

**НИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКОЙ
ПАРАЗИТОЛОГИИ им. А.Б. АЛЕКСАНИЯ МЗ РА**

ОВАКИМЯН АРМИНЕ АШОТОВНА

**СОЗДАНИЕ И ТЕСТИРОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ДНК-ВАКЦИН ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА МОДЕЛЯХ ЖИВОТНЫХ**

диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности

03.00.06 - «Вирусология, иммунология»

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Давтян Тигран Камоевич

ЕРЕВАН – 2015

О Г Л А В Л Е Н И Е

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Болезнь Альцгеймера.....	11
1.2 Применение иммунотерапии при болезни Альцгеймера.....	25
1.3 Роль иммунопрофилактики при болезни Альцгеймера.....	30
1.4 Разработка вакцин против болезни Альцгеймера	31
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	41
2.1 Экспериментальные животные.....	41
2.2 Конструирование ДНК-вакцин.....	41
2.3 Иммунопреципитация и вестерн-блоттинг.....	42
2.4 Процедура введения вакцин.....	42
2.5 Детекция, изотипирование анти-А β антител и картирование В-клеточного ответа.....	44
2.6 Определение продукции IFN- γ методом ELISPOT анализа.....	45
2.7 Анализ взаимодействия анти-А β_{1-11} антител с различными формами А β_{42} пептида методом поверхностно- плазмонного резонанса (SPR).....	46
2.8 Анализ нейротоксичности методом МТТ.....	46
2.9 Обнаружение А β бляшек в тканях мозга человека методом иммуногистохимии.....	47
2.10 Дот-блот анализ сывороток макак-резусов.....	48
2.11 Статистический анализ.....	48
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
ГЛАВА III. КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ВАКЦИНЫ AV-1955 И ОЦЕНКА ЕЁ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	49
3.1 Конструирование ДНК-вакцины AV-1955.....	49
3.2 Оценка экспрессии AV-1955 вакцины в клетках млекопитающих.....	53
ГЛАВА IV. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ AV-1955 ВАКЦИНЫ У КРОЛИКОВ.....	55
4.1 Предварительное тестирование иммуногенности ДНК-вакцины AV-1955 на мышях.....	55

4.2	Оценка гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцину AV-1955 у кроликов.....	57
4.3	Функциональные характеристики анти-A β антител, генерированных вакциной AV-1955 у кроликов.....	60
ГЛАВА V. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ AV- 1955 ВАКЦИНЫ НА МАКАКАХ-РЕЗУСАХ.....		65
5.1	Оценка гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцину AV-1955 у макак-резусов.....	65
5.2	Функциональные характеристики анти-A β антител, генерированных вакциной AV-1955 у макак-резусов.....	69
5.3	Продолжительность динамики иммунной реакции в ответ на AV-1955 у макак-резусов.....	72
ГЛАВА VI. МОДИФИЦИРОВАНИЕ AV-1955 И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЕЁ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА МЫШАХ И МАКАКАХ-РЕЗУСАХ.....		77
6.1	Модифицирование AV-1955 вакцины.....	77
6.2	Оценка иммунологической эффективности AV-1959 вакцины и её Сравнительная характеристика с AV-1955 у мышей.....	78
6.3	Иммунологическая эффективность AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 у макак-резусов.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		93
ВЫВОДЫ.....		100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		101

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AD (Alzheimer's disease) – Болезнь Альцгеймера

A β (Amyloid β) – Амилоид β

fA β (Fibrillar amyloid β) – Фибриллярный амилоид β

CAA (Cerebral amyloid angiopathy) – Церебральный амилоидная ангиопатия

Th-epitope (T helper epitope) – Т-хелперный эпитоп

APP (Amyloid precursor protein) – Белок-предшественник амилоида

ApoE (Apolipoprotein E) – Аполипопротеин E

ApoE- ϵ 4 (Allele in the gene for apolipoprotein E) – Аллель в гене аполипопротеина E

Tg (Transgenic) – Трансгенный

PET (Positron emission tomography) – Позитронно-эмиссионная томография

PADRE (Pan DR Epitope) – Пан DR эпитоп

PSEN1(Presenilin 1) – Пресенилин 1

PSEN2 (Presenilin 2) – Пресенилин 2

TT (Tetanus Toxin) – Токсин Столбняка

HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) – Поверхностный антиген вируса гепатита В

HBVnc (Hepatitis B nuclear capsid protein) – Белок ядерного капсида гепатита В

MCI (Mild cognitive impairment) – Умеренное когнитивное нарушение

MT (Influenza Matrix protein) – Матриксный белок вируса гриппа

MHC (Major Histocompatibility Complex) – Главного комплекса гистосовместимости

PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) – Мононуклеарных клеток периферической крови

IFN- γ (Interferon, Gamma) – Интерферон, Гамма

SD (Стандартное Отклонение) – Standard Deviation

TCR (T cell receptor) – Т-клеточный рецептор

BCR (B cell receptor) – В-клеточный рецептор

IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) – Комитет по уходу за животными и их использованию

FAD (Familial Alzheimer's disease) – Семейная болезнь Альцгеймера

FDA (Food and Drug Administration) – Управление контроля качества продуктов и лекарственных средств США

IMM (Institute for Molecular Medicine) – Институт молекулярной медицины

АПК – Антигенпрезентирующие клетки

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГЭБ – Гемато-энцефалический барьер

МРТ – Магнитно-резонансная томография

СМЖ – Спинномозговая жидкость

ЦНС – Центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется клинически прогрессирующими когнитивными нарушениями, в конечном итоге приводящими к смерти, как правило, в течение 10 лет после установления диагноза. По подсчётам ВОЗ около 47,5 млн. человек в мире живут с деменцией. Ежегодно возникает 7,7 миллиона новых случаев заболевания. Доля общего населения в возрасте 60 лет и старше с деменцией на какой-либо момент времени составляет от 5 до 8 человек на каждые 100 человек. По прогнозам, общее число людей с деменцией составит 75,6 миллиона человек в 2030 году и почти утроится к 2050 году и составит 135,5 миллиона. БА является наиболее частой причиной слабоумия – на нее приходится 60-70% всех случаев деменции. Проблема БА существует во всех странах мира, в том числе и в Армении. Статистические данные остаются наиболее изученными в США, где по состоянию на 2013 год 5,2 миллиона американцев различных возрастов имели данную болезнь [Alzheimer's Association, 2013]. Из них 5 миллионов человек 65-летнего возраста и старше и около 200000 человек моложе 65 лет с ранней формой заболевания. БА занимает 6-е место по смертности в США в целом, а в группе людей 65 лет и старше занимает 5-е место. Это единственная болезнь среди самых известных 10 в Америке, которую до сих пор не удастся предотвратить, вылечить и даже замедлить её прогрессирование. Смертность от БА в США увеличилась на 71% в период между 2000 и 2015 гг., в то время как смертность от других ведущих заболеваний снизилась [National Center for Health Statistics, 2015].

Невероятное количество финансовых затрат и времени уходит на заботу за больными БА. Затраты на каждого пациента (США) составляют в среднем 18000 долларов в год. По прогнозам, в США финансовые затраты на БА и другие деменции увеличатся с 226 млрд. долларов в 2015 году до 1,1 трлн. долларов в 2050 году [Alzheimer's Association, 2015]. Кроме того, в год 17,7 миллиардов часов тратится родственниками и друзьями на уход за больными БА.

БА является нейродегенеративным заболеванием, причина которого заключается в отложении аномальных бета-амилоидов ($A\beta_{42}$) с последующим образованием амилоидных бляшек [Hardy J, 1991]. Поэтому терапевтические мероприятия направлены на подавление накопления аномальных $A\beta$.

Одним из наиболее перспективных стратегий снижения уровня токсичных форм Аβ в мозге является иммунотерапия посредством специфических антител. Первое клиническое испытание вакцины AN1792, которое было начато, основываясь на том факте, что вакцина, содержащая фибриллярную Аβ₄₂, предотвращает отложение Аβ в трансгенной мышинной модели [Schenk D, 1999], было остановлено преждевременно, так как у 6% пациентов развился менингоэнцефалит. Посмертный анализ мозга пациентов показал её инфильтрацию Т-клетками. Это позволило предположить, что причина менингоэнцефалита связана с активацией аутореактивных Т-клеток специфических к Аβ₄₂ пептиду [Orgogozo J M, 2003]. Однако, важно отметить, что в этом исследовании вакцина смогла уменьшить Аβ-нагрузку у тех пациентов с БА, которые ответили на прививки синтезом достаточно высоких титров антител к Аβ.

Также были проведены клинические испытания с использованием анти-Аβ моноклональных антител [Pfizer/ Jenen, Eli-Lilly trials, 2008-2011]. Несмотря на то, что и эти клинические испытания потерпели неудачу, они показали, что иммунологический подход к проблеме может быть эффективен только в том случае, если будет профилактическим. Анализ данных показал статистически значимое замедление когнитивных нарушений у пациентов легкой, но не умеренной стадии БА при использовании моноклональных антител. Следует отметить, что при пассивной иммунизации необходимы частые инъекции антител в высоких дозах, которые могут привести к церебральной амилоидной ангиопатии (САА).

Последующие исследования показали, что антигенные детерминанты Аβ₄₂, презентруемые В- и Th-клеткам, локализованы в разных участках пептида Аβ₄₂, и антитела, специфичные к N-концевой области Аβ₄₂ значительно снижают Аβ-нагрузку в мозге amyloid precursor protein (APP) трансгенных мышей [Ghochikyan A, 2009]. На основании этих данных становится особенно перспективной стратегия эпитоп-основанной вакцины, где собственный Т-клеточный эпитоп можно заменить чужеродным эпитопом [Agadjanyan M G, 2005]. Следуя этой идее, целесообразно создание эпитоп-основанных вакцин, направленных против БА, состоящих из нескольких копий собственных В-клеточных эпитопов пептида Аβ₄₂, дополненных различными чужеродными Th-клеточными эпитопами (MultiTер) традиционных вакцин или различных патогенов, с которыми человек сталкивается в течение жизни,

например, эпитопы вируса гриппа. Такая стратегия может обеспечить индуцирование мощного антительного ответа, специфичного к Аβ и снизить риск активации аутореактивных Т-клеток [Ghochikyan A, 2009].

Иммуногенная 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. ДНК-вакцинами можно легко манипулировать с целью модификации генов для индуцирования нужного типа иммунной реакции. Таким образом, учитывая эти факты, мы считаем, что в настоящее время создание ДНК-вакцины является наиболее актуальным и доступным.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлась конструирование ДНК-вакцины, обладающей высокой иммуногенностью, эффективностью, безопасностью и тестирование её иммунологической эффективности на разных моделях животных.

Задачи исследования

1. Конструирование ДНК-вакцины на основе универсальной MultiTER платформы (AV-1955) и проверка её экспрессии в клетках млекопитающих.
2. Оценка В- и Т-клеточного иммунного ответа AV-1955 вакцины у мышей и кроликов.
3. Изучение В- и Т-клеточного иммунного ответа AV-1955 вакцины у макак-резусов.
4. Модифицирование AV-1955 и создание ДНК-вакцины на основе универсальной MultiTER платформы (AV-1959) с последующим тестированием её иммунологической эффективности на C57BL/6 мышах (H-2^b гаплотипа) в сравнении с AV-1955.
5. Тестирование В- и Т-клеточного иммунного ответа AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 на макаках-резусах.

Научная новизна

Полученные в настоящей работе данные существенно дополняют сведения о В- и Т-клеточном иммунном ответе на эпитоп-основанные ДНК-вакцины против БА у мышей, кроликов и макак-резусов. В данной диссертационной работе впервые:

1. С помощью ПЦР были синтезированы ДНК-вакцины AV-1955 и AV-1959 на основе MultiTER платформы, состоящие из трёх копий собственных В-клеточных эпитопов пептида $A\beta_{42}$ ($A\beta_{1-11}$) и девяти/двенадцати чужеродных Th-эпитопов соответственно.
2. Охарактеризован репертуар В- и Т-клеточного ответа у вакцинированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами макак-резусов, демонстрирующий индукцию антител, специфичных только к $A\beta$ и не стимулирующих В-клетки, продуцирующие антитела специфичные к чужеродным Th-эпитопам, использованным для дизайна MultiTER платформы, и, стимулирующие клеточный иммунный ответ специфичный к чужеродным Th-эпитопам, не распознающий собственные Т-клеточные эпитопы $A\beta_{42}$, приводящие к активации аутореактивных Т-клеток.
3. Исследовано влияние свободной N-концевой аспарагиновой кислоты В-клеточного эпитопа $A\beta_{1-11}$ на иммуногенность AV-1955 и AV-1959 вакцин у кроликов и макак-резусов.
4. Картированием В-клеточного ответа был выявлен самый короткий иммуногенный В-клеточный эпитоп $A\beta_{42}$ пептида ($A\beta_{2-6}$).
5. Обнаружено, что удаление аланина из AEFRHDSGYEVN ($A\beta_{2-13}$) пептида значительно снижает аффинитет анти- $A\beta$ антител, синтезированных у мышей и макак-резусов в ответ на иммунизацию AV-1955 и AV-1959 вакцинами.
6. Был выявлен длительно сохраняющийся гуморальный иммунный ответ посредством характеристики продолжительности динамики иммунного ответа у макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами.
7. Продемонстрирован широкий индивидуальный репертуар анти-MultiTER специфичных Th-клеток у индивидуальных макак-резусов, связанный с высокой полиморфностью генов MHCII.

Теоретическая и практическая значимость

Экспериментальные результаты данной диссертационной работы позволяют заключить, что AV-1955 и AV-1959 вакцины, учитывая их высокую иммуногенность, эффективность и безопасность за счёт активации долговременного В-клеточного иммунного ответа специфичного только к $A\beta_{42}$ и Т-клеточного иммунного ответа, распознающего исключительно чужеродные Th-клеточные эпитопы данных вакцин, без активации аутореактивного Т-клеточного ответа к собственным Т-клеточным эпитопам $A\beta_{42}$ у мышей, кроликов и макак-резусов, имеют потенциальную возможность быть тестированными в клинических испытаниях.

Апробация работы

Основные положения диссертации были доложены на лабораторных семинарах в Institute for Molecular Medicine (IMM), Huntington Beach, CA, USA, а также представлены на расширенном заседании ученого совета в Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders at the University of California, Irvine (UCI MIND) и НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б. Алексаняна МЗ РА.

Публикации

Основные результаты диссертации изложены в 5 печатных работах, опубликованных в научных журналах.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 117 страницах, содержит 30 рисунков и 2 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов и списка литературы, включающего 174 источника.

ГЛАВА I.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА), (также сенильная деменция альцгеймеровского типа) – наиболее распространённая форма деменции, нейродегенеративное заболевание, впервые описанное в 1906 году немецким психиатром Алоисом Альцгеймером. Как правило, она обнаруживается у людей старше 65 лет, но существует и ранняя болезнь Альцгеймера – редкая форма заболевания [Brookmeyer R et al, 1998]. По оценкам в США по состоянию на 2013 год 5,2 миллиона американцев всех возрастов имели данную болезнь. По прогнозам, количество больных во всем мире к 2025 году достигнет 53,2 млн. Каждые 68 секунд возникает новый носитель данного заболевания в США, а через 50 лет это число понизится до 33 секунд [Alzheimer's Association, 2014].

У каждого человека болезнь протекает по-своему, но при этом наблюдается ряд общих симптомов. Первые заметные проявления обычно по ошибке связывают с преклонным возрастом или объясняют влиянием стресса [Waldemar G et al, 2007].

Наиболее часто на ранних стадиях распознаётся расстройство кратковременной памяти, этот симптом может проявляться, например, неспособностью вспомнить недавно заученную информацию. При обращении к врачу и подозрении на БА для уточнения диагноза обычно анализируют поведение, проводят серию когнитивных тестов, если возможно, проводится магнитно-резонансная томография (МРТ).

С развитием болезни происходит потеря долговременной памяти [Tabert M et al, 2005, Waldemar G et al, 2007]. Постепенная потеря функций организма ведёт к смерти. Индивидуальный прогноз затруднён из-за вариаций в длительности течения болезни, которая может развиваться подспудно на протяжении длительного времени, прежде, чем станут заметны симптомы и будет поставлен диагноз. Средняя продолжительность жизни после установления диагноза составляет около семи лет [Mölsä P et al, 1986], менее трёх процентов больных живут более четырнадцати лет [Mölsä P et al, 1995].

В настоящее время не достигнуто полного понимания причин и патогенеза БА. Исследования свидетельствуют об ассоциации болезни с накоплением бляшек и

нейрофибриллярных клубков в тканях мозга [Tiraboschi P et al, 2004]. Современные методы терапии лишь несколько смягчают симптомы, но пока не позволяют ни остановить, ни замедлить развитие заболевания. Множество перспективных методов терапии достигли этапа клинических испытаний, число которых на 2008 год составляло более пятисот, однако неясно, будет ли доказана их эффективность. Две американские компании прекратили разработку некогда перспективного препарата для облегчения последствий потери памяти при БА после двух клинических исследований, в ходе которых средство не смогло помочь больным. Исследователи сообщили, что положительная динамика заболевания у пациентов в легкой или ранней стадии БА не отличалась от таковой в контрольной группе пациентов, которым давали плацебо. Компании Pfizer и Johnson&Johnson заявили, что все другие исследования в этой области были прекращены. В настоящее время лекарства от БА не существует. Предлагается множество способов предупредить БА, но не отмечено их воздействия на ход заболевания и его тяжесть. Как для предупреждения, так и для борьбы с болезнью часто рекомендуют заниматься физическими упражнениями, стимулировать мышление и придерживаться сбалансированной диеты.

БА принадлежит к заболеваниям, накладывающим самый тяжёлый финансовый груз на общество в развитых странах. По прогнозам, в США финансовые затраты увеличатся с 203 млрд. долларов в 2013 году до 1,2 трлн. долларов в 2050 году, кроме того, в год 17,5 миллиард часов тратится на уход больных БА родственниками и друзьями [Meek et al, 1998, Bonin-Guillaume et al, 2005].

Эпидемиология

Два основных показателя, используемых в эпидемиологических исследованиях – заболеваемость и распространённость заболевания. Заболеваемость отражает число новых случаев на единицу человеко-времени (обычно количество новых случаев на тысячу человеко-лет), а распространённость заболевания говорит об общем числе поражённых болезнью в популяции на конкретный момент времени.

На рисунке 1 продемонстрирована карта нетрудоспособности (оценивающая суммарное «бремя болезни») при болезни Альцгеймера и других деменциях на 100,000 населения в 2004 году.

Когортные длительные исследования (в ходе которых изначально здоровая популяция отслеживается на протяжении многих лет) свидетельствуют о

заболеваемости на уровне 10-15 новых случаев на тысячу человеко-лет для всех типов деменции и 5-8 случаев для болезни Альцгеймера [Bermejo-Pareja F et al., 2008; Di Carlo A et al., 2002], что составляет приблизительно половину от общего числа ежегодных диагнозов. Пожилой возраст является главным фактором риска, что отражается в статистике: на каждые пять лет после 65-летнего возраста показатель риска увеличивается примерно вдвое, вырастая от 3 случаев в 65 лет до 69 случаев на тысячу человеко-лет к 95 годам, [Bermejo-Pareja F et al., 2008; Di Carlo A et al., 2002]. Существуют и половые различия – женщины чаще заболевают БА, в особенности после 85 лет [Di Carlo A et al., 2002; Andersen K et al., 1999].

