добавлены конъюгированные с пероксидазой хрена анти-обезьяньи IgG (1:5000; Pierce, Rockford, IL) в качестве вторичных антител с последующим инкубированием и добавлением тетраметилбензидина (ТМБ) в качестве субстрата. Ферментативная реакция была остановлена 2М H₂SO₄. Оптическая плотность (ОП) была измерена при длине волны 450 нм (Biotek, Synergy HT, Winooski, VT). Титры антител были определены на основании результатов самых высоких разведений, которые в два раза превышали граничное (фоновое) значение. Фоновое значение было определено в неиммунной сыворотке с тем же разбавлением. Для определения титров сыворотки были разбавлены от 1:19 600 до 1:137.5. Титры изотипов анти-Аβ антител были определены в сыворотках, полученных на 0-й и 8-й неделе в разведении 1:200 с применением конъюгированных с пероксидазой хрена анти-обезьяньими IgG (Fitzgerald Industries International, Inc., Acton, MA) и IgM (Alpha Diagnostic Intel, Inc., San Antonio, TX) в качестве вторичных антител в разведениях от 1:50 000 до 1:2000 соответственно. Значения ОП сывороток 0-й недели были вычтены из значений ОП сывороток 8-й недели.

Результаты и обсуждение

Учитывая тот факт, что метод доставки ДНК с помощью ЭП был достаточно эффективен в исследованиях, проведенных на людях [2,27], было решено применить ее и для иммунизации макак-резусов. Для оценки иммуногенности, на 0, 2 и 6-й неделе в дозе 4 мкг экспериментальной группе была введена вакцина, а контрольной группе пустой вектор. На 0, 2, 4, 8, 17 и 26-й неделе была забрана кровь животных для детекции и изотипирования специфичных анти-Аβ антител (рис. 1).

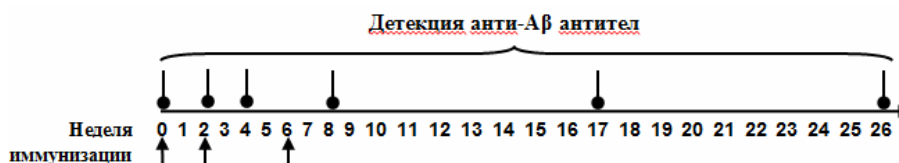
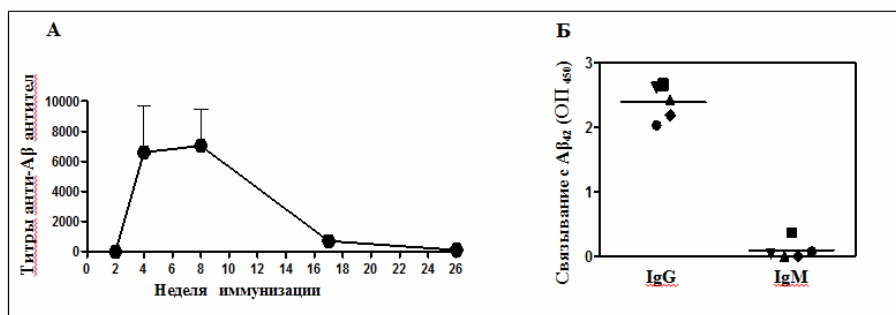


Рис. 1. Схематический обзор эксперимента

После второй иммунизации наблюдался сильный подъем гуморального иммунного ответа. Кроме того, даже на 17-й неделе у всех иммунизированных ДНК-вакциной животных были обнаружены специфичные анти-Аβ антитела. И, наконец, даже на 26-й неделе у трех животных из пяти обнаружили антитела к Аβ в низких концентрациях (рис.2А). Как и ожидалось, в контрольной группе не было обнаружено специфичных анти-Аβ антител (данные не представлены). Изотипирование антител сывороток, забранных на 8-й неделе, показали, что подавляющее большинство специ-



фичных анти-Аβ антител – это иммуноглобулины класса IgG (рис. 2 Б).