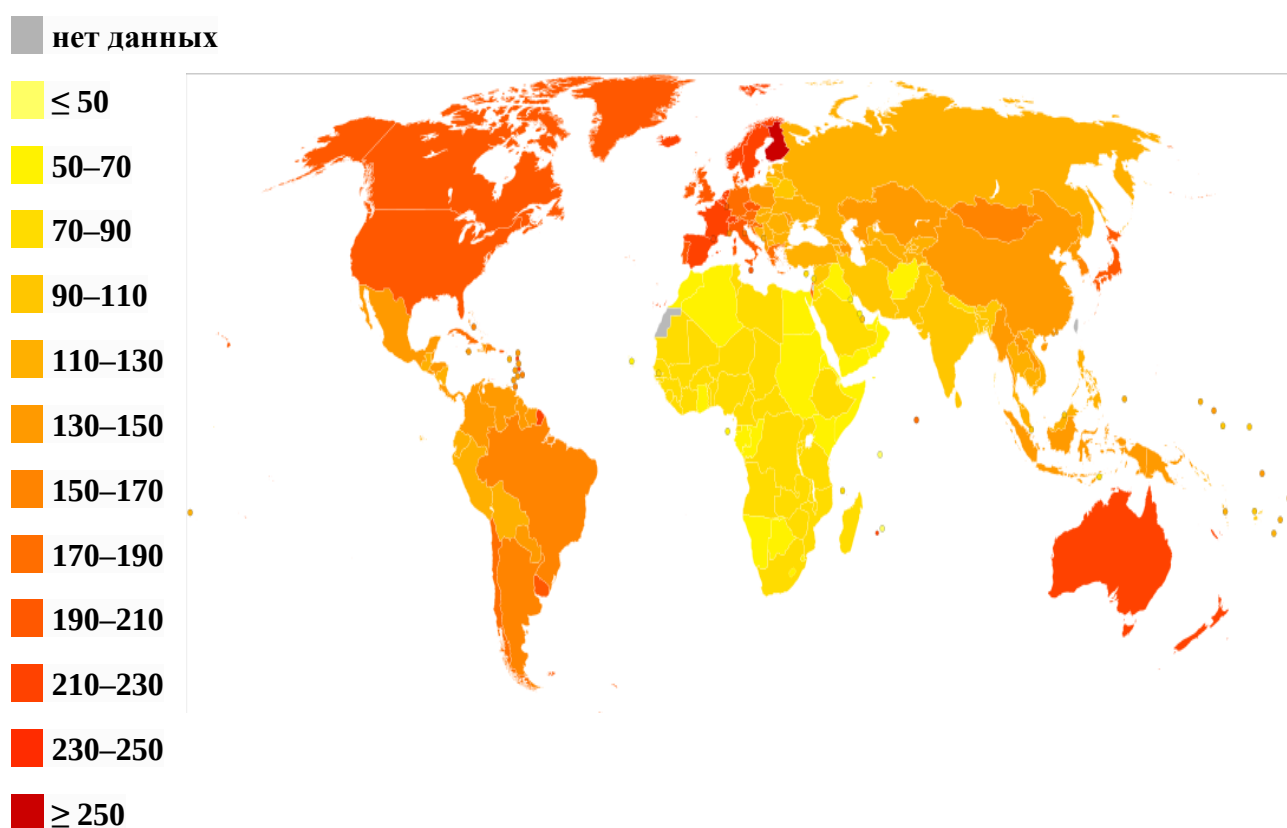


Рис. 1 Годы жизни, скорректированные по нетрудоспособности при болезни Альцгеймера и других деменциях на 100,000 населения в 2004 году (лица, всех возрастных групп) [Death and DALY estimates for 2004 by cause for WHO Member States].

БА является наиболее частой причиной слабоумия и составляет 60-70% всех случаев деменции. Распространённость болезни в популяции, зависит от различных

факторов, в том числе от заболеваемости и смертности. Поскольку заболеваемость растёт с возрастом, необходимо непременно учитывать средний возраст населения в исследуемой местности. В США по состоянию на 2000 год около 1,6 % населения, как в целом, так и в группе 65-74 лет, имели БА. В группе 75-84 лет этот показатель составлял уже 19 %, а среди граждан, чей возраст превысил 84 года, распространённость болезни составляла 42 %. [Hebert LE et al., 2003]. В менее развитых странах распространённость болезни ниже [Ferri CP et al., 2005]. По данным ВОЗ, в 2005 году деменцией страдали 0,379 % мирового населения, а прогноз на 2015 год достигает значения 0,441 % и ещё больший процент населения, 0,556 %, может быть поражён болезнью к 2030 году. К подобным выводам приходят и авторы других работ [Ferri CP et al., 2005]. Ещё одно исследование говорит о том, что в 2006 году распространённость болезни в мире составляла 0,40 % (разброс 0.17-0.89 %, абсолютное количество – 26.6 млн человек, с разбросом 11.4-59.4 млн) и предсказывает, что долевой показатель вырастет втрое, а абсолютное количество больных – вчетверо к 2050 году [Brookmeyer R et al., 2007].

Стадии болезни Альцгеймера

Ход болезни подразделяют на четыре стадии, с прогрессирующей картиной когнитивных и функциональных нарушений.

Предеменция. Первые симптомы часто путают с проявлениями старения или реакцией на стресс [Waldemar G et al, 2007]. Наиболее ранние когнитивные затруднения выявляются у некоторых людей при детальном нейрокогнитивном тестировании за восемь лет до постановки диагноза. Эти изначальные симптомы могут отражаться на выполнении не самых сложных повседневных задач [Pernecky R et al, 2006]. Наиболее заметно расстройство памяти, проявляющееся в затруднении при попытке вспомнить недавно заученные факты и в неспособности усвоить новую информацию [Arnáiz E et al, 2003, Kazui H et al, 2005]. Малозаметные проблемы исполнительных функций: сосредоточенности, планирования, когнитивной гибкости и абстрактного мышления, либо нарушение семантической памяти (память о значении слов, о взаимоотношении концепций), также могут быть симптомом ранних стадий БА [Rapp M et al, 2005, Spaan PE, Raaijmakers J et al, 2003]. На этой стадии может отмечаться апатия, которая остаётся самым устойчивым нейropsychиатрическим симптомом на всём протяжении заболевания. Также

преклиническую стадию называют, в зависимости от перевода разными авторами термина «mild cognitive impairment» (MCI) [Small B et al, 2007], «мягким когнитивным снижением» [Гаврилова С и др., 2003] или «умеренным когнитивным нарушением» [Захаров В и др., 2003], но ведутся споры о том, использовать ли последнее название для обозначения первой ступени БА либо выделить в отдельную диагностическую единицу [Petersen R et al, 2007].

Ранняя деменция. Прогрессирующее снижение памяти и агнозия при БА рано или поздно ведут к подтверждению диагноза. У небольшого числа пациентов при этом на первый план выступают не расстройства памяти, а нарушения речи, исполнительных функций, восприятия либо двигательные нарушения (апраксия) [Förstl H et al, 1999]. Болезнь по-разному отражается на различных аспектах памяти. Старые воспоминания о собственной жизни (эпизодическая память), давно заученные факты (семантическая память), имплицитная память (неосознанная «память тела» о последовательности действий, например, о том, как использовать столовые приборы) в меньшей степени подвержены расстройству по сравнению с новыми фактами или воспоминаниями [Carlesimo G et al, 1992, Jelicic M et al, 1995]. Афазия в основном характеризуется оскудением словарного запаса и сниженной беглостью речи, что в целом ослабляет способность к словесному и письменному выражению мыслей. На этой стадии болезни человек обычно способен адекватно оперировать простыми понятиями при речевом общении. При рисовании, письме, надевании одежды и других задачах с использованием тонкой моторики, человек может казаться неловким из-за определённых проблем с координацией и планированием движений [Benke T et al, 1993]. По мере развития болезни человек зачастую вполне способен выполнять многие задачи независимо, однако ему могут потребоваться помощь или присмотр при попытке провести манипуляции, требующие особенных когнитивных усилий [Förstl H et al, 1999].

Умеренная деменция. Способность к независимым действиям снижается из-за прогрессирующего ухудшения состояния [Förstl H et al, 1999]. Расстройства речи становятся очевидными, так как с потерей доступа к словарному запасу человек все чаще подбирает неверные слова на замену забытым (парафразия). Также идет потеря навыков чтения и письма [Frank E et al 1994, Forbes K et al, 2004]. Со временем всё более нарушается координация при выполнении сложных последовательностей

движений, что снижает способность человека справляться с большинством повседневных задач [Galasko D et al, 2005]. На этом этапе усиливаются проблемы с памятью, больной может не узнавать близких родственников. Прежде нетронутая долговременная память также нарушается [Sartori G et al, 2004] и отклонения в поведении становятся более заметными. Обычными являются такие нейропсихиатрические проявления, как бродяжничество, вечернее обострение (англ. sundowning) [Volicer L et al 2001], раздражительность и эмоциональная лабильность, проявляющаяся в плаче, спонтанной агрессии, в сопротивлении помощи и уходу. Синдром ложной идентификации и другие симптомы бреда развиваются примерно у 30% пациентов [Craig D et al 2005, Scarmeas N et al, 2007]. Может развиваться недержание мочи [Tatsch M et al, 2006]. У родственников больного и ухаживающих за ним лиц эти симптомы вызывают стресс, который может быть смягчён перемещением пациента из-под домашнего присмотра в стационарное заведение [Förstl H et al, 1999, Gold D et al, 1995].

Тяжелая деменция. На последней стадии БА пациент полностью зависит от посторонней помощи. Владение языком сокращается до использования единичных фраз и даже отдельных слов, и в итоге речь полностью теряется [Frank E et al, 1994]. Несмотря на утрату вербальных навыков, пациенты часто способны понимать и отвечать взаимностью на эмоциональные обращения к ним [Bär M et al, 2003]. Хотя на этом этапе все еще могут быть проявления агрессии, гораздо чаще состояние больного характеризуется апатией и истощением [Förstl H et al, 1999], и с какого-то момента он не в состоянии осуществить даже самое простое действие без чужой помощи. Больной теряет мышечную массу, передвигается с трудом и на определенном этапе оказывается не в силах покинуть кровать [Souren L et al, 1995], а затем и самостоятельно питаться [Berkhout A et al, 1998]. Смерть наступает обычно вследствие стороннего фактора, такого как пролежневая язва или пневмония и т. д. [Wada H et al, 2001, Gambassi G et al, 1999].

Этиология

Большинство случаев БА носит спорадический характер с поздним началом (старше 60 лет) и невыясненной этиологией. Вместе с тем от 5 до 15 % имеет семейный характер, половина этих случаев имеет более раннее начало (моложе 60 лет) и обычно связана со специфическими генетическими мутациями.

Генетическая предрасположенность является чётко установленным фактором риска БА. Причиной или фактором риска развития некоторых (если не всех) форм БА являются мутации или полиморфизмы в ряде генов. К настоящему времени обнаружено, по крайней мере, четыре гена, мутации в которых вызывают БА или являются факторами генетической предрасположенности:

- ген, кодирующий белок амилоидного предшественника (APP), локализованный на хромосоме 21 [Goate ea 1991],
- ген, кодирующий аполипопротеина E (ApoE), локализованный на хромосоме 19 [Sounders ea 1993],
- ген, кодирующий белок пресенилина-1 (PSEN1), локализованный на хромосоме 14,
- ген, кодирующий белок пресенилина-2 (PSEN2), локализованный на хромосоме 1 [Sherrington ea 1995, Rogaev ea 1995 , Levi-Lahad ea 1995].

Ген APP локализован на хромосоме 21, в экзонах 16, 17 которого было обнаружено несколько миссенс-мутаций. [Goate ea 1991, Murrell ea 1991, Chartier-Harlin ea 1991].

Массовый скрининг родословных и спорадических случаев во многих лабораториях мира показал, что мутации в APP могут объяснить причину БА только 3-5% всех родословных с ранним началом БА. В родословных с поздним началом БА мутаций в этом гене не было найдено вовсе [Tanzi ea 1992, Schellenberg ea 1991]. В норме APP является трансмембранным белком, который играет важную роль в росте нейрона, его выживании и восстановлении после повреждений [Priller C et al, 2006, Turner P et al, 2003]. В результате миссенс-мутаций APP подвергается протеолизу – разделяется на пептиды под воздействием β - и γ -секретазы, что приводит к развитию БА [Hooper N et al, 2005].

Обследование семей, в которых БА страдали несколько поколений, выявило два гена, участвующих в патогенезе этого заболевания, -ген PSEN1 и ген PSEN2.

Ген PSEN1 расположен на 14-й хромосоме и кодирует белок пресенилин-1. Мутация этого гена вызывает БА типа 3, которая наследуется аутосомно-доминантно с высокой пенетрантностью. В семьях с самой различной этнической принадлежностью выявлено более 20 мутаций гена PSEN1.

Ген PSEN2 расположен на 1-й хромосоме и кодирует белок пресенилин-2. Мутация этого гена впервые была обнаружена у американских потомков немцев Поволжья.

Оба гена очень похожи и кодируют сходные белки. Сначала полагали, что эти белки имеют семь трансмембранных доменов, однако дальнейшие исследования показали, что число доменов равно восьми, а девятый располагается у внутренней стороны мембраны. Функция этих белков в норме малоизучена, однако, известно, что пресенилин играет важную роль в протеолизе и превращениях различных сигнальных молекул. Оба белка экспрессируются в нейронах и широко распространены в нервной системе. Было показано, что мутированные формы пресенилина, являясь компонентой активного центра γ -секретазы, приводят к ее активации с последующим протеолизом APP [Edward H & Raphael K, 2004].

Доказано, что мутации гена PSEN1 – самая частая причина семейной БА с ранним началом, обуславливающая 70% случаев этой относительно редкой формы. БА типа 3, вызванная мутацией гена PSEN1, характеризуется более ранним началом (в среднем в 45 лет) и более быстрым прогрессированием (средняя продолжительность жизни больного 6-7 лет), чем БА типа 4, вызванная мутацией гена PSEN2 (начало в среднем в 53 года; средняя продолжительность жизни 11 лет). При некоторых редких мутациях гена PSEN2 заболевание начинается после 70 лет. Роль мутаций этих генов в патогенезе гораздо более частых спорадических форм БА с поздним началом не изучена. Установлено, что полиморфную ApoE- ϵ 4-аллель в гене аполипопротеина E (ApoE), локализованную на хромосоме 19, часто обнаруживают при спорадических и поздней семейной формах БА [Sounders ea 1993, Poirier ea 1993, Strittmater ea 1993]. ApoE- ϵ 4-аллель является биохимическим маркером БА и служит важным фактором риска возникновения БА [Bennett ea 1995].

Факторы риска развития БА

Хотя мы до сих пор не знаем всех причин, почему у некоторых людей возникает БА, а у других нет, исследования позволили лучше понять, какие факторы делают человека более уязвимым для болезни [Alzheimer's Association, 2014].

- *Возраст.* Пожилой возраст – главный фактор риска развития БА. Большинство людей с БА не моложе 65 лет. Хотя и гораздо реже, но БА (известная также как БА с ранним началом) может начаться и раньше 65 лет. По оценкам,

количество таких больных составляет до 5%. Зачастую проявления БА в более молодом возрасте диагностируются неправильно.

- *Родственники с болезнью Альцгеймера.* Если кто-то из ваших родителей или братьев и сестер страдает от БА, то у вас больше вероятность заболеть, чем у тех, кто не имеет таких ближайших родственников. Ученые не понимают до конца причин семейных случаев БА, но, возможно, что свою роль играют генетический и экологический факторы и стиль жизни.
- *Генетический фактор.* Ученые выявили несколько генов, мутации которых увеличивают риск развития БА. Аллель $\epsilon 4$ гена ApoE – наиболее распространенный ген риска БА; по имеющимся оценкам, он сыграл свою роль в развитии болезни примерно в четверти случаев. В отличие от гена риска, детерминирующий ген гарантирует развитие болезни. Известен только один случай, когда БА возникла в результате наследования детерминирующего гена. Развитие БА вследствие наличия детерминирующего гена происходит редко, менее чем в 1% случаев. БА, вызванная наличием детерминирующего гена, называется «аутосомно-доминантная болезнь Альцгеймера (АДБА)».
- *Умеренные когнитивные нарушения.* Симптомы умеренных когнитивных нарушений включают изменения в мыслительных процессах, но они не мешают выполнению повседневных функций и не такие серьезные, как при БА или других прогрессирующих деменциях. Наличие умеренных когнитивных нарушений, особенно связанных с проблемами с памятью, увеличивает риск развития БА и других деменций. Однако умеренные когнитивные нарушения не всегда прогрессируют. В некоторых случаях они обратимы или сохраняются на том же уровне.
- *Сердечно-сосудистые заболевания.* Исследования говорят о том, что здоровье мозга непосредственно связано со здоровьем сердечно-сосудистой системы. Через кровь мозг получает кислород и питательные вещества, необходимые для нормальной работы, а сердце отвечает за приток крови к головному мозгу. Следовательно, причины, которые приводят к сердечно-сосудистым заболеваниям, могут иметь отношение и к увеличению риска БА и других деменций. Среди них курение, избыточный вес, диабет, повышенные холестерин и кровяное давление в среднем возрасте.

- *Уровень образования и болезнь Альцгеймера.* Исследованиями установлена связь между меньшим количеством лет формального образования и повышенным риском БА и других деменций. Хотя очевидной причины для такой зависимости нет, некоторые ученые полагают, что большее количество лет формального образования, возможно, помогает укрепить связь между нейронами, позволяя тем самым головному мозгу использовать альтернативные пути передачи сигналов от нейрона к нейрону при изменениях, вызванных БА и другими деменциями.
- *Черепно-мозговые травмы.* Риск БА и других деменций возрастает в результате черепно-мозговых травм средней и тяжелой степени, таких как удары по голове или другие повреждения черепа, которые приводят к потере памяти или сознания более чем на 30 минут. 50% всех черепно-мозговых травм вызваны дорожно-транспортными происшествиями. Те, кто регулярно получает удары по голове и другие черепно-мозговые повреждения, например, спортсмены или участники боевых конфликтов, также находятся в группе повышенного риска развития деменции и нарушений когнитивных функций.

Нейропатологические и биохимические особенности БА

Нейропатологические особенности болезни включают нейрофибриллярные клубки, отложение $A\beta$ в сенильные бляшки и потерю нейрональных клеток пораженных областей центральной нервной системы (ЦНС) [Price D et al, 1994]. Эти патологические изменения приводят к обширной потере синапсов на протяжении заболевания, тем самым постепенно сокращая функциональные способности пациента. Болезнь характеризуется потерей нейронов и синаптических связей в коре головного мозга и определённых субкортикальных областях. Гибель клеток приводит к выраженной атрофии поражённых участков, в том числе к дегенерации височных и теменной долей, участков фронтальной коры и поясной извилины [Wenk GL et al, 2003].

Как амилоидные бляшки, так и нейрофибриллярные клубки хорошо заметны под микроскопом при посмертном анализе образцов мозга больных [Tiraboschi P et al, 2004]. Бляшки представляют собой плотные, в большинстве случаев нерастворимые отложения бета-амилоида и клеточного материала внутри и снаружи нейронов. Внутри нервных клеток они растут, образуя нерастворимые закрученные сплетения

волокон, часто называемые клубками. У многих пожилых людей в мозге образуется некоторое количество бляшек и клубков, однако при БА их больше в определённых участках мозга, таких как височные доли [Bouras C et al, 1994].

Замечено, что БА всегда сопровождается протеинопатией – накоплением в тканях мозга ненормально свёрнутых белков – бета-амилоида и тау-белка [Hashimoto M et al, 2003]. Бляшки образуются из малых пептидов длиной в 39-43 аминокислоты, именуемых бета-амилоидом (A-beta, A β). Бета-амилоид является фрагментом более крупного белка-предшественника – APP. Этот трансмембранный белок играет важную роль в росте нейрона, его выживании и восстановлении после повреждений [Priller C et al, 2006, Turner P et al 2003]. При БА по неизвестным пока причинам APP подвергается протеолизу – разделяется на пептиды под воздействием ферментов [Hooper N et al, 2005]. Бета-амилоидные нити, образованные одним из пептидов, слипаются в межклеточном пространстве в плотные образования, известные как сенильные бляшки [Ohnishi S et al, 2004, Tiraboschi P et al 2004].

Более специфически, БА относят также к таупатиям – болезням, связанным с ненормальной агрегацией тау-белка. Ряд исследований, проведённых на моделях трансгенных животных, показали, что A β патология приводит к tau патологии. Каждый нейрон содержит цитоскелет, отчасти составленный из микротрубочек, которые действуют подобно рельсам, направляя питательные вещества и другие молекулы из центра на периферию клетки, к окончанию аксона, и обратно. Тау-белок, наряду с несколькими другими белками, ассоциирован с микротрубочками, в частности, после фосфорилирования он их стабилизирует. При БА тау-белок подвергается избыточному фосфорилированию, из-за чего нити белка начинают связываться друг с другом, слипаться в нейрофибриллярные клубки и разрушать транспортную систему нейрона [Hernández F et al, 2007].

Неизвестно, как именно нарушение синтеза и последующее скопление A β пептидов вызывает патологические отклонения при БА [Van B et al, 2007]. Амилоидная гипотеза указывает на скопление A β как на основное событие, запускающее процесс нейрональной дегенерации. Считается, что отложения нарушают гомеостаз ионов кальция в клетке и провоцируют апоптоз [Yankner B et al, 1990]. Известно, что местом скопления A β в нейронах пациентов являются

митохондрии, также этот пептид ингибирует работу некоторых ферментов и влияет на использование глюкозы [Chen X et al, 2006].

Воспалительные процессы и цитокины так же могут играть роль в патофизиологии. Поскольку воспаление является признаком повреждения тканей при любом заболевании, при БА оно может играть вторичную роль по отношению к основной патологии либо представлять собой маркер иммунной реакции [Greig N et al, 2004].

Диагностика БА

Клинический диагноз БА обычно основан на истории пациента (анамнезе жизни), истории его родственников и клинических наблюдений (наследственном анамнезе), при этом учитываются характерные неврологические и нейропсихологические признаки и исключаются альтернативные диагнозы [Mendez M et al, 2006, Klafki H et al, 2006]. Для того, чтобы отличить болезнь от других патологий и разновидностей деменции, могут быть использованы сложные методы медицинской визуализации – компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография или позитронно-эмиссионная томография. Для более точной оценки состояния проводится тестирование интеллектуальных функций, в том числе памяти [Waldemar G et al, 2007]. Медицинские организации вырабатывают диагностические критерии с целью облегчить диагностику практикующему врачу и стандартизировать процесс постановки диагноза. Иногда диагноз подтверждается либо устанавливается посмертно при гистологическом анализе тканей мозга [McKhann G et al, 1984].

Национальный институт неврологических и коммуникативных расстройств и инсульта (NINDS) и Ассоциация болезни Альцгеймера составили наиболее часто используемый набор критериев для диагностики болезни Альцгеймера [Dubois B et al, 2007]. Согласно критериям, для постановки клинического диагноза возможной БА требуется подтвердить наличие когнитивных нарушений и предположительного синдрома деменции в ходе нейропсихологического тестирования. Для окончательного подтверждения диагноза необходим гистопатологический анализ тканей мозга, и в ходе сверки прижизненных диагнозов по критериям с посмертным анализом были отмечены хорошая статистическая надёжность и проверяемость [Blacker D et al, 1994]. Чаще всего нарушения при БА затрагивают восемь доменов: память, языковые

навыки, способность воспринимать окружающее, конструктивные способности, ориентирование в пространстве, времени и собственной личности, навыки решения проблем, функционирования, самообеспечения.

Нейропсихологические тесты, например, MMSE, широко применяются для оценки когнитивных нарушений, которые должны присутствовать при заболевании. Для получения надёжных результатов требуются более развёрнутые наборы тестов, особенно на ранних стадиях болезни [Tombaugh T et al 1992, Pasquier F et al, 1999]. В начале болезни неврологический осмотр обычно не показывает ничего необычного, за исключением явных когнитивных отклонений, которые могут напоминать обычную деменцию. Ввиду этого, для дифференциальной диагностики БА и других заболеваний важно расширенное неврологическое исследование [Waldemar G et al, 2007]. Беседа с членами семьи также используется при оценке хода болезни, поскольку родственники могут предоставить важную информацию об уровне повседневной активности человека и о постепенном снижении его мыслительных способностей [Harvey P et al, 2005]. Так как сам пациент обычно не замечает нарушений, точка зрения ухаживающих за ним людей особенно важна [Antoine C et al, 2004]. В то же время во многих случаях ранние симптомы деменции остаются незамеченными в семье и врач получает от родственников неточную информацию [Cruz V et al, 2004]. Дополнительные тесты обогащают картину информацией о некоторых аспектах болезни либо позволяют исключить другие диагнозы. Анализ крови может выявить альтернативные причины деменции [Waldemar G et al, 2007], которые изредка даже поддаются терапии, обращающей симптомы вспять [Clarfield A et al, 2003]. Также применяются психологические тесты для выявления депрессии, которая может как сопутствовать БА, так и являться причиной когнитивного снижения [Geldmacher D et al, 1997, Potter G et al, 2007].

Аппаратура SPECT- и PET-визуализации при её доступности может быть использована для подтверждения диагноза совместно с другими методами оценки, включающими анализ ментального статуса [Bonte F et al, 2006]. У людей, уже страдающих от деменции, SPECT, по некоторым данным, позволяет более эффективно дифференцировать БА от других причин, по сравнению со стандартным тестированием и рассмотрением анамнеза [Dougall N et al, 2004]. Возможность наблюдать отложения A β в мозге живых людей появилась благодаря созданию в

Питтсбургском университете Питтсбургского состава В (PiB), связывающегося с амилоидными отложениями при введении в организм. Короткоживущий радиоактивный изотоп углерод-11 в соединении позволяет определять распределение этого вещества в организме и получать картину амилоидных отложений в мозге больного с помощью ПЭТ-сканера [Kemppainen N et al, 2008]. Показано также, что объективным маркером болезни может быть содержание бета-амилоида либо tau-белка в спинномозговой жидкости [Marksteiner J et al, 2007]. Эти два новых метода вызвали предложения о разработке новых диагностических критериев [Waldemar G et al, 2007, Dubois B et al, 2007].

Модель основных биомаркеров БА (рис. 2) [Jack CR Jr et al., 2013] указывает на то, что Аβ патология возникает задолго до накопления tau патологии и даже ещё раньше, чем появления первых признаков когнитивных нарушений. Данные, опубликованные после клинического испытания первой активной вакцины AN-1792 [Gilman S et al, 2007] и недавние результаты пассивной иммунизации в испытаниях Pfizer/Janssen AIP [Johnson, J et al., 2012] и Eli-Lilly [Eli La et al., 2012] показали, что анти-Аβ иммунотерапия может быть эффективна только при очень ранней патологии БА, до накопления токсичных форм Аβ пептида (продромальная стадия БА) или даже у индивидов, находящихся в группе риска. Поэтому крайне важна ранняя диагностика БА и скрининг популяции с семейной историей или генетической предрасположенностью к БА, для выявления пациентов, у которых в будущем может возникнуть БА.

Диагноз БА на очень ранних стадиях возможна путём измерения биомаркеров, таких как отношений tau/Аβ и ptau/Аβ в СМЖ [de Jong D et al, 2006] и / или обнаружения накопления Аβ в мозге, используя PiB-PET сканирование [Klunk W et al, 2004].

Недавнее исследование, проведенное в группе когнитивно здоровых людей в возрасте старше 70 лет, позволило выявить 10 липидов крови, которые позволили с точностью до 90% отличить здорового человека от человека, у которого в будущем, в течение 2-3 летнего периода, возникнут признаки нарушения когнитивных функций. Эти фосфолипидные биомаркеры чувствительны к ранней доклинической нейродегенерации БА и, по пока непонятному механизму, отражают процесс

разрушения клеточных мембран. Кроме того данный метод отличается своей простотой и доступностью [Mapstone, M. et al., 2014]

Динамические биомаркеры патологического каскада БА

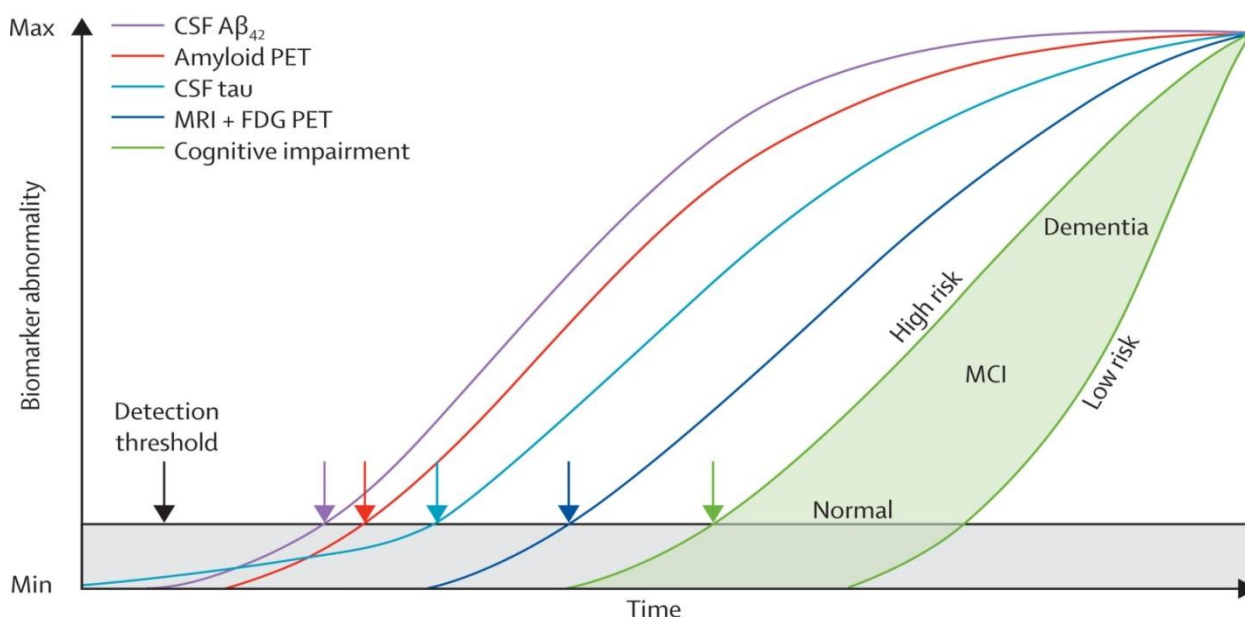


Рис. 2 Аβ идентифицируется с помощью CSF Aβ₄₂ или PET отображения амилоида. Тау -опосредованное повреждение и дисфункция нейронов определяется с помощью CSF tau или PET с фтордезоксиглюкозой. Структура мозга измеряется с использованием структурного MRI. Аβ=β-амилоида. MCI=умеренное когнитивное нарушение.

1.2 Применение иммунотерапии при болезни Альцгеймера

Бета-амилоид как терапевтическая мишень при болезни Альцгеймера

Для разработки направлений терапевтического вмешательства при БА на данный момент особо важным является идентификация подходящих мишеней. Аβ пептид, который образуется в результате протеолиза белка-предшественника – APP β- и γ- секретазами [Price D et al, 1994] по «амилоидной гипотезе» играет ключевую роль в возникновении и прогрессировании БА [Hardy J et al, 2002].

В настоящее время известно, что генетически обусловленная семейная форма БА является гиперпродукцией Аβ, в то время, как спорадическая форма БА является результатом ухудшения выведения Аβ из мозга с возрастом. Известно несколько путей выведения Аβ из мозга: очищение посредством микроглии [Paresce D et al, 1997, Qiu W et al 1997], деградация под действием ферментов неприлизин и инсулизин [Iwata N et al, 2000, Qiu W et al, 1997], отток из мозга активным транспортом через

гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в комплексе с протеином, содержащим рецептор липопротеина низкой плотности 1 (LRP) [Shibata M et al, 2000] или дренажа с межклеточной жидкостью вдоль капиллярных и артериальных стенок кровеносных сосудов [Schley D et al, 2006, Weller R et al, 1998]. При возрастном накоплении и агрегировании $A\beta$ из-за нарушения этих путей выведения, иммунная система распознает эти агрегированные белки как чужеродные и пытается удалить их. Исследования показали наличие анти- $A\beta$ антител в крови и СМЖ здоровых людей и пациентов с БА. Однако, титры этих антител у пациентов ниже чем у здоровых индивидов, что позволяет предположить, что иммунная система способна защищать от БА [Moir R et al, 2005].

Соответственно, многие методы лечения в настоящее время направлены на снижение уровня $A\beta$ в мозге и/или блокирование сборки пептида в патологические формы, которые нарушают когнитивные функции [Kim H et al, 2007, Movsesyan N et al, 2008]. В настоящее время не существует эффективного лечения БА. Поэтому новые терапевтические подходы для лечения БА имеют важное значение. Анти- $A\beta$ иммунотерапия представляет собой потенциально мощную стратегию сокращения количества патологической формы $A\beta$ в мозге пациентов с БА (рис. 3).

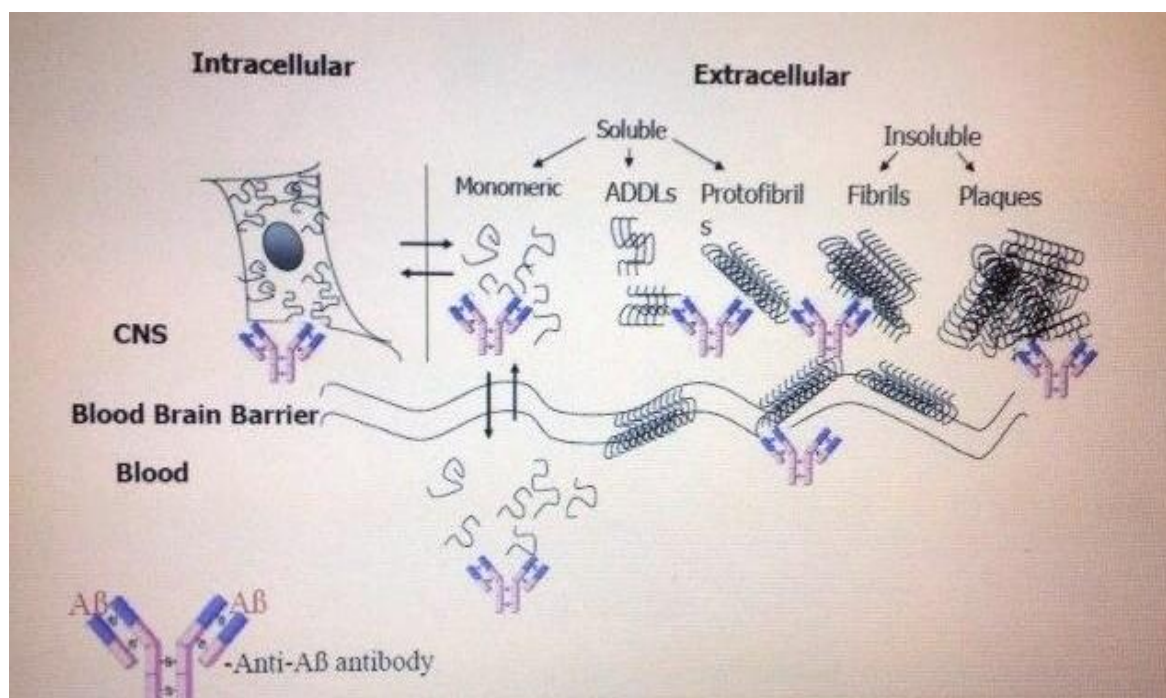


Рис. 3 Механизм иммунологического клиренса амилоидных бляшек из мозга.

Потенциал иммунотерапии в снижении Аβ в ЦНС трансгенных APP мышей

В 1999 году Schenk и коллеги сообщили, что вакцинный препарат, который содержал фибриллярный Аβ₄₂ (fAβ₄₂) в качестве иммуногена и адьювантную систему Фрейда, при введении трансгенным APP (Tg(APP)) мышам предотвратил отложение амилоидных бляшек в мозге, а также развитие дистрофических нейритов и астроглиозис. Другие исследователи воспроизвели и расширили данное направление, включив исследования показывающие, что активная Аβ иммунизация разными пептидными иммуногенами [Petrushina I et al 2008], адьювантами [Nikolic W et al, 2007] и путями введения [Lemere C et al, 2002], могут повысить синтез терапевтических анти-Аβ антител, которые ослабляют поведенческий дефицит, развивающийся у Tg(APP) мышей с возрастом, в связи с аккумуляцией Аβ.

Как уже упоминалось выше для иммуностимуляции широко используют адьюванты – вещества, вводимые совместно с антигенами, которые неспецифически усиливают или изменяют иммунный ответ на этот антиген. Таким образом достигается усиление продукции антител или реакций клеточного иммунитета по сравнению с иммунным ответом на антиген, вводимый без адьюванта. Так, в вакцине АКДС коклюшный компонент, обладающий адьювантным действием, усиливает также продукцию антител на дифтерийный и столбнячный анатоксины. Большинство адьювантов действует не на антигены, а на иммунную систему хозяина. Это особенно ценно в тех случаях, когда антигены нельзя выделить (например, при раке) или если необходимо повысить сопротивляемость (например, при иммунной недостаточности). Таким образом, в широком смысле понятие «адьюванты» тождественно понятию «иммуностимуляторы».

Стимулирующая терапия может усиливать скорость пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток: при этом возможен как специфический эффект – преимущественное вовлечение только клонов клеток, способных реагировать на данный антиген (туберкулин и др.), так и неспецифический, когда в реакцию вовлекается значительная часть популяции иммунокомпетентных клеток. Некоторые препараты стимулируют в основном Т-лимфоциты (Т-активин и др.), другие – В-лимфоциты (продигозан, пирогенал).

Исследования периферических анти-Аβ антител (пассивная иммунизация) показали их присутствие в головном мозге [Morgan D et al, 2000] и уменьшение

церебральной А β нагрузки. Пассивная иммунизация улучшает поведение даже очень взрослых Tg(APP) мышей с обширной А β нагрузкой мозга [Wilcock D et al, 2004]. Эти результаты ясно показали, что анти-А β специфических антител достаточно для удаления амилоидных отложений в мозге Tg(APP) мышей. Единственный неблагоприятный ответ на пассивную иммунизацию был обнаружен у взрослых Tg(APP) мышей, связанный с возникновением микрогеморрагий в сосудах коры головного мозга, причиной которых являлась еженедельная инъекция моноклональных анти-А β антител в высоких дозах [Pfeifer M et al, 2002]. Интересно, что участки анти-А β антителоиндуцированных микрогеморрагий колокализуются с отложениями А β в церебральных сосудах [Wilcock D et al, 2006]. Микрогеморрагии были зарегистрированы так же при активной иммунизации очень взрослых Tg(APP) мышей [Petrushina I et al, 2008, Wilcock D et al, 2006].

Первые иммунотерапевтические клинические испытания на пациентах с БА

Основываясь на впечатляющие результаты у мышей Tg(APP) и отсутствие неблагоприятных аутоиммунных реакций на AN1792 в крупных животных моделях, Elan и Wyeth начали клиническое испытание вакцины AN1792, которая состояла из фибриллярной А β_{42} , как иммуногена и адъюванта QS21, как сильного Th1-адъюванта на больных БА. Несмотря на то, что фаза I показала хорошую переносимость вакцины больными, общий иммунный ответ был довольно скудным. В фазе IIa, с целью усиления антительного ответа, в вакцину был включён полисорбат-80, что повысило антительный ответ на 58.8%. Однако, фаза IIa была преждевременно остановлена, так как у 6% пациентов развился менингоэнцефалит в ЦНС [Nicoll J et al, 2006]. Посмертный анализ мозга пациентов (n=3) показал ее инфильтрацию Т клетками [Ferrer I et al, 2004]. Это позволило предположить, что причина менингоэнцефалита связана с активацией аутореактивных Т-клеток специфических к А β_{42} пептиду [Pride M et al, 2008]. Важно отметить, что только у вакцинированных (n=18) больных развился менингоэнцефалит, в то время как ни у одного больного из контрольной группы (n=72), которым был введён плацебо, не было обнаружено побочного эффекта [Orgogozo J et al, 2003]. Другая проблема в отношении клинических испытаний AN1792 заключалась в выборе QS21 в роли адъюванта. Так как необходимо было учесть тот факт, что QS21, является мощным провоспалительным адъювантом Th-1 типа, может привести к побочным эффектам у пожилого населения, и так уже

имеющего существенное паренхимальное и цереброваскулярное воспаление. В этом исследовании у 13 из 18 пациентов с БА, которые ответили на прививки синтезом достаточно высоких титров антител к А β , иммунотерапия показала статистически значимое снижение уровня А β -нагрузки посредством снижения количества амилоидных бляшек и замедлило прогрессирование снижения когнитивных функций, вызванных БА [Coors E et al, 2008, Patton R et al 2006]. Однако, не было выявлено значимого улучшения когнитивных функций и значимого снижения уровня растворимых форм А β (олигомеров А β), которые были образованы вследствие распада амилоидных бляшек. И, как известно, олигомеры А β является наиболее токсичными формами А β пептида для нейронов [Price K et al, 2007, Schellekens H et al, 2005]. Поэтому при БА иммунотерапия может быть наиболее эффективным методом лечения, если будет начата ещё до накопления токсичных форм А β пептида у людей с ранней доклинической стадией БА или даже у здоровых людей с семейной историей или генетической предрасположенностью к БА.