Рис. 2. Измерение титров специфичных анти-Аβ антител после второй и третьей иммунизации (А). IgG и IgM изотипирование антител в индивидуальных сыворотках животных, проведенное после третьей иммунизации (Б). Горизонтальные линии показывают среднее значение ОП при длине волны 450 нм

Полученные результаты показали, что ДНК-вакцина, основанная на MultiTER платформе, способна индуцировать сильный, долговременный, специфичный анти-Аβ иммунный ответ IgG класса, что косвенно говорит о преимущественном содействии в синтезе анти-Аβ антител цитокинов Th2-типа по сравнению с цитокинами Th1-типа [25]. В дальнейшем, мы

планируем охарактеризовать эти антитела и рассмотреть Т-клеточный ответ на данную вакцину, с целью последующего ее внедрения в клинические испытания.

Поступила 16.05.14

ԴՆԹ պատվաստումը որպես առավել արդյունավետ և համապատասխան մեթոդ Ալցհեյմերի հիվանդության դեմ

Ա.Ա.Հովակիմյան

Ալցհեյմերի հիվանդությունը (ԱՀ) բնութագրվում է կլինիկորեն զարգացող կոգնիտիվ խանգարումներով, որոնք որպես կանոն ի վերջո բերում են մահվան, ախտորոշումից հետո 10 տարվա ընթացքում: Ըստ կանխատեսումների՝ մինչև 2025 թ. հիվանդների քանակը ամբողջ աշխարհում կկրկնապատկվի՝ հասնելով մինչև 32 մլն:

Հիվանդության նյարդաբանական առանձնահատկությունները ներառում են նեյրոֆիբրիլյար կծիկներ, β -ամիլոիդի ($\text{A}\beta$) նստվածք, որը առաջացնում է կուտակումներ ուղեղում և բերում է նեյրոնների կորստին ուղեղի վնասված հատվածներում: Հետևաբար, թերապևտիկ միջամտությունները ուղղված են $\text{A}\beta$ -ի անոմալ տեսակների կուտակման դեմ: Ուղեղում $\text{A}\beta$ տոքսիկ տեսակների նվազեցման ամենահաջող միջոցներից մեկը իմունաթերապիան է:

Մենք առաջարկում ենք էպիտոպային պատվաստանյութի օգտագործումը $\text{A}\beta$ -ի դեմ՝ հզոր հակամարմիններ ստանալու նպատակով և աուտոռեակտիվ T-հեղպեր 1 (Th1) բջիջների ակտիվացման ռիսկի նվազեցման համար: Մենք ցույց ենք տվել, որ ԴՆԹ-ի վրա հիմնված ԱՀ էպիտոպային MultiTEP պատվաստանյութը առաջացնում է IgG ենթադասի հզոր երկարաժամկետ անտի- $\text{A}\beta$ հակամարմիններ: Հետագայում մենք պատրաստվում ենք բնութագրել այս հակամարմինները և ուսումնասիրել Th բջիջների պատասխանը տվյալ պատվաստանյութին:

DNA vaccination as the most effective and appropriate method against Alzheimer's disease

A.A.Hovakimyan

Alzheimer's disease (AD) is characterized clinically by progressive cognitive decline, eventually resulting in death, usually within 10 years of diagnosis. The affected number of individuals worldwide is supposed to double, reaching 32 million by 2025.

The neuropathological features of the disease include neurofibrillary tangles, deposition of amyloid- β (A β) in senile plaques, and neuronal loss in affected brain regions. Therefore, therapeutic interventions are aimed at inhibiting the accumulation of abnormal species of A β . One of the most promising strategies for reducing the level of toxic forms of A β in the brain is immunotherapy, which via specific antibodies could facilitate the clearance of amyloid deposits from the brain.

We have proposed an epitope vaccine strategy with the goal of generating potent antibody responses specific to A β and reducing the risk of inducing autoreactive Th cells through activation of T helper 1 (Th1) proinflammatory pathway. We have demonstrated that previously designed DNA-based MultiTEP epitope vaccine induces strong, long-term anti-A β antibody responses of IgG subclass. Furtherly, these antibodies will be characterized, and the Th cells response to this vaccine will be investigated.