В качестве попытки преодоления трудностей, связанных с активной иммунизацией пожилых пациентов, страдающих БА, были предложены и другие подходы. Одним из них является стратегия пассивной иммунизации, основанная на антителах к А β . Недавно Elan Corporation представила подробные результаты клинических испытаний, продолжавшихся 18 месяцев (фаза II), бапинеузумаба (ААВ-001) у пациентов с легкой или средней тяжестью БА (ICAD, 2008, Чикаго, IL). Бапинеузумаб является первым гуманизированным моноклональным антителом, созданным для устранения токсичных А β из мозга человека. Для того, чтобы оценить безопасность и толерантность к бапинеузумабу у пациентов со слабой или средней тяжестью БА и исследовать эффективность доз, был разработан план клинического испытания, проводимый двойным слепым методом, с использованием возрастающих доз препарата и плацебо в качестве контроля. Статистически значимые различия от исходных данных наблюдались на 78 неделе у пациентов, не являющихся носителями А α оЕ- ϵ 4, получавших бапинеузумаб, как в отношении когнитивных, так и функциональных расстройств. У пациентов, являющихся носителями А α оЕ- ϵ 4, не наблюдалось статистически значимых различий ни для когнитивных, ни для функциональных расстройств. Побочные эффекты (ПЭ) были, как правило, от слабых до умеренных, а вазогенный отек, наблюдаемый у некоторых пациентов, по-

видимому, зависел от дозы препарата. Необходимо отметить, что в клиническом испытании AN1792 было показано прогрессирование церебральной амилоидной ангиопатии (САА), и это совпадает с данными о том, что пассивная иммунотерапия также может приводить к усилению САА у трансгенных мышей и вызывать увеличение частоты развития микрокровоизлияний у вакцинированных пациентов с БА [Pfeifer et al., 2002; Racine et al., 2005; Wilcock et al., 2004]. Все эти данные указывают на то, что лечение нужно начинать заранее (до накопления токсичных форм амилоида в сосудистой сети).

1.3 Роль иммунопрофилактики при болезни Альцгеймера

Экспериментальные исследования показывают, что терапевтическая вакцинация не способна разрушить токсичные олигомеры *in vivo*, она способна только лишь минимально ингибировать имеющуюся патологию, что подтверждает гипотезу о необходимости применения иммунотерапии до накопления Аβ в сосудах и паренхиме мозга, которое приводит к необратимым процессам. Иными словами, если патология при БА ассоциирована с аккумуляцией олигомерных форм Аβ в мозге, то терапевтическая стратегия вакцинации не будет эффективна. Чтобы проверить эту концепцию, данные после иммунизации ДНК-вакциной Tg(APP) мышей с и без имеющейся патологией БА были сопоставлены с данными, полученными в начале иммунизации [Petrushina I et al, 2007, Movsesyan N et al, 2008]. В обоих случаях, вакцинация значительно сократила Аβ-нагрузку в мозге мышей. Однако, проблема иммунотерапии заключается в том, что снижение нерастворимого Аβ может привести к повышению растворимых форм у этих пациентов [Patton R et al, 2008], в первую очередь олигомеров, наиболее токсичных форм Аβ для нейронов, тем самым ухудшив когнитивные функции [Haass C et al, 2007]. В этих исследованиях было показано, что ранняя вакцинация предотвращает аккумуляцию нерастворимого и растворимого/олигомерного Аβ, предотвращая когнитивные нарушения у иммунизированных животных, в то время как вакцинация мышей, уже имеющих патологию БА, снижает уровень нерастворимого Аβ, но при этом не снижает уровень растворимого/олигомерного Аβ. Эти данные и тот факт, что вакцина AN-1792 не была клинически эффективна у пациентов с БА, подразумевает, что иммунотерапия БА

может быть наиболее эффективна в качестве профилактической меры или же для лечения людей с ранними доклиническими стадиями БА.

Одним из важных препятствий для вакцинации пациентов БА является гипотизивчивость иммунной системы пожилых людей к вакцинам, что способствует скудному результату вакцинации и повышает восприимчивость пожилых людей к инфекционным заболеваниям. Т-клеточная популяция смещается к понижению соотношения наивных Т- клеток к Т-клеткам памяти, кроме того, продукция наивных Т-клеток тимусом с возрастом понижается [Candore G et al, 2008, Weinberger B et al, 2008]. Инволюция тимуса к 60 годам практически завершается и новых Т-клеток уже не синтезируется. Кроме того, известно, что *in vivo* продукция провоспалительных цитокинов с возрастом увеличивается [Weinberger B et al, 2008, Franceschi C et al, 2005]. Эта проблема потенциально могла бы быть преодолена с помощью обычной вакцинации людей с очень ранней стадией БА, которая может быть диагностирована путем измерения биомаркеров, таких как отношений tau/A β и ptau/ A β в СМЖ, фосфолипидных биомаркеров [Mapstone, M. et al., 2014] и/или обнаружения накопления A β в мозге, используя PIB-РЕТ сканирование с последующей ежегодной ревакцинацией. Другой стратегией может быть привлечение ранее генерированных Т-клеток памяти, приобретённых в течение вакцинаций, полученных в детстве или же после воздействия различных патогенов на человека. Таким образом, большинство людей уже будет обладать обширным профилем специфических Т-клеток памяти.

1.4 Разработка вакцин против болезни Альцгеймера

Как обсуждалось выше, одна из проблем, связанная с применением A β ₄₂ пептида в качестве вакцины является развитие нежелательного анти-A β /APP Th1 иммунного ответа [Orgogozo J et al, 2003, Ferrer I et al, 2004]. Молекулярным аспектом этой реакции является поглощение fA β ₄₂ антиген-представляющими клетками (АПК) и представление собственных эпитопов Т-клеткам через молекулы класса МНС II. Если эти эпитопы распознаются специфичными Th1 лимфоцитами, Т-клетки активируются и будут производить провоспалительные цитокины. В дополнение, активированная микроглия, которая является основным источником воспалительных факторов и характерна при наличии A β -бляшек в образцах мозга больных БА, может способствовать проницаемости ГЭБ и вовлечении иммунных клеток из периферии.

Впоследствии, активированная микроглия, экспрессирующая МНС класса II молекулы, будет способна презентировать Аβ пептид Аβ-специфичным Th1-клеткам, которые преодолели ГЭБ и индуцировать воспаление. Несмотря на то, что активация микроглии в ответ на сигналы от повреждённых нейронов является защитным процессом, хроническое воспаление может привести к нейродегенерации [Neumann H et al, 2001]. Нейроны имеют лишь ограниченный потенциал восстановления, поэтому воспалительные процессы должны быть жестко регулируемыми [Hanisch U et al, 2002].

Различные типы Т-клеток могут оказать разные эффекты на активацию микроглиальных клеток и очистку амилоидов. Th1-клетки могут способствовать активации микроглии и развитию воспалительного процесса посредством секреции IFN-γ и сенсibilизацией МНС класса II молекул микроглиальными клетками. Противовоспалительные цитокины, продуцируемые Th2-клетками, как было показано, обладают нейропротекторными свойствами [Hanisch U et al, 2002] и в конечном итоге способствуют апоптозу микроглии [Shin W et al, 2004]. Глиальные же клетки, в свою очередь, в целях снижения воспаления, могут способствовать апоптозу Т-клеток, проникших в мозг. Было показано, что после такой активации апоптозу подвергаются только Th1-клетки и не затрагиваются Th2 [Monsonogo A et al, 2003]. Недавно, были проведены исследования для того, чтобы продемонстрировать эффект Т-клеток и цитокинов на деградацию Аβ в первичных культурах человеческих макрофагов и микроглии. Эти исследования показали, что провоспалительные цитокины тормозят, в то время как противовоспалительные и регуляторные цитокины (ИЛ-4, ИЛ-10 и TGF β) повышают деградацию Аβ в макрофагах. IFN-γ и TNF-α непосредственно подавляют экспрессию ферментов, деградирующих Аβ в моноцитарных макрофагах [Yamamoto M et al, 2003]. Эти данные также подтверждают предположение, что предпочтение Th2 опосредованный ответа у больных БА является более выгодным и менее вредным, чем Th1 опосредованный ответ.

Исследования показали, что когнитивно здоровые пожилые люди и пациенты с БА имеют повышенное количество аутореактивных Т-клеток, специфичных к Аβ пептиду [Monsonogo A et al, 2003]. Вполне возможно, что у пациентов с БА в AN-1792 клиническом испытании, развивающийся менингоэнцефалит с более сильным

аутоиммунным Т-клеточным ответом и воспалением, был связан с иммунизацией $fA\beta_{42}$ в сочетании с сильным Th1 типом адъювантом, QS21. Что ещё раз говорит о целесообразности индуцирования Th2 клеточного противовоспалительного иммунного ответа. Другим способом избежания дополнительной активации аутореактивных Т-клеток является замена собственных $A\beta$ Th-клеточных эпитопов на чужеродные Th-клеточные эпитопы, с сохранением собственных В-клеточных эпитопов. К счастью, исследования по картированию В и Т-клеточных эпитопов $A\beta_{42}$ показали, что они локализованы в разных регионах $A\beta_{42}$ пептида [Ghochikyan A et al., 2009].

Примером такого подхода является создание эпитопной вакцины, состоящей из небольших В-клеточных эпитопов $A\beta_{42}$ и несвязанных с ними Th эпитопов. Elan and Wyeth разработали и в настоящее время тестируют конъюгатную вакцину (ACC-001, фаза II), в которой небольшие N-концевые пептидные фрагменты $A\beta$ конъюгированы с белком-переносчиком, выделенным из нетоксичного мутанта дифтерийного токсина и объединены вместе с адъювантом Th1-типа QS21(www.elan.com; <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=1807>).

Разные научные группы пытались картировать мышинные В-клеточные эпитопы $A\beta$ с помощью небольших пептидов, полученных из $A\beta_{42}$ и антисыворотки мышей, иммунизированных $fA\beta_{42}$. Было выявлено, что иммунодоминантным В-клеточным эпитопом $A\beta_{42}$ является пептид $A\beta_{1-15}$ [Lemere C et al, 2000, Cribbs D et al, 2003]. Важно отметить, что антитела, синтезированные к картированным В-клеточным эпитопам после AN-1792 вакцинации, в различных моделях животных были специфичны к N-концевой области $A\beta_{42}$.

Посредством компьютерного моделирования были выявлены два человеческих иммунодоминантных цитотоксичных Т-клеточных эпитопов, локализованных преимущественно в центральном и С-концевом регионах $A\beta_{42}$ [Sigurdsson E et al, 2004, Singh H et al, 2003]. Monsonogo и сотрудники картировали главный Т-клеточный эпитоп в $A\beta_{15-42}$ пептиде [Monsonogo A et al, 2003]. Картирование с использованием пяти перекрывающихся пептидов внутри участка $A\beta_{15-42}$ показали, что Т-клеточные эпитопы были наиболее часто локализованы в $A\beta_{16-30}$ регионе. Данные Т-клеточного картирования показали, что Т-клеточные эпитопы, распознаваемые различными гаплотипами HLA могут быть расположены в разных регионах $A\beta_{42}$ пептида.

Таким образом, целесообразно свести к минимуму размер В-клеточного эпитопа, чтобы избежать активации аутореактивных Т-клеток у людей, несущих специфический гаплотип МНС класса II. Одним из способов достижения этого заключается в разработке вакцины, которая будет содержать в себе собственный А β В-клеточный эпитоп и чужеродный МНС класса II Т-клеточный эпитоп, который будет распознаваться Th-клетками и способствовать синтезу эффективного анти-А β антительного ответа. Так можно будет избежать возникновения Т-клеточного иммунитета против А β и исключить проблемы, возникшие в клиническом испытании с применением AN-1792 вакцины.

Пример пептидной вакцины против БА

Недавно были опубликованы данные об эффективности эпитопной пептидной вакцины, состоящей из иммунодоминантного В-клеточного эпитопа А β ₄₂ (А β ₁₋₁₅ или А β ₁₋₁₁) совместно с сильным чужеродным Т-клеточным эпитопом. В одном из последних подобного рода экспериментов было разработано два типа эпитопных вакцин на основе множественного антигенного пептида (MAP), который представляет из себя полилизиновую основу с соединенными с ней четырьмя пептидами 2А β ₁₋₁₁-PADRE или PADRE-2А β ₁₋₁₁, состоящих из В-клеточного эпитопа А β ₄₂ (А β ₁₋₁₁) и синтетического универсального Pan HLA DR Th-эпитопа – PADRE. Оба пептида, соединенные с Th1-типа сапониновым адъювантом QuilA, индуцировали в равной степени высокие титры антител к А β у мышей линии C57BL/6 после трех повторных иммунизаций, проведенных с разницей в две недели. Для дальнейшего исследования терапевтических возможностей пептидной эпитопной вакцины, 9-и месячные мыши линии APP/Tg2576, обладающие средневыраженными патологическими признаками, сходными с признаками БА, были иммунизированы 2А β ₁₋₁₁-PADRE-MAP, соединенным с адъювантом QuilA, с целью изучения нейрпатологических изменений в их мозге [Petrushina et al., 2007]. Вакцинация мышей линии APP/Tg2576 эпитопной вакциной способствовала сокращению накоплений нерастворимой формы А β , не вызывая при этом никаких неблагоприятных последствий, например, таких как инфильтрация Т-клеток или макрофагов в ЦНС или микрогеморрагий. Однако, такая вакцинация не изменяла количества наиболее токсичных растворимых олигомерных форм А β . Эти исследования позволяют предположить, что только превентивная вакцинация и/или ранняя терапевтическая вакцинация могут защищать организм от

проявлений БА, или сократить проявления этого заболевания, тогда как терапевтическая вакцинация сама по себе не способна приводить к разрушению токсичных олигомеров и только в минимальной степени может сокращать уже имеющиеся проявления БА. Полученные данные свидетельствуют о том, что такая вакцина может быть безопасной и иммуногенной для человека, так как она (i) высокоаффинна в отношении 15 из 16 наиболее распространенных молекул HLA-DR человека [Alexander et al., 2000; Alexander et al., 1998; La Rosa 2002; Panina-Bordignon et al., 1989; Weber et al., 1999]; (ii) не индуцирует аутореактивных Th-клеток; и (iii) вызывает сильный Th-клеточный иммунный ответ, что способствует продукции высокого титра антител к A β у мышей дикого типа и трансгенных мышей линии Tg(APP) [Agadjanyan et al., 2005; Mamikonyan et al., 2007; Petrushina et al., 2007]. Однако, в этих исследованиях использовали так называемый множественный антигенный пептид (MAP), который трудно получить в масштабе проведения клинических испытаний, поэтому остается необходимость в композиции с сильным стандартным адъювантом.

Пример вакцины против БА, основанный на вирусных векторах

В качестве альтернативной платформы доставки иммуногенных A β ₄₂ В-клеточных эпитопов, недавно был разработан и протестирован вектор на основе рекомбинантного вируса гриппа, который способен не только доставлять A β ₁₋₁₀ или любой другой нужный пептид в иммунную систему хозяина, но и обеспечивать необходимую поддержку Т-клеткам. Рекомбинантный вирус гриппа A/WSN/33 (H1N1), экспрессирующий В-клеточные эпитопы A β ₄₂, A β ₁₋₁₀ (flu-A β ₁₋₁₀), встроенные в ген гемагглютинаина (НА), был создан с использованием метода «спасения плазмиды» – одного из методов обратной генетики [Schickli et al., 2001]. Мыши линии C57BL/6 были иммунизированы и дважды ревакцинированы с использованием различных комбинаций ослабленных живых или убитых вирусов. Рекомбинантный вирус гриппа, экспрессирующий A β ₁₋₁₀, индуцировал довольно сильный иммунный ответ во всех комбинациях, однако более значительный ответ наблюдался в тех случаях, когда мыши дважды иммунизировались живым ослабленным вирусом, а затем действие усиливалось введением убитой вакцины. Все группы мышей, иммунизированные рекомбинантным вирусом, индуцировали преимущественно антитела изотипов IgG2b и IgG2a^b. Отношение IgG1/IgG2a^b было менее 1, что

означает, что был индуцирован преимущественно иммунный ответ Th1-клеточного типа. Ответ Th1-клеточного типа не должен индуцировать нежелательные побочные эффекты, так как он специфичен к вирусу гриппа, а не к собственным антигенам A β [Davtyan H et al., 2011].

Пример вакцины против БА, основанный на рекомбинантном белке

Белковые эпитопные вакцины MDC-A β ₁₋₁₁-PADRE и MDC-3A β ₁₋₁₁-PADRE, содержащие в качестве молекулярного адъюванта Th2-типа макрофагальный хемокин (MDC), и чужеродный синтетический Т-клеточный эпитоп PADRE, индуцировали сильный иммунный ответ после иммунизации с их помощью мышей линии C57BL/6, однако, иммунный ответ, индуцированный вакциной, несущей три копии В-клеточных эпитопов, был значительно сильнее, чем тот, который индуцировала вакцина, содержащая только одну копию В-клеточных эпитопов. Мыши получали 50 мг белка подкожно, четыре раза, с периодичностью в две недели, сыворотка собиралась на 10-й день после каждой иммунизации [Davtyan H et al., 2010].

ДНК-вакцины против БА их преимущество

Преимущество ДНК-вакцины по сравнению с обычными пептидными/белковыми вакцинами заключается в том, что ДНК-вакцинация основывается на непосредственной инъекции ДНК-плазмиды, кодирующей белковые или же пептидные антигены. ДНК легко поглощается клетками, затем эти клетки экспрессируют антигены, распознаваемые иммунными клетками, которые способствуют иммунному ответу к экспрессированному антигену [Donnelly J et al, 2000, 2005]. Было показано, что ДНК-иммунизация способна привести к генерации защитного гуморального и клеточного иммунного ответа против вирусных, опухолевых и чужеродных антигенов [Kim J et al, 1999, Boyer J et al, 1997]. Кроме того, ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ по сравнению с белковыми и вирусными вакцинами. ДНК-плазмиды относительно безопасны, стабильны, экономически выгодны и способны долго поддерживать приемлемые уровни экспрессии антигена в клетках. ДНК-вакцинами можно легко манипулировать с целью модификации генов для индуцирования нужного типа иммунной реакции. Такая вакцина даёт возможность устранить последовательности, кодирующие потенциально токсичные или онкогенные белковые домены и включить в состав ДНК молекулярные адъюванты, такие как, цитокины, которые смогут направить Th-клеточный ответ в

направлении желаемого пути иммунного ответа. Таким образом, прогрессирование БА может быть безопасно предотвращено ДНК-вакцинами, если (i) вакцина будет индуцировать высокие титры антител специфичных к токсичным формам А β без активации аутореактивных Т-клеток и индукции воспаления; (ii) и, если вакцинация будет начата до или по крайней мере на ранних стадиях накопления токсичных форм А β пептида. Современные достижения в развитии диагностических и прогностических методов позволяют успешно реализовать схему ДНК-вакцинации.

Учитывая все вышеперечисленные факты, опираясь на данные, полученные в предыдущих исследованиях, была создана ДНК-вакцина, содержащая в качестве молекулярного адъюванта Th2-типа MDC [Movsesyan N et al, 2008], 3 копии А β ₁₋₁₁ В-клеточного эпитопа и чужеродного синтетического Т-клеточного эпитопа PADRE. Как было продемонстрировано в ранее проведенных исследованиях на мышах и людях, доминантным В-клеточным эпитопом А β ₄₂ пептида является А β ₁₋₁₅. Однако, основываясь на том, что в Tg(APP) и HLA класса II Tg мышам иммунизированным fА β ₄₂, А β ₁₋₁₆ пептид был распознан Т-клетками [Das P et al, 2003], было решено укоротить В-клеточный эпитоп до А β ₁₋₁₁. В дополнение, для значительного усиления антительного ответа и аффинитета антиген- антительного взаимодействия в конструкцию ДНК было включено 3 копии А β ₁₋₁₁. В качестве чужеродного Т-клеточного эпитопа был выбран PADRE – синтетический Pan HLA DR-связанный эпитоп, который является сильным Th антигеном [La Rosa C et al, 2002]. Нетрансгенные и 3×Tg-AD мыши, иммунизированные ДНК-вакциной, индуцировали сильный анти-А β гуморальный и Th2 опосредованный иммунный ответ. Важно отметить, что наряду с этим не было обнаружено аутореактивного клеточного ответа специфичного к А β [Movsesyan N et al 2008, Petrushina I et al, 2007]. *In vitro* характеристика терапевтических особенностей анти-А β ₁₋₁₁ антител, синтезированных после иммунизации 3×Tg-AD мышей ДНК-вакциной, показала, что антитела связывают различные формы А β ₄₂, кроме того аффинность к связыванию олигомерных форм выше, чем фибриллярных форм. Антитела, связывающие амилоидные бляшки в препаратах мозга больных БА, снижают содержание амилоидных бляшек в мозге после внутримозговой инъекции Tg(APP) мышам и ингибируют фибрилло-опосредованную цитотоксичность А β ₄₂. Эти наблюдения в *in vitro* условиях показывают, что терапевтическая вакцинация не способна разрушить токсичные

олигомеры *in vivo*, она способна только лишь минимально ингибировать имеющуюся патологию, что подтверждает верность гипотезы о применении иммунотерапии до накопления Аβ в сосудах и паренхиме мозга, которые приводят к необратимым процессам. Иными словами, если при БА патология связана с аккумуляцией олигомерных форм Аβ в мозге, то терапевтическая стратегия вакцинации не будет эффективна. Чтобы проверить эту концепцию, данные после иммунизации Tg(APP) мышей с и без имеющейся БА патологией, были сопоставлены с данными, полученными в начале иммунизации [Movsesyan N et al 2008, Petrushina I et al, 2007]. В обоих случаях, вакцинация значительно сократила Аβ- нагрузку в мозге мышей. Однако, проблема иммунотерапии заключается в том, что снижение нерастворимого Аβ может привести к повышению растворимых форм у этих пациентов, в первую очередь олигомеров, наиболее токсичных форм Аβ для нейронов, тем самым ухудшив когнитивные функции [Haass C et al, 2007]. В этих исследованиях было показано, что ранняя вакцинация предотвращает аккумуляцию нерастворимого и растворимого – олигомерного Аβ, предотвращая когнитивные нарушения в иммунизированных животных, в то время как вакцинация мышей, уже имеющих патологию, снижает уровень нерастворимого Аβ, но при этом не снижает уровень растворимого – олигомерного Аβ. В обоих случаях вакцинация эпитопной вакциной стимулирует меньшую активацию микроглии по сравнению с неиммунизированными контролями и не вызывает геморрагию. Эти данные и тот факт, что вакцина AN-1792 не была клинически эффективной подразумевает, что при БА иммунотерапия может быть наиболее эффективна в качестве профилактической меры или же для лечения людей с ранней доклинической стадией БА.

У большинства людей уже имеется большое количество специфических Th-клеток памяти, направленных против определенных вакцин и различных патогенов. Вакцинация таких людей с использованием рекомбинантной вакцины, содержащей В-клеточные эпитопы (включая и гуморальный ответ к Аβ в случае вакцинации против БА) и чужеродные Th-клеточные эпитопы из вакцин или патогенов, упомянутых ниже, может усилить ранее генерированную Т-клеточную память, стимулировать её быструю дифференцировку в эффекторы Th-клеток, что приведёт к быстрому и сильному иммунному ответу (выработке антител), специфичному к В-клеточным эпитопам любой формы Аβ.

Столбнячный токсин, вирус гриппа и HBV – это примеры таких вакцин. В результате обязательной вакцинации против столбняка, ежегодной вакцинации и/или инфицирования вирусом гриппа и вакцинации против HBV, практически у каждого человека формируют CD4⁺Т-клеточная память, специфичная к Т-клеточным хелперным эпитопам столбнячного токсина и HBV и консервативным эпитопам вируса гриппа. Важно отметить, что некоторые Th-эпитопы этих патогенов распознаются МНС класса II гаплотипами и, кроме того, среди них есть такие эпитопы, которые считаются практически универсальными.

Поэтому, повторной иммунизации эпитопной вакциной против БА, содержащей указанные Th-клеточные эпитопы и сильный молекулярный адъювант, должно быть достаточно для быстрой активации предсуществующей Th-клеточной памяти, направленной против столбнячного токсина, HBV и вируса гриппа, что ведет к активации В-клеток, экспрессирующих иммуноглобулиновые рецепторы (BCR) к Аβ, и к сильной и устойчивой выработке антител к Аβ в пожилом возрасте.

С целью тестирования возможной предсуществующей Т-клеточной памяти Tg2576 мыши были иммунизированы рекомбинантной белковой вакциной Lu AF20513, которая содержала Аβ₁₋₁₂ и два чужеродных Th-эпитопа из традиционной вакцины против столбняка (ТТ), которые распознаются полиморфными человеческими МНС класса II молекулами [James et al., 2007]. В данном исследовании было выявлено, что Lu AF20513 вакцина активирует ТТ-специфические Th-клетки, которые способствуют усилению продукции анти- Аβ антител. Кроме того, данная вакцина способствует активации предсуществующих CD4⁺ Т-клеток памяти, специфичные к чужеродным эпитопам, что в свою очередь способствует быстрому, сильному и устойчивому анти-Аβ антительному ответу. Данные исследования свидетельствуют о том, что стратегия использования универсальных Th-эпитопов, способствующих активации предсуществующих CD4⁺ Т-клеток памяти, способна преодолеть проблему гипотизывчивости иммунной системы пожилых людей к вакцинам, поскольку, практически все люди вакцинированы традиционной вакциной против столбняка [Davtyan H et al., 2013].

В настоящее время 5 активных эпитопных вакцин направленные на N-концевую область Аβ (CAD106, ACC-001, V950, UB311, и AD02) проходят I-II фазы

клинических испытаний. И, до сих пор, были опубликованы только результаты CAD-106 исследования [Winblad B et al, 2012].

Эпитопная ДНК-вакцина против БА имеет преимущества над остальными альтернативными вакцинами против БА, так как: (i) несколько копий В-клеточных эпитопов усиливают иммунный ответ и avidность антител; (ii) несколько копий В-клеточных эпитопов усиливают накопление антигенов и презентирование соответствующих пептидов посредством APC Т-клеткам; (iii) соединение собственных В-клеточных эпитопов с эпитопами различных чужеродных Т-клеток может препятствовать развитию толерантности и индуцировать более сильный иммунный ответ; замена собственных Т-клеточных эпитопов $A\beta_{42}$ пептида чужеродными эпитопами предотвращает развитие аутореактивного Т-клеточного ответа; (iii) замена собственных Т-клеточных эпитопов эпитопами Th-клеток из соответствующих вакцин или патогенов, воздействию которых часто подвергается человек, будет способствовать активации предсуществующих Т-клеток памяти и индуцирует быстрый и стойкий иммунный ответ (выработку антител к $A\beta$) у людей, получающих эпитопную вакцину против БА; iv) соединение с молекулярным адъювантом или заключение в него вакцины существенно усиливает иммунный ответ и сдвигает его в нужном направлении; (v) первичная иммунизация эпитопной ДНК-вакциной и последующее усиление её действия при помощи эпитопной вакцины на основе белка/пептида, вирусоподобных частиц или вирусных векторов, помогает индуцировать более высокие титры антител к $A\beta$, чем при повторной иммунизации ДНК-вакциной [Davtyan H et al., 2010]. Кроме того, современный метод вакцинации с применением TriGrid системы электропорации (TDS-IM, Ichor Medical Systems, San Diego, CA) [Bureau M et al, 2000, Vasan S et al, 2011] делает ДНК-вакцинации несравнимо эффективными за счёт повышения эффективности трансфекции ДНК в клетки. Электропорация может увеличить экспрессию генов *in vivo* от 100 до 1000 раз по сравнению с инъекцией плазмиды ДНК посредством иглы [Rizzuto G et al 1999, Widera G et al 2000].

Таким образом, учитывая все вышеперечисленные факты и результаты, ранее проведённых исследований, считается, что в настоящее время создание и тестирование ДНК-вакцин на основе эпитопов в иммунотерапии БА является наиболее актуальным и доступным.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Экспериментальные животные

Мыши. 6-8-и недельные чистопородные (инбредные) мыши (самки) C57BL/6 (H-2b гаплотипа) были получены из Jackson Laboratory (Sacramento, CA). Все мыши содержались в University of California, Irvine в соответствии с требованиями NIH (National Institutes of Health) и по стандартному протоколу IACUC (Institutional Animal Care and Use Committees).

Кролики. В исследовании были использованы Новозеландские белые кролики (самки) массой тела от 3.0 до 3.5 кг, которые содержались в Absorption Systems (San Diego) в соответствии с требованиями NIH и по стандартному протоколу IACUC.

Макаки-резусы. В данном исследовании были использованы генетически неселекционированные макаки-резусы (самцы) в возрасте от 2-х лет и 8 месяцев до 3-х лет и 9 месяцев, массой тела 3.4-5.7 кг из New Iberia Research Center (New Iberia, LA). Макаки-резусов содержали в соответствии со стандартными нормами по протоколу IACUC в соответствии с требованиями NIH (с ежедневным мониторингом состояния здоровья, включающая проверку приема пищи, активности, внешнего вида и консистенции стула). Масса тела животных измерялась до начала первой вакцинации, до последующей вакцинации и после забора крови.

2.2 Конструирование ДНК-вакцин

AV-1955 и AV-1959 ДНК-конструкции состоят из сигнальной последовательности к-цепи иммуноглобулинов мышей (Igkss), трёх копий $A\beta_{1-11}$ В-клеточного эпитопа, одного синтетического пептида (PADRE) и восьми (AV-1955) или одиннадцати (AV-1959) чужеродных Th-эпитопов (Ther), представленных в табл. 1. Сначала, с помощью ПЦР, был получен $3A\beta_{1-11}$ -PADRE миниген, включающий в свой состав Igkss и в котором $A\beta_{1-11}$ копии были отделены друг от друга небольшим глицин-серин (GS) линкерами. Далее, с целью получения конструкции, способной экспрессировать протеин со свободным N-концом, регион, кодирующий дополнительные аминокислоты, локализованные между последовательностью первой копии $A\beta_{1-11}$ и Igkss, способствующей посттрансляционному транспорту протеина через клеточную мембрану с

последующим отщеплением данной сигнальной последовательности от протеина была удалена с помощью ПЦР (рис 1B). Затем, синтезированный компанией GenScript (Piscataway, NJ) полинуклеотид, кодирующий Т-хелпер эпитопы (таблица 1), также отделённые друг от друга небольшим GS линкерами был лигирован с 3A β_{1-11} -PADRE минигеном. В качестве плазмиды был использован pVAX1 вектор (Invitrogen, Carlsbad, CA), который разработан в соответствии с требованиями U.S. Food and Drug Administration (FDA) для использования в людях. Таким образом, AV-1955 и AV-1959 конструкции были получены путём клонирования pVAX1 вектора со встроенным 3A β_{1-11} -PADRE-8Ther или 3A β_{1-11} -PADRE-11Ther фрагментом, полученным с помощью ПЦР с использованием BamHI и NheI рестрикционных сайтов (рис 1B). Верность последовательности синтезированной плазмиды была подтверждена методом секвенирования нуклеотидной последовательности.

2.3 Иммунопреципитация и вестерн-блоттинг

Экспрессия полученных ДНК-конструкций и секреция протеинов методом IP/WB была исследована в супернатанте временно трансфецированных CHO (Chinese hamster ovary) клеток. Клетки CHO (8×10^5) были трансфецированы 4 мкг плазмидной ДНК с помощью липофектамина (Invitrogen, CA) в соответствии с рекомендациями производителя и инкубированы в течении 48-и часов (37° C, 10% CO₂) в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM глутамин (Invitrogen, CA). Протеины, иммуноприцепитированные из кондиционированной среды (К.с.) с использованием 6E10 моноклональных антител (Covance), специфичных к 3-8 а.к. A β пептиду, были разделены электрофорезом на 10% Bis-Tris геле (Life Technologies) и перенесены на нитроцеллюлозную мембрану. Затем, протеины были визуализированы путём инкубации с моноклональными 6E10 антителами с последующей инкубацией с HRP-конъюгированными анти-мышинными IgG (Santa Cruz Biotechnology) или кроличьими анти-A β поликлональными антителами, распознающими свободный N-конец (получены в лаборатории Dr. Cribbs, UCI) с последующей инкубацией с HRP-конъюгированными анти-кроличьими IgG (Santa Cruz Biotechnology).

2.4 Процедура введения вакцин

Для того, чтобы повысить эффективность трансфекции ДНК в клетки, была использована TriGrid система электропорации *in vivo* (TDS-IM, Ichor Medical Systems, San Diego, CA). Электрический импульс состоял из электрической стимуляции амплитудой 250 В/см, общей продолжительностью 40 мс с интервалом 400 мс.

Две группы мышей C57BL/6 методом ЭП были иммунизированы 10 мкг/мышь AV-1955 или AV-1955 вакцинами на 0, 14, 28 и 42-й день в одну из передних большеберцовых мышц. Сыворотки, изолированные из крови мышей на 12-й день после третьей иммунизации, были использованы для анализа гуморального иммунного ответа. На 7-й день, после четвертой иммунизации мыши были умерщвлены, а спленоциты, выделенные из их селезёнок были использованы для выявления клеточного иммунного ответа. Эксперимент был проведён дважды.

Аналогичным методом 0,5 мл (1 мг/мл) плазмидной ДНК были вакцинированы кролики. Иммунизация проводилась четыре раза каждые две недели и после каждой иммунизации, на 12-14-й день, для анализа гуморального иммунного ответа был произведён забор крови. Следует отметить, что клеточный иммунный ответ в кроликах не был исследован в связи с отсутствием IL-4 и / или IFN γ -ELISPOT наборов для кроликов.

Две группы макак-резусов, по 5 животных в каждой группе были вакцинированы 0.4 мг/животное (группа 1; группа низкой дозы) или 4 мг/животное (группа 2; группа высокой дозы) AV-1955 вакциной. Третья группа, состоящая из 3 макак, в качестве отрицательного контроля, была иммунизирована пустым pVAX1 вектором (4 мг pVAX1 на животное). Все экспериментальные группы методом ЭП были вакцинированы в четырехглавую мышцу на 0, 2, 6 и 26-й неделях. Так же как и в случае мышей и кроликов была использована TriGrid система электропорации. После 18-и недельного периода покоя, макаки 1-й группы, ранее иммунизированные низкой дозой AV-1955 были переведены на прививки с высокой дозой AV-1959 вакциной (на 44 и 48-й неделях), в то время как макаки 2-й группы продолжали получать прививки (на 44 и 48-й неделях) с высокой дозой AV-1955. Сыворотки, изолированные из крови макак на 0, 2, 4, 8, 17, 26, 44, 50, 60, 73-й неделе, были использованы для анализа А β -специфичного ответа антител. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), изолированные из цельной крови на 49-й неделе до исследования клеточного иммунного ответа хранились при -70 °С.

2.5 Детекция, изотипирование анти- A β антител и картирование В-клеточного ответа

Концентрации анти-A β антител в сыворотках мышей, кроликов и макак-резусов были определены иммуноферментным анализом (ИФА). 96-луночные микропланшеты (Immunol 2HB; Fisher Scientific, Chino, CA) были покрыты 50 мкл (100 мкг/мл) растворимого A β_{42} (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. После очередной промывки 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-мышинные, анти-кроличьи и 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 прочитана под 450 нм (Biotek, Synergy HT, Winooski, VT). Титры антител были подсчитаны 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.

Титры изотипов анти-A β антител в сыворотках кроликов и макак-резусов были определены в разведении 1:200. При этом применялись HRP-конъюгированные анти-кроличьи IgG и IgM (Bethyl Laboratories, Inc.) в разведении 1:10.000 и анти-обезьяньи 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.

Для определения связывания кроличьих антител с A β_{1-12} пептидом DAEFRHDSGYEV (GenScript) и A β_{2-10} пептидом KMDAEFRHDSGY (GenScript) был проведён ИФА анализ. 96-луночные микропланшеты были покрыты 10 мкг каждого из пептидов. Затем в лунки были добавлены разведенные сыворотки иммунизированных кроликов, содержащие 1 мкг антитела в объеме 100 мкл. Для обнаружения связанных анти-A β антител были использованы HRP-конъюгированные анти-кроличьи IgG (1: 5000; Pierce).

Для картирования В-клеточного ответа у мышей и макак-резусов был использован метод конкурентного ИФА. 96-луночные микропланшеты (Immunol 2HB; Fisher Scientific, Chino, CA) были покрыты 50 мкл (100 мкг/мл) растворимого A β ₄₂ (pH 9.7) и были инкубированы на всю ночь при 4°C. Лунки были промыты и блокированы соевым буферным раствором с 3% бычьим сывороточным альбумином и инкубированы на ночь при 4°C. Иммунные же сыворотки мышей и макак-резусов были разведены 1:500 и 1:250, соответственно, в TTBS буфере, содержащем 0.3% обезжиренного молока, и смешаны с короткими перекрывающимися пептидами (A β ₂₋₁₀, A β ₁₋₁₁, A β ₁₋₁₂, A β ₂₋₁₃, A β ₃₋₁₄, A β ₅₋₁₆, A β ₇₋₁₈; GenScript, Piscataway, NJ) или A β ₄₂ (American Peptide Company, Sunnyvale, CA) пептидом в разных концентрациях: 0.078 мкМ, 0.312 мкМ, 1.25 мкМ, и 5 мкМ. После преинкубации с пептидами стандартным методом ИФА было определено связывание иммунных сывороток с A β ₄₂ предварительно покрытых 96-луночных микропланшет. Процент связывания сывороток, блокированных короткими пептидами с A β ₄₂ микропланшет был рассчитан относительно связывания сывороток без конкурирующих пептидов к A β ₄₂, взятых за 100%. Эти эксперименты были повторены дважды.

2.6 Определение продукции IFN- γ методом ELISPOT анализа

Анализ Т-клеток, продуцирующих цитокин IFN- γ был исследован в культуре спленоцитов иммунизированных мышей методом ELISPOT (BD Biosciences, San Jose, CA). Культуры спленоцитов были *in vitro* рестимулированы индивидуальными пептидами P2, P21, P23, P30, P32, HBsAg, HBVnc, MT, P7, P17, P28, коктейлем этих пептидов, растворимым A β ₄₀ или же контрольным пептидом – 16-мер tau-протеина человека (отрицательный контроль), индивидуальные пептиды и протеины были использованы в концентрации 10 мкг/мл, в то время как смесь пептидов была использована в концентрации 2 мкг/мл каждого пептида. Анализ продукции IFN- γ цитокина в PBMC макак-резусов так же был проведён методом ELISPOT (Mabtech Inc, Cincinnati, OH). Культуры клеток были *in vitro* рестимулированы индивидуальными пептидами P2, P21, P23, P30, P32, HBsAg, HBVnc, MT, P7, P17, P28, коктейлем этих пептидов, рекомбинантными протеинами, AV-1959, MultiTERP (т.е. AV-1959 без 3A β) или же протеином BORIS (Brother of Regulator of Imprinted Sites)– протеин, участвующий в репрессии транскрипции гена CTCFL (отрицательный

контроль), индивидуальные пептиды и протеины были использованы в концентрации 10 мкг/мл, в то время как смесь пептидов была использована в концентрации 2 мкг/мл каждого пептида. Чтобы проверить аутореактивный Т-клеточный ответ был использован пептид A β ₄₀, в то время как для тестирования фонового уровня активации Th- клеток был использован 16-мерный пептид tau-протеина человека. Белки и индивидуальные пептиды были использованы в концентрации 20 мкг/мл, в то время как смесь пептидов содержала 2 мкг/мл каждого пептида. Пятна были подсчитаны CTL-ImmunoSpot S5 Macro Analyzer (Cellular Technology Ltd., Shaker Heights, OH) анализатором. Была высчитана разница в количестве пятно-формирующих колоний на 10⁶ спленоцитов или PBMC, рестимулированных Th пептидами или A β ₄₀ и пятноформирующих колоний на 10⁶ спленоцитов или PBMC, рестимулированных AV-1959 или MultiTER рекомбинантными протеинами с вычитанием количества пятно-формирующих колоний на 10⁶ спленоцитов или PBMC, рестимулированных контрольным протеином (отрицательный контроль).