Литература

1. Agadjanyan M.G., Ugen K., Wang B. *et al.* DNA inoculation with an HTLV-I envelope DNA construct elicits immune responses in rabbits. In: Chanock R.M.; Ginsberg H.S.; Brown F.; Lerner R.A., editors. *Vaccines '94: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY: 1994, p. 47-53.
2. Bureau M.F., Gehl J., Deleuze V., Mir L.M., Scherman D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1474:353-9 [PMID:10779687;4165(00)00028-3].
3. Cleary J.P., Walsh D.M., Hofmeister J.J. *et al.* Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.*, 2005; 8:79-84. [PubMed: 15608634].
4. Cribbs D.H., Ghochikyan A., Tran M. *et al.* Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int. Immunol.*, 2003; 15:505-514 [PubMed:12663680].
5. Davtyan H., Mkrtichyan M., Movsesyan N. *et al.* DNA prime-protein boost increased the titer, avidity and persistence of anti-A beta antibodies in wild-type mice. *Gene Ther.*, 2010; 17: 261-71.
6. Donnelly J.J., Liu M.A., Ulmer J.B. Antigen presentation and DNA vaccines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 162:S190-193 [PubMed: 11029393].
7. Esler W.P., Wolfe M.S. A Portrait of Alzheimer Secretases-New Features and Familiar Faces. *Science*, 2001; 293:1449-1454 [PubMed: 11520976].
8. Ghochikyan A., Davtyan H., Petrushina I., Hovakimyan A. *et al.* Refinement of a DNA based Alzheimer's disease epitope vaccine in rabbits, Human Vaccine and Immunotherapeutic, 2013, Feb. 11; 9(5).
9. Hardy J., Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991; 12:383-388 [PubMed: 1763432].
10. Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002; 297:353-356 [PubMed: 12130773].
11. Hardy J.A., Higgins G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992; 256:184-185 [PubMed: 1566067].
12. Jansen T.L., Tan A.C., Wollersheim H., Benraad T.J., Thien T. Age-dependent vasodilation of the skin microcirculation by atrial natriuretic factor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1991; 18:622-630 [PubMed: 1724541].

13. Kim J.J., Nottingham L.K., Tsai A., Lee D.J. *et al.* Antigen-specific humoral and cellular immune responses can be modulated in rhesus macaques through the use of IFN-gamma, IL-12, or IL-18 gene adjuvants. *Journal of Medical Primatology*, 1999; 28:214–223 [PubMed: 10593488].
14. Lu S., Arthos J., Montefiori D.C., Yasutomi Y. *et al.* Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *Journal of Virology*, 1996; 70:3978–3991 [PubMed: 8648735].
15. Monsonogo A., Weiner H.L. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science*, 2003; 302:834–838 [PubMed: 14593170].
16. Movsesyan N., Ghochikyan A., Mkrtichyan M., Petrushina I. *et al.* Reducing AD-like pathology in 3xTg-AD mouse model by DNA epitope vaccine – a novel immunotherapeutic strategy. *PLoS One*, 2008; 3:e2124; PMID:18461171; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002124>.
17. Pardoll D.M., Beckerleg A.M. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity*, 1995; 3:165–169 [PubMed: 7648389].
18. Price D.L., Sisodia S.S. Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models. *Annu Rev Med.*, 1994; 45:435–446. [PubMed: 8198393].
19. Rizzuto G., Cappelletti M., Maione D., Savino R. *et al.* Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96:6417–22; PMID:10339602; 10.1073/pnas.96.11.6417.
20. Salloway S., Sperling R., Gilman S., Fox N.C. *et al.* A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 2009; 73:2061–2070 [PubMed: 19923550].
21. Schenk D., Hagen M., Seubert P. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004; 16:599–606 [PubMed: 15342006].
22. Schenk D. Opinion: Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002; 3:824–828 [PubMed: 12360327].
23. Selkoe D.J. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J. Neuropath. and Exp. Neurology*, 1994; 53:438–447.
24. Selkoe D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 1991; 6:487–498 [PubMed: 1673054].
25. Snapper C.M., Paul W.E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 1987; 236: 944–947.
26. Tang D.C., De Vit M., Johnston S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 1992; 356:152–154 [PubMed: 1545867].
27. Vasan S., Hurley A., Schlesinger S.J., Hannaman D. *et al.* In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One*, 2011; 6:e19252.
28. Wang B., Ugen K.E., Srikantan V., Agadjanyan M.G. *et al.* Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90:4156–4160 [PubMed: 8483929].
29. Widera G., Austin M., Rabussay D., Goldbeck C. *et al.* Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J. Immunol.*, 2000; 164:4635–40; PMID:10779767.