2.7 Анализ взаимодействия анти-A β ₁₋₁₁ антител с различными формами A β ₄₂ пептида методом поверхностно-плазмонного резонанса (SPR)

Исследование связывания было выполнено на платформе SPR BIAcore 2000 (Biacore). Мономерные, олигомерные и фибриллярные формы A β ₄₂ пептида были иммобилизованы на поверхность биосенсорного чипа (CM5). Серийные разведения анти-A β ₁₋₁₁ антител, 6E10 и мышинных IgG (125, 250 и 500 нМ) в рабочем буфере, содержащем 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0.05% сурфактанта P20, pH 7.4, были введены 5 мл/мин через каждую иммобилизованную форму пептида, после чего была измерена кинетика ассоциации/диссоциации, как изменение SPR сигнала (в резонансных единицах). Каждая инъекция последовала шагу восстановления в 30-и импульсах 1 М NaCl, 50 мМ NaOH. Обработка данных была проведена BIAevaluation 4.1.1 программой.

2.8 Анализ нейротоксичности методом МТТ

МТТ — это (3[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5 дифенилтетразолиумбромид), тетразоловый краситель, который под воздействием ферментов митохондрий

приобретает синюю окраску. Только клетки с живыми митохондриями могут осуществлять эту реакцию, следовательно интенсивность окраски прямо связана со степенью неповрежденности митохондрий.

В 96-луночные планшеты (Immulon II; Dynax Laboratories, VA) были добавлены SH-SY5Y клетки человеческой нейробластомы по 2×10^4 клеток на лунку разведенные в 100 мкл среды (45% DMEM, 45% Ham's modification of F-12, 10% FBS и 2 mM L-глутамин) и, с целью прикрепления клеток ко дну лунок, планшеты 24 часа были инкубированы в 5% CO₂ инкубаторе при 37° C. Aβ₄₂ олигомеры и фибриллы были инкубированы без или с очищенными из иммунной сыворотки кроликов или макак-резусов анти-Aβ₁₋₁₁ антителами на час при комнатной температуре с периодическим перемешиванием, чтобы обеспечить максимальное взаимодействие. После инкубации пептид/анти-Aβ₁₋₁₁ антитела, смеси были разведены в среде таким образом, чтобы конечная концентрация пептида и антител была 2.5 мкМ и 0.5 мкМ (в случае использования кроличьих анти-Aβ₁₋₁₁ антител) и 2.5 мкМ и 1.25 мкМ (в случае использования анти-Aβ₁₋₁₁ антител макак-резусов), соответственно. Затем, данная среда была добавлена по 100 мкл в лунки с SH-SY5Y клетками и инкубирована 48 часов в 5% CO₂ инкубаторе при 37°C. Параллельно были поставлены ничем не обработанные контрольные образцы SH-SY5Y клеток. После инкубации с помощью МТТ в соответствии с инструкциями изготовителя (Promega Corp., WI) была анализирована нейротоксичность. Оптическая плотность (OD) при 570 нм измерялась аппаратом Synergy HT Microplate reader (Biotek, VT). Жизнеспособность клеток рассчитывалась путём деления OD лунок с образцами на OD лунок, содержащих только среду.

2.9 Обнаружение Aβ бляшек в тканях мозга человека методом иммуногистохимии

Для выявления способности связывания сыворотки иммунизированных кроликов и очищенных анти-Aβ антител макак-резусов к человеческим Aβ бляшкам срезов тканей коры головного мозга толщиной 40 мкм с патологией БА, предварительно фиксированных формалином, (ткани получены из Brain Bank and Tissue Repository, MIND, University of California, Irvine) был использован метод иммуногистохимии. Иммунные сыворотки кроликов были использованы в разведении

1:250, очищенные анти-А β антител макак-резусов в разведении 1:1000. В качестве положительного контроля были использованы мышинные моноклональные 6E10 антитела против человеческого А β в разведении 1:1500. А также было проверено связывание антисыворотки кроликов к А β бляшкам предварительно блокированных А β ₄₂ пептидом в концентрации 2.5 мкМ. В качестве вторичных антител были использованы HRP-конъюгированные анти-кроличьи (Jackson ImmunoResearch Laboratories) или анти-обезьяньи (Jackson ImmunoResearch Laboratories) IgG. В поли субстрата был использован DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Vector Laboratories). Изображения бляшек были получены с помощью цифровой камеры (Olympus, Center Valley, PA) под увеличением 10 $\times$.

2.10 Дот-блот анализ сывороток макак-резусов

Чтобы проверить связывание иммунных сывороток с пептидами MultiTEP платформы, на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare, Piscataway, NJ) были нанесены по одному мкл (1 мкг каждый) P2, P21, P23, P30, P32, HBsAg, HBVnc, MT, P7, P17, P28 (GenScript, Piscataway, NJ) пептида, а так же А β ₄₂ как контроль. После блокирования 5% обезжиренным сухим молоком в TTBS и промывания, мембраны были покрыты сыворотками макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами (1:200). Затем мембраны были инкубированы HRP-конъюгированными анти-обезьяньими антителами (1: 2000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA). Пятна были проявлены с помощью реагента люминол (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) на пленках Kodak X-Omat AR (Kodak, Rochester, NY).

2.11 Статистический анализ

Статистические показатели (среднее значение (mean), стандартное отклонение (SD), статистическая значимость (*p*) были рассчитаны с использованием программы Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). Статистически существенные различия были изучены с помощью twotailed t test или анализа вариаций и Tukey's multiple comparisons posttest (значения *p-value* < 0.05 (*p* < 0.05) были приняты как статистически значимые, достоверные).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА III. КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ВАКЦИНЫ AV-1955 И ОЦЕНКА ЕЕ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

3.1 Конструирование ДНК-вакцины AV-1955

Как известно, БА является нейродегенеративным заболеванием, причина которого заключается в отложении аномальных $A\beta_{42}$ с последующим образованием амилоидных бляшек [Hardy J at al., 1991]. Поэтому терапевтические мероприятия направлены на подавление накопления аномальных $A\beta$.

В настоящее время, одной из наиболее перспективных стратегий снижения уровня токсичных форм $A\beta$ в мозге является иммунотерапия посредством специфических антител [Orgogozo J M at al., 2003]. Доклинические и клинические данные свидетельствуют о том, что развитие безопасной и эффективной анти- $A\beta$ иммунотерапии для лечения БА требует терапевтические уровни анти- $A\beta$ антител, избегая при этом образования аутореактивных Т-клеток.

Последующие исследования показали, что антигенные детерминанты $A\beta_{42}$, презентруемые В-клеткам и Т-хелперным клеткам, локализованы в разных регионах пептида [Ghochikyan A at al., 2009] и антитела, специфичные к N-концевой области $A\beta_{42}$ значительно снижают $A\beta$ -нагрузку в мозге трансгенных мышей APP. На основании этих данных становится особенно важной стратегия эпитоп-основанной вакцины [Agadjanyan M G at al., 2005], где собственный Т-клеточный эпитоп $A\beta_{42}$, можно заменить чужеродным эпитопом. Такая стратегия может обеспечить индуцирование мощного антительного ответа, специфичного к $A\beta$ и снизить риск активации аутореактивных Т-клеток [Ghochikyan A at al., 2009]. Дизайн такой вакцины представлен на рисунке 4А.

Иммуногенная 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. ДНК-плазмиды относительно безопасны, экономически выгодны и способны поддерживать приемлемые уровни экспрессии антигена в клетках. ДНК-вакцинами можно легко манипулировать с целью модификации генов для индуцирования нужного типа иммунной реакции.

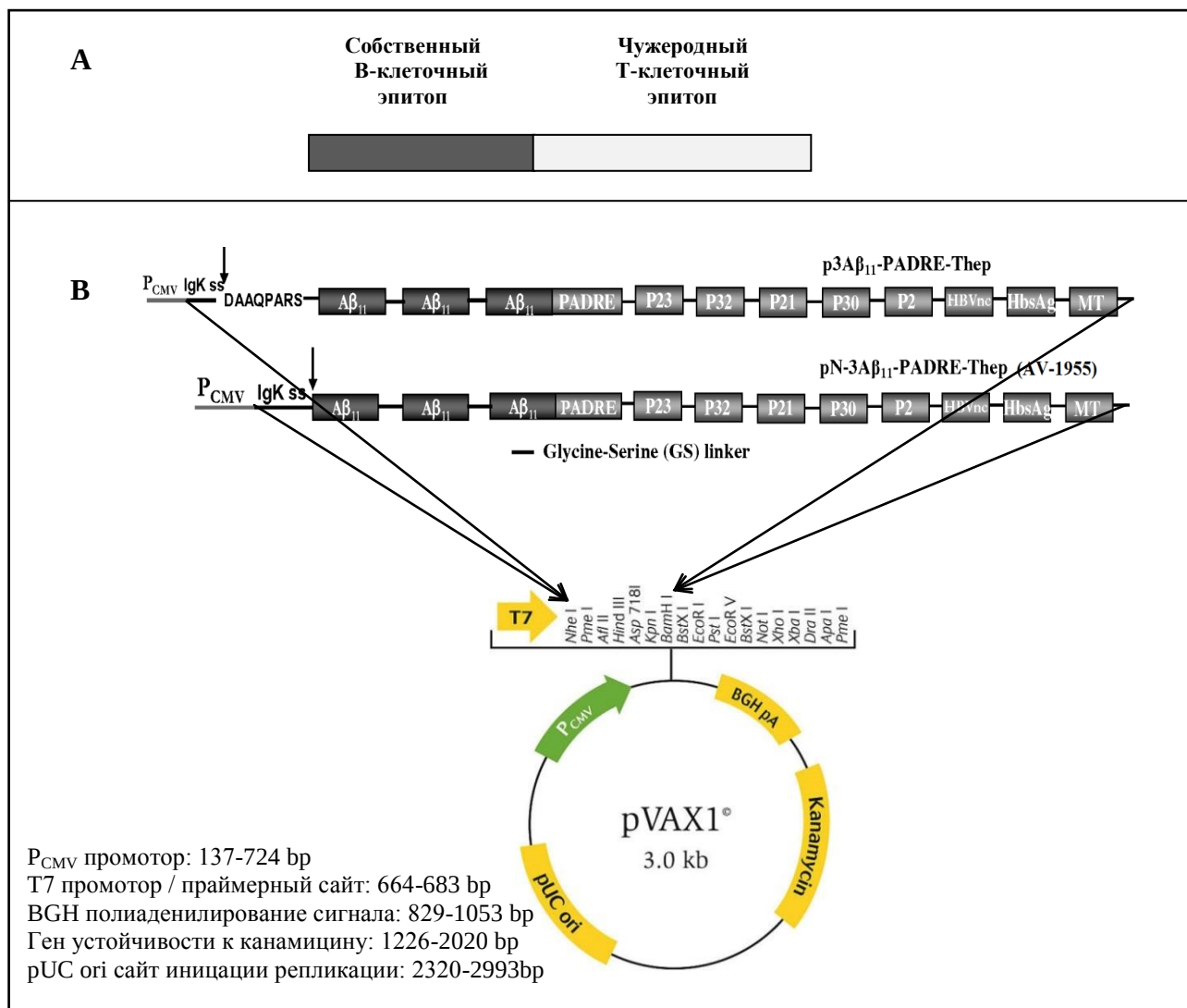


Рис. 4 Конструирование ДНК-вакцины. (A) Дизайн эпитопной вакцины, включающий в себя собственный В-клеточный эпитоп Aβ₄₂ пептида и чужеродный Т-клеточный эпитоп. (B) Схематическое изображение AV-1955 конструкции.

Учитывая все вышеперечисленные факты, опираясь на данные, полученные в предыдущих исследованиях [Ghochikyan A et al., 2009], была создана ДНК-вакцина AV-1955 – pN-3Aβ₁₋₁₁-PADRE-Ther (рис.4B). При этом первоначальная конструкция (p3Aβ₁₋₁₁-PADRE-Ther) была изменена таким образом, чтобы экспрессируемый протеин после отщепления сигнальной последовательности к-цепи иммуноглобулинов мышей (Igkss) содержал свободную N- концевую аминокислоту (аспарагиновую кислоту), три копии первых одиннадцати аминокислот человеческого Aβ пептида Aβ₁₋₁₁ с последующими за ними девятью чужеродными Ther: PADRE – синтетический Pan HLA DR эпитоп, пять эпитопов столбнячного токсина (P23, P32, P21, P30, и P2), два эпитопа вируса гепатита Б (белок ядерного капсида (HBVnc) и

поверхностного антигена (HBsAg)), и один эпитоп матричного белка вируса гриппа (MT), отделённые друг от друга небольшими глицин-сериновыми линкерами. р3A β_{1-11} -PADRE-Ther и рN-3A β_{1-11} -PADRE-Ther ПЦР конструкции были встроены в рVAX1 вектор в BamHI и NheI рестрикционных сайтах. P_{CMV}, промотор из цитомегаловируса человека; GS, глицин-серин.

Выбор В-клеточного эпитопа. Как было продемонстрировано в ранее проведенных исследованиях на мышах и людях [Lee M et al., 2003], доминантным В-клеточным эпитопом A β_{42} пептида является A β_{1-15} . Однако, основываясь на том, что в Tg(APP) и HLA класса II Tg мышах, иммунизированных фибриллярным A β_{42} , A β_{1-16} пептид был распознан Т-клетками [Das P et al., 2003], было решено укоротить В-клеточный эпитоп до A β_{1-11} . В дополнение, для значительного усиления антительного ответа и аффинитета антиген-антительного взаимодействия в конструкцию ДНК было включено 3 копии A β_{1-11} .

Выбор Th-клеточных эпитопов. В качестве чужеродных Th-клеточных эпитопов был выбран PADRE – синтетический Pan HLA DR-эпитоп [del Guercio M et al., 1997; La Rosa C et al., 2002] и Th-клеточные эпитопы стандартных вакцин (табл. 1). Столбнячный токсин (TT), вирус гепатита Б (HBV) и вирус гриппа (MT) являются примерами таких стандартных вакцин, к которым у людей есть большое количество Th-клеток памяти. Некоторые Th-эпитопы этих патогенов распознаются молекулами МНС II класса и, кроме того, среди них есть такие эпитопы, которые считаются практически универсальными. Ценность этих универсальных Th-эпитопов заключается в том, что почти у каждого человека есть специфичные к эпитопам TT, HBV и вируса гриппа CD4⁺ Т-клетки памяти, приобретенные в течение вакцинаций, полученных в детстве или же после воздействия различных патогенов на человека. Таким образом, ревакцинации эпитопной вакциной, содержащей эти Th-эпитопы, должно быть достаточным для активации уже существующих анти-TT, анти-HBV Th-клеток памяти а также Th-клеток памяти к вирусу гриппа, с последующим индуцированием анти-A β антител. Такая стратегия выбора Th-эпитопов является особо важной для лечения пожилых людей. Функциональность тимуса к 60 годам резко снижается и продукция новых Т-клеток прекращается. Как известно, с возрастом Т-клеточная популяция смещается к понижению соотношения наивных Т-

клеток к Т-клеткам памяти, вместе с тем, продукция наивных Т-клеток тимусом понижается [Candore G et al., 2008; Weinberger B et al., 2008].

Th-эпитопы	Источник	аминокислотная последовательность и её расположение	Ссылки
PADRE	синтетический	AKFVAAWTLKAAA	Baraldo K et al., 2004; Alexander J et al., 1998
P23	Столбнячный Токсин	1084-VSIDKFRIFCKANPK-1099	Baraldo K et al., 2004; Demotz S et al., 1993
P32	Столбнячный Токсин	1174-LKFIKRYTPNNEIDS-1189	Baraldo K et al., 2004; Demotz S et al., 1993
P21	Столбнячный Токсин	1064-IREDNNTLKLDRCNN-1079	Baraldo K et al., 2004; James EA et al., 2007
P30	Столбнячный Токсин	947-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-967	Baraldo K et al., 2004; Demotz S et al., 1993
P2	Столбнячный Токсин	830-QYIKANSKFIGITE-843	Baraldo K et al., 2004; Demotz S et al., 1993
HBV _{nc}	HBV ядерный капсид	50-PNHTALRQAILCWGELMTLA-69	Baraldo K et al., 2004; Alexander J et al., 2000
HBsAg	HBV поверхностный Антиген	19-FFLLTRILTIPQSLD-33	Baraldo K et al., 2004; Greenstein J et al., 1992
MT	Матричный белок вируса гриппа	17-YSGPLKAEIAQRLEDV-31	Baraldo K et al., 2004; Alexander J et al., 2000

Таблица 1. CD4⁺ Т-клеточные эпитопы (Ther).

Получение вакцины со свободной N-концевой аспаргиновой кислотой. Имеются данные, позволяющие предположить, что N-концевая аспаргиновая кислота A β ₄₂ может иметь важное значение для индукции производства антител, по крайней мере у людей [Lee M et al., 2005]. Поэтому первоначальная конструкция (p3A β ₁₋₁₁-PADRE-Ther) была изменена таким образом, чтобы экспрессируемый протеин после отщепления сигнальной последовательности к-цепи иммуноглобулинов мышей (Igkss), необходимой, для секреции протеина из клеток, содержал свободную N-концевую аспарагиновую кислоту. С этой целью методом ПЦР в конструкции p3A β ₁₁₁-PADRE-Ther был удалён регион, кодирующий дополнительные аминокислоты.

кислоты, локализованные между последовательностью первой копии $A\beta_{1-11}$ и Igkss (рис.4B).

3.2 Оценка экспрессии AV-1955 вакцины в клетках млекопитающих

После создания AV-1955 вакцины была оценена экспрессия протеина, кодируемого конструкцией pN-3A β_{1-11} -PADRE-Ther и отщепление сигнальной последовательности Igkss, способствующей посттрансляционному транспорту протеина через клеточную мембрану, соответствующим образом, что крайне необходимо для получения протеина со свободной N- концевой аспаргиновой кислотой. С этой целью клетки CHO были трансфицированы данной плазмидой, после чего IP/WB методом была оценена её экспрессия. Контролем была конструкция p3A β_{1-11} -PADRE-Ther, которая при секреции содержала восемь дополнительных аминокислот на N-конце (рис. 5A).

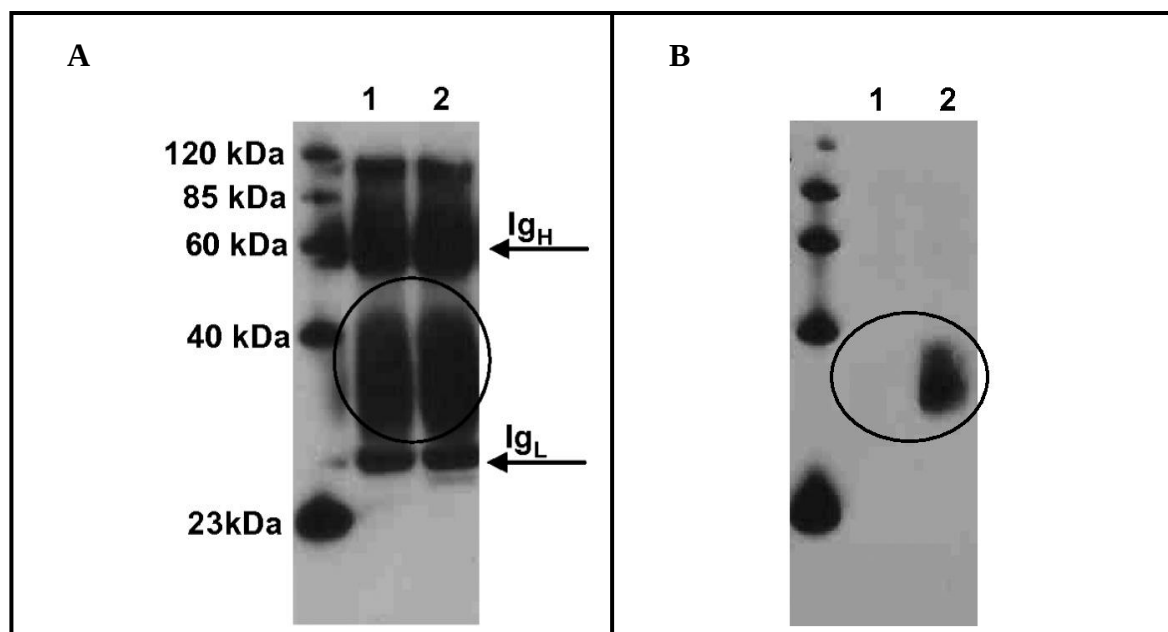


Рис. 5 Экспрессия pN-3A β_{1-11} -PADRE-Ther (линия 1) / pN-3A β_{1-11} -PADRE-Ther (линия 2) и правильность отщепления сигнальной последовательности с формированием свободной N-концевой аспарагиновой кислоты в первой копии $A\beta_{1-11}$ Оба белка иммунопреципитированы 6E10 антителами. Окрашивание производилось 6E10 (A) или кроличьими антителами, специфичными к N-концу пептида A β (B).

В качестве первичных антител были использованы коммерческие 6E10 анти-A β моноклональные антитела, которые распознают A β_{3-8} аминокислотные остатки или кроличьи анти-A β поликлональные антитела, распознающие свободный N-конец. Как показано на рис. 5, 6E10 антитела связываются с обеими пептидами: pN-3A β_{1-11} -

PADRE-Ther и p3A β_{1-11} -PADRE-Ther, в то время, как кроличьи анти-A β антитела специфичные к свободному N-концу распознают только pN-3A β_{1-11} -PADRE-Ther (рис. 5B). Как и ожидалось, после иммуноприцепитации анти-мышинные (рис. 5B), но не анти-кроличьи вторичные антитела распознают тяжелые и легкие цепи мышинных 6E10 антител.

Таким образом, результаты IP/WB показали, что AV-1955 вакцина экспрессируема и способствует синтезу секретируемого из клеток протеина N-3A β_{1-11} -PADRE-Ther, со свободной N-концевой аспарагиновой кислотой, что свидетельствует о правильности отщепления Igkss.

ГЛАВА IV. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ AV-1955

ВАКЦИНЫ У КРОЛИКОВ

4.1 Предварительное тестирование иммуногенности ДНК-вакцины AV-1955 на мышах

Перед тестированием иммуногенности и эффективности ДНК-вакцины AV-1955, состоящей из чужеродного Т-клеточного эпитопа и собственного В-клеточного эпитопа у кроликов, было решено предварительно рассмотреть действие данной вакцины на C57BL/6 мышей. Для того, чтобы повысить эффективность трансфекции ДНК в клетки, иммунизация была произведена с использованием TriGrid системы электропорации (ЭП) (Ichor Медикал Systems, San Diego, CA).

Для оценки гуморального и клеточного иммунного ответа C57BL/6 мыши H-2^b гаплотипа были иммунизированы вакциной AV-1955 на 0, 14, 28 и 42-й день в дозе 10 мкг/мышь в одну из передних большеберцовых мышц. Сыворотки, изолированные из крови мышей на 12-й день после третьей иммунизации, были использованы для анализа гуморального иммунного ответа. На 7-й день после четвертой иммунизации мыши были умерщвлены, а спленоциты, выделенные из их селезёнок были использованы для выявления клеточного иммунного ответа (рис. 6).

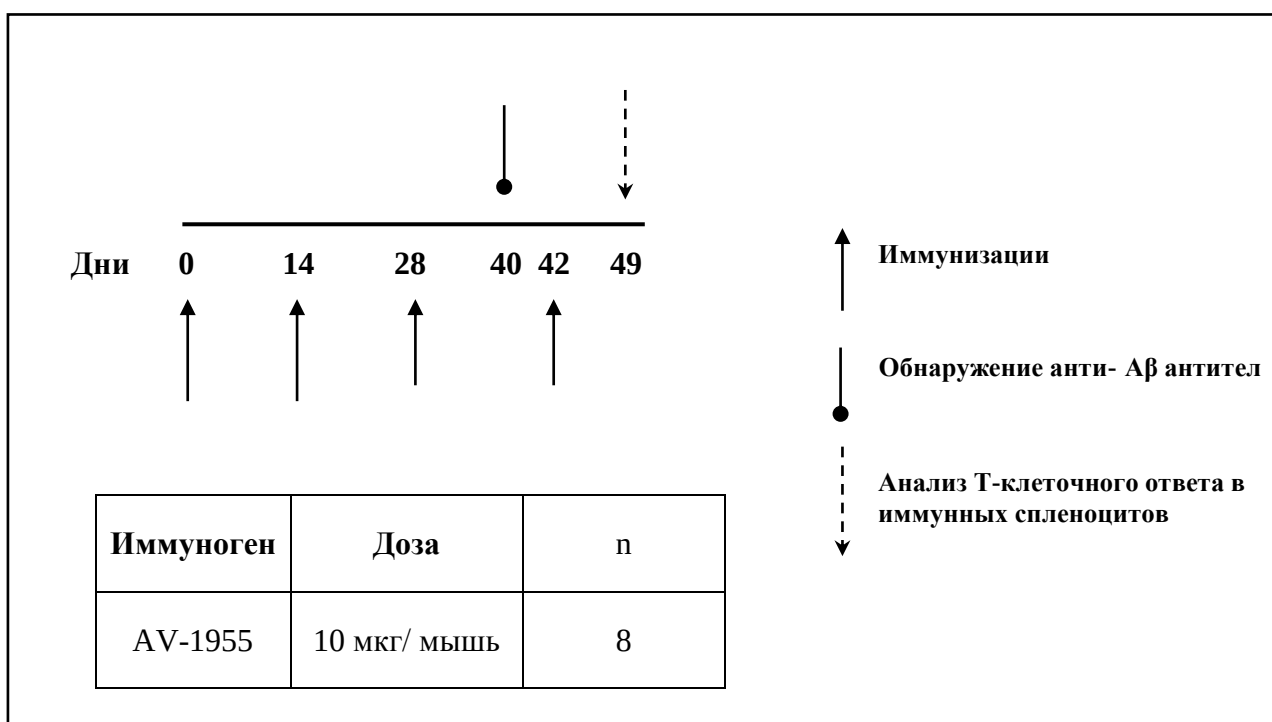


Рис. 6 Обзор эксперимента. Схематическое представление экспериментального протокола. n, число мышей.

Анализ гуморального иммунного ответа методом ИФА после третьей иммунизации в индивидуальных C57BL/6 мышах H-2^b гаплотипа показал, что AV-1955 вакцина способствует синтезу высоких концентраций анти-A β антител с средним значением 67.42 мкг/мл, (рис. 7) .

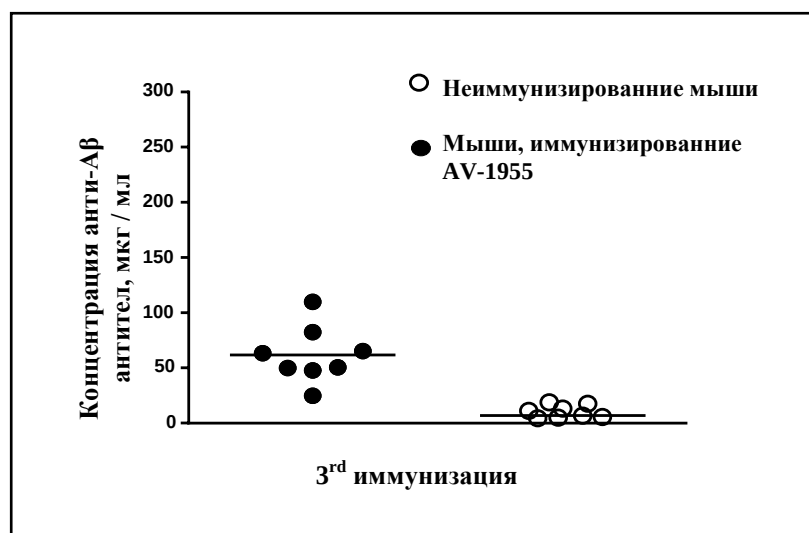


Рис. 7 Анти-A β антительный ответ после третьей иммунизации мышей AV-1955 вакциной. Горизонтальная линия показывает среднее значение концентраций (n = 8).

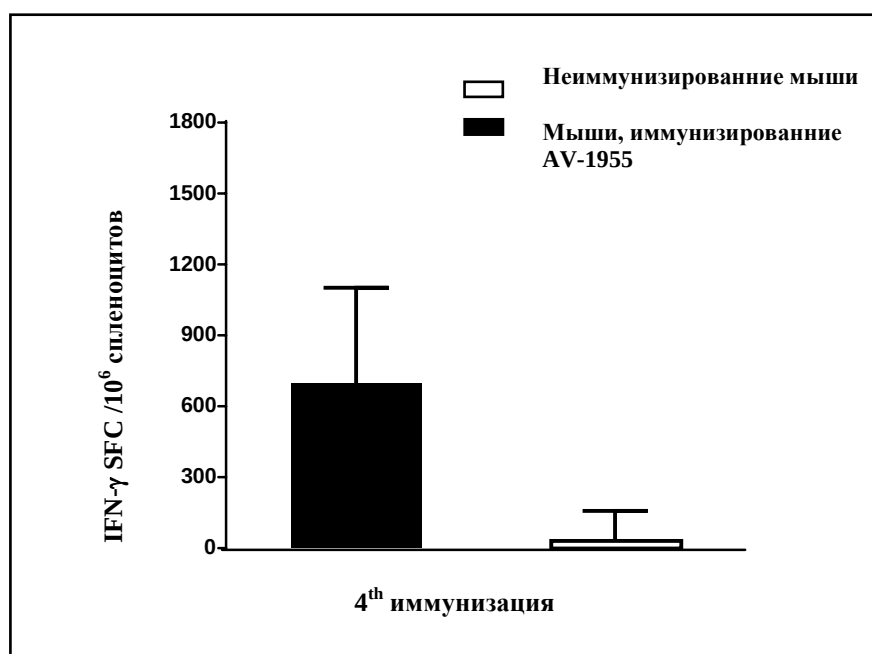


Рис. 8 Оценка Th-клеточного ответа после четвертой иммунизации мышей AV-1955 вакциной методом ELISPOT анализа. Количество интерферона IFN- γ секретирующих клеток отображено как пятно-формирующие колонии (SFC). Столбики ошибок указывают стандартное отклонение (SD), (n = 8).

Далее, после четвертой иммунизации, был проанализирован клеточный иммунный ответ в спленоцитах, выделенных из селезёнок мышей, вакцинированных AV-1955 и рестимулированных *in vitro* пептидом A β ₄₀ или коктейлем из девяти пептидов Th-эпитопов AV-1955. Оценка Th-клеточного ответа иммунных спленоцитов методом IFN- γ ELISPOT анализа продемонстрировала, что вакцина не индуцировала активацию аутореактивных Т-клеток, показав фоновый уровень IFN- γ -продуцирующих клеток после рестимуляции иммунных спленоцитов пептидом A β ₄₀ и, наоборот, спленоциты, рестимулированные коктейлем из 12 пептидов, представляющие чужеродные Th-эпитопы, показали сильный клеточный иммунный ответ. Среднее значение IFN- γ -SFC спленоцитов составило 709×10^6 , (рис. 8).

4.2 Оценка гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцину AV-1955 у кроликов

Далее, чтобы оценить гуморальный иммунный ответ и роль свободной N-концевой аминокислоты A β ₁₁ в повышении антительного ответа после иммунизации AV-1955 в сравнении с p3A β ₁₁-PADRE в кроликах, животные четыре раза еженедельно методом ЭП были иммунизированы обеими вакцинами в дозе 0.5 мг/кролика. Кровь была забрана на 12-14-й день после каждой иммунизации (рис. 9).

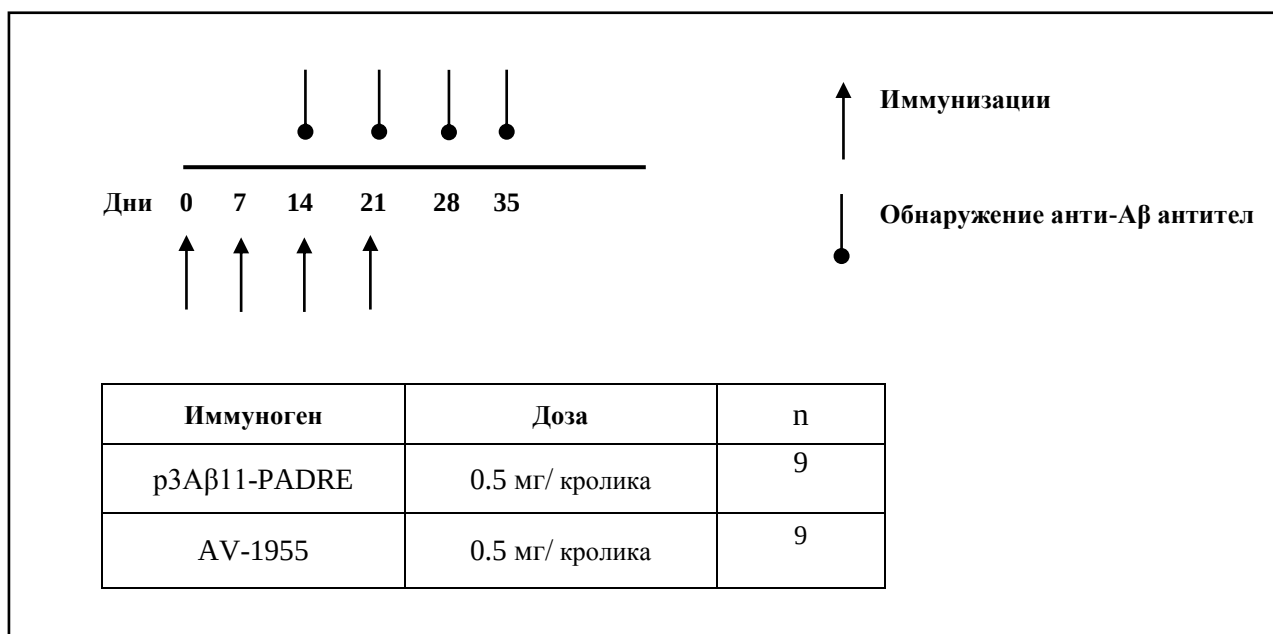


Рис. 9 Обзор эксперимента. Схематическое представление экспериментального протокола. п, число кроликов.

Анализ гуморального иммунного ответа методом ИФА показал, что кролики, дважды иммунизированные AV-1955 вакциной индуцировали анти-А β антитела в высоких концентрациях во всех девяти животных. После третьей и четвертой иммунизации наблюдался статистически незначительный спад концентрации антител по сравнению со второй иммунизацией ($P \geq 0.05$), (рис. 10А).

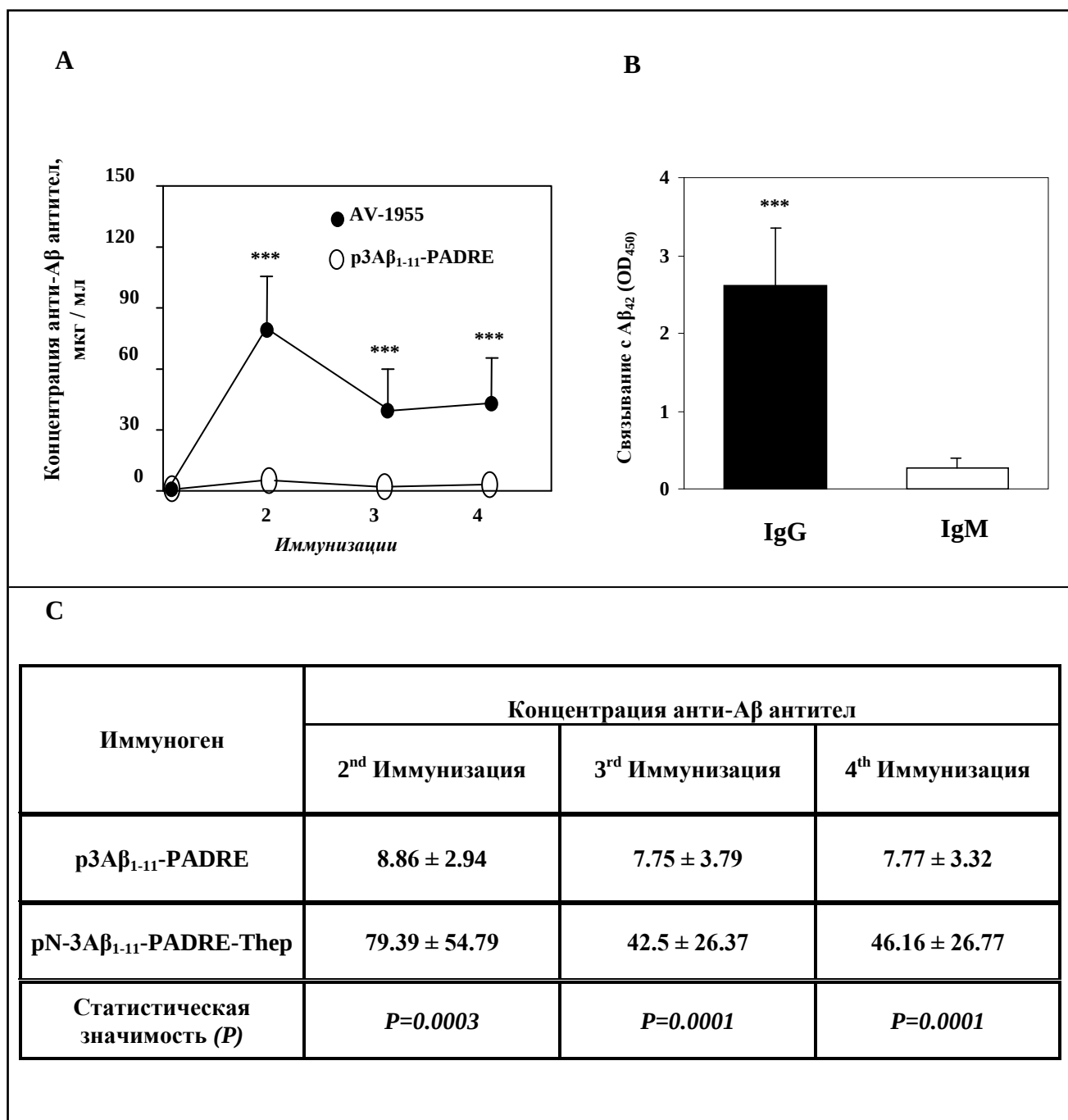


Рис. 10 Характеристика гуморального иммунного ответа кроликов на вакцину AV-1955 (А) Анти-А β антительный ответ после второй, третьей и четвертой иммунизации. (В) IgG и IgM изотипирование анти- А β антител после второй иммунизации кроликов вакциной AV-1955. Столбики ошибок указывают SD ($n = 9$).

(С) Средние данные (среднее значение $\pm$ SD) концентрации антител, генерируемых во всех кроликах каждой группы ($n = 9$).

Следует отметить, что изотипирование анти- $A\beta$ антител после второй иммунизации показало, что AV-1955 вакцина приводит к синтезу анти- $A\beta$ антител IgG изотипа ($***P = 0.001$), что говорит о Th-опосредованном гуморальном ответе (рис. 10B).

По результатам ИФА иммуногенность AV-1955, по сравнению с вакциной $p3A\beta_{11}$ -PADRE после 2, 3 и 4-й иммунизаций, была значительно выше ($***P \leq 0.001$), (рис. 10C). Чтобы понять связана ли столь высокая разница в анти- $A\beta$ антительном ответе с наличием свободной N-концевой аминокислоты $A\beta_{11}$ в AV-1955 вакцине, был проведён ИФА анализ с использованием 12-мерного пептида со свободной ($A\beta_{1-12}$) или с перекрытой ($A\beta_{2-10}$) N-концевой аминокислотой. Данные показали, что специфичность связывания антител после иммунизации AV-1955 или $p3A\beta_{11}$ -PADRE со свободной ($A\beta_{1-12}$) или с перекрытой ($A\beta_{2-10}$) N-концевой аминокислотой изменяется незначительно ($P \geq 0.05$), (рис. 11). Это свидетельствует о том, что свободный N-конец AV-1955 не влияет на специфичность антител, синтезированных в кроликах. Таким образом, скорее всего, не модификация N-концом делает AV-1955 вакцину более иммуногенной в кроликах, а добавление в неё множества Th-эпитопов.

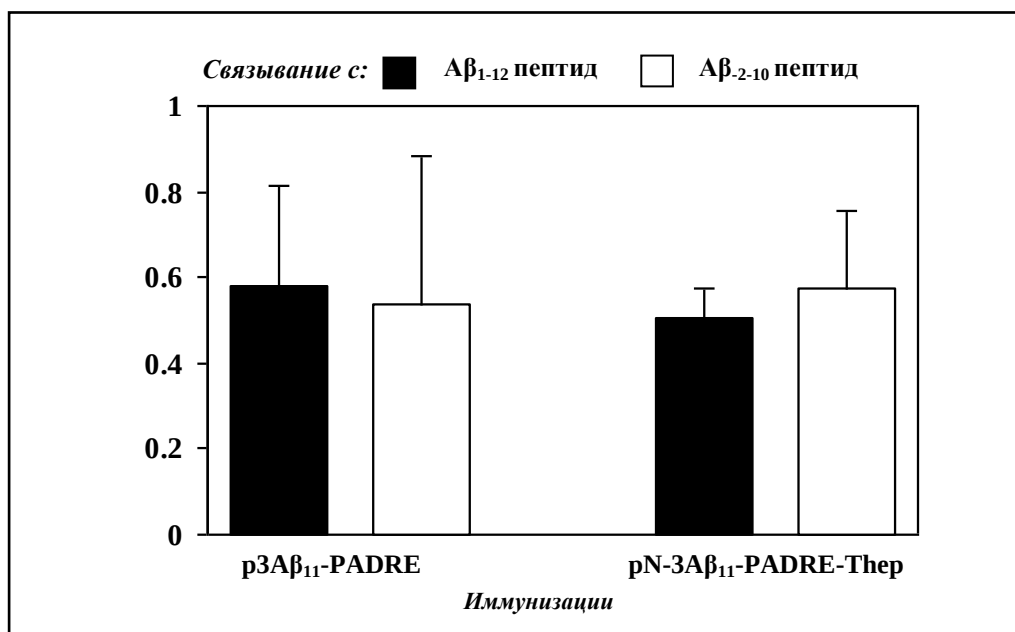


Рис. 11 Связывание сывороток кроликов, вакцинированных $p3A\beta_{11}$ -PADRE или AV-1955, с пептидом с наличием свободной N-концевой аспарагиновой кислоты и без неё. Столбики ошибок указывают SD ($n = 9$).

4.3 Функциональные характеристики анти-А β антител, генерированных вакциной AV-1955 у кроликов

Предположительно, одним из преимуществ AV-1955 вакцины над р3А β ₁₁-PADRE должно заключаться в её способности активировать не только наивные Т-клетки, количество которых с возрастом снижается, но и Т-клетки памяти, которые будут способны генерировать сильный клеточный ответ практически у всех вакцинированных лиц. Исходя из этого, была проведена характеристика антител, генерированных в кроликах после вакцинации AV-1955.

Одним из наиболее важных характеристик терапевтически мощных анти-А β антител является их способность распознавать агрегированные патологические формы А β ₄₂ пептида. С этой целью был использован SPR-основанный анализ для определения связывающей способности очищенных кроличьих анти-А β антител, полученных после иммунизации AV-1955 вакциной к различным формам А β пептида. Известно, что А β олигомеры являются наиболее патологичными формами А β ₄₂ пептида и именно они способствуют нарушению функций нейронов и возникновению когнитивных нарушений у больных БА [Lambert M et al., 1998].

Мономерные, олигомерные и фибриллярные формы А β ₄₂ пептида были выявлены посредством дот-блота с использованием: 6E10 – мышинных моноклональных антител, специфичных ко всем формам А β ₄₂; A11 – олигомер-специфичных кроличьих анти-А β антител; ОС – мономер- и олигомер-специфичных кроличьих анти-А β антител. Было показано, что кроличьи анти-А β антитела идентично связывают мономерные и фибриллярные формы амилоида, в то время, как связывание к олигомерному А β ₄₂ было значительно сильнее (* $P < 0.05$), (рис. 12). Константы диссоциации (K_D) анти-А β ₁₁/пептидных комплексов для олигомерных, мономерных и фибриллярных А β ₄₂ составили $7,04 \times 10^{-8}$ М, $2,22 \times 10^{-7}$ М и $2,03 \times 10^{-7}$ М соответственно. Следует отметить, что контрольные кроличьи IgG взаимодействовали с А β ₄₂ пептидом неспецифически.

Таким образом, данные анти-А β ₁₁ антитела могут быть эффективны для профилактики образования А β ₄₂ агрегатов или их удаления из мозга вне зависимости от характера агрегированных форм.

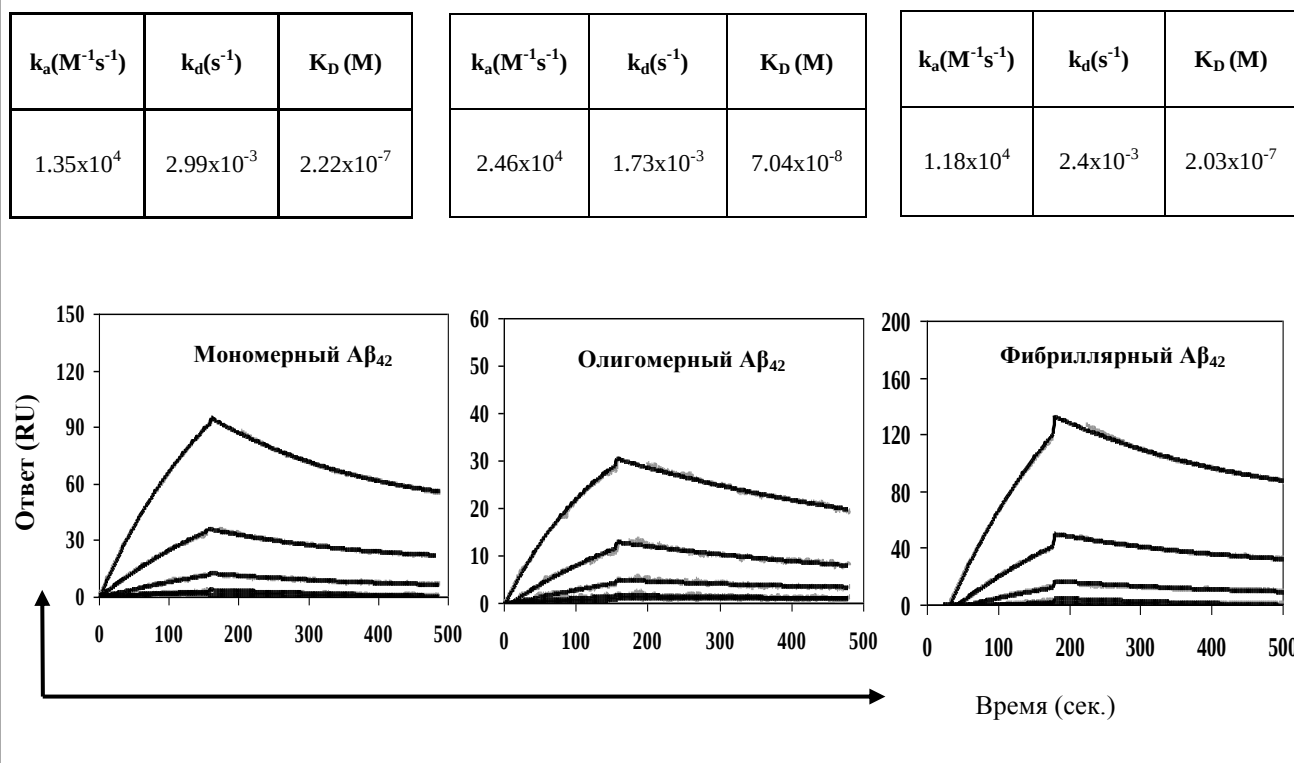


Рис. 12 Измерение способности связывания кроличьих анти- $A\beta_{1-11}$ антител с мономерными, олигомерными и фибриллярными формами $A\beta_{42}$ пептида с использованием Biacore. Кинетика ассоциации/диссоциации была измерена, как изменение SPR сигнала (в резонансных единицах) с помощью программы BIAevaluation 4.1.1. Серые точки представляют отдельные точечные данные, в то время как черные линии представляют соответствующе им кривые. RU, (Резонансная единица или единица орвета).

Важнейшей особенностью функциональности анти- $A\beta$ антител является ингибирование нейротоксичности $A\beta_{42}$ олигомеров и фибрилл. Для проверки защитного эффекта анти- $A\beta$ антител, генерированных в кроликах в ответ на AV-1955, был проведён *in vitro* анализ нейротоксичности методом МТТ с использованием SH-SY5Y клеток человеческой нейробластомы в качестве мишеней. С этой целью SH-SY5Y клетки были инкубированы с $A\beta_{42}$ олигомерами и фибриллами в отсутствии или присутствии кроличьих анти- $A\beta_{11}$ антител, или в присутствии кроличьих IgG (отрицательный контроль). Выживаемость клеток была анализирована посредством определения OD с использованием 3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразоли бромид (МТТ). Известно, что МТТ – это тетразоловый краситель, который под воздействием ферментов митохондрий приобретает синюю окраску.

Только клетки с живыми митохондриями могут осуществлять эту реакцию, следовательно интенсивность окраски прямо связана со степенью неповрежденности митохондрий. Данные показали, что $A\beta_{42}$ фибриллы/олигомеры являются нейротоксическими и снижают жизнеспособность SH-SY5Y клеток до примерно 63% и 44% соответственно (рис. 13). Однако, преинкубация $A\beta_{42}$ фибрилл с кроличьими анти- $A\beta_{42}$ антителами, выделенными из сывороток кроликов, вакцинированных AV-1955 повысили жизнеспособность SH-SY5Y клеток приблизительно до 93%. Аналогичным образом, предварительная инкубация $A\beta_{42}$ олигомеров с кроличьими анти- $A\beta_{11}$ антителами повысила жизнеспособность SH-SY5Y клеток примерно до 83,7%, тогда как контрольные кроличьи IgG не повлияли на выживаемость SH-SY5Y клеток. Следует отметить, что очищенные антитела не оказали никакого эффекта на жизнеспособность SH-SY5Y клеток.

Следовательно, как показали результаты МТТ анализа, кроличьи анти- $A\beta_{11}$ антитела ингибируют $A\beta_{42}$ фибрилл- и олигомер-опосредованную нейротоксичность, что свидетельствует об их эффективности.

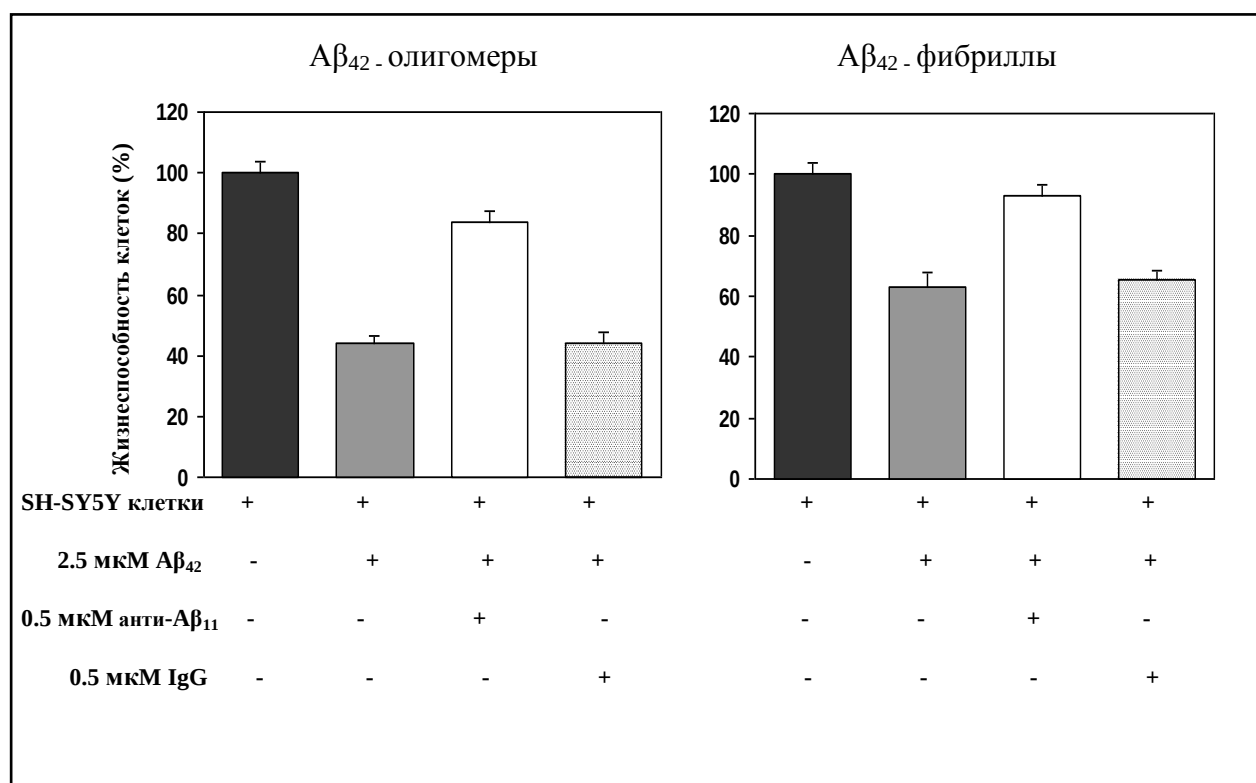


Рис. 13 Оценка ингибирования $A\beta_{42}$ фибрилл- и олигомер-опосредованной нейротоксичности кроличьими анти- $A\beta_{11}$ антителами. Данные представлены в процентах от положительного контроля $\pm$ SD.

Для исследования функционального потенциала анти- $A\beta_{11}$ антител, генерированных после третьей иммунизации в кроликах в ответ на AV-1955 вакцину, было проанализировано связывание иммунной сыворотки кроликов с человеческими $A\beta$ бляшками срезов тканей коры головного мозга с патологией БА. Данное исследование было проведено методом иммуногистохимии. Как показано на рисунке 14А, сыворотка вакцинированных кроликов связывается с $A\beta$ бляшками. Чтобы показать, что это связывание специфично, иммунные сыворотки были предварительно блокированы абсорбцией с 2,5 мкМ $A\beta_{42}$ пептидом. Как показано на рисунке 14В, в данном случае, абсорбированные $A\beta_{42}$ пептидом кроличьи иммунные сыворотки не показали связывания с $A\beta$ бляшками. В качестве положительного контроля были использованы 6Е10 анти- $A\beta$ моноклональные антитела (рис. 14С). Сыворотка, забранная из тех же кроликов до иммунизации, не показала способности связывания с человеческими $A\beta$ бляшками срезов тканей коры головного мозга с патологией БА.

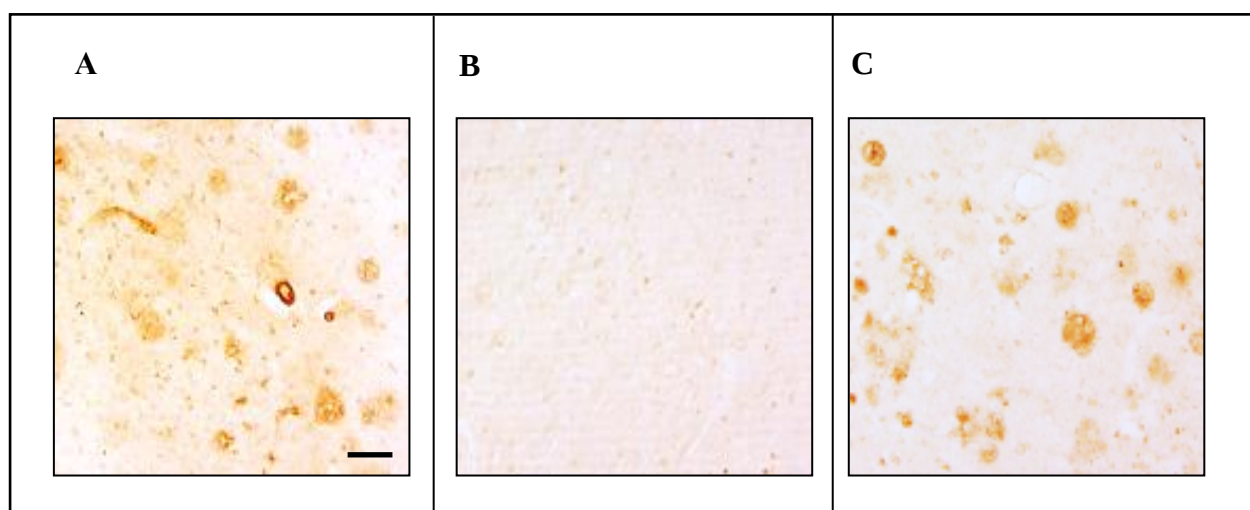


Рис. 14 Иммуногистохимическая оценка связывания иммунных сывороток кроликов с человеческими $A\beta$ бляшками срезов тканей коры головного мозга с патологией БА. (А) Использование иммунных сывороток кроликов полученных после третьей иммунизации вакциной AV-1955. (В) Применение иммунных сывороток кроликов, предварительно блокированных абсорбцией с 2,5 мкМ $A\beta_{42}$ пептидом. (С) Использование анти- $A\beta$ моноклональных (МоАб) антител – 6Е10 в качестве позитивного контроля. Оригинальное увеличение составляет 10×, линейный масштаб – 100 мкм.

Таким образом, тестирование иммуногенности и эффективности ДНК-вакцины AV-1955, состоящей из чужеродных Т-клеточных эпитопов и собственного В-

клеточного эпитопа $A\beta_{42}$ пептида ($A\beta_{11}$) со свободной N-концевой аминокислотой в C57BL/6 мышах и кроликах показали что:

1. Синтезированные анти- $A\beta$ антитела функциональны так как: (i) способны распознавать патологические формы $A\beta_{42}$ пептида (мономер, фибриллы и олигомеры); (ii) ингибируют $A\beta_{42}$ фибрилл- и олигомер-опосредованную нейротоксичность; (iii) специфически связывается с $A\beta$ бляшками на срезах человеческого мозга с патологией БА.

Исходя из этого следует, что AV-1955 вакцина может быть эффективна в клинических испытаниях, так как анти- $A\beta_{11}$ антитела способны: (i) предотвратить образование $A\beta_{42}$ агрегатов или удалить их из мозга вне зависимости от характера агрегированных форм; (ii) предотвратить или остановить деградацию нервных клеток, следовательно и возникновение когнитивных нарушений; (iii) очистить мозг от $A\beta$ бляшек.

2. Т-клеточный ответ специфичен к чужеродным Th-эпитопам и не распознаёт собственные Т-клеточные эпитопы $A\beta_{42}$, приводящие к активации аутореактивных Т-клеток, что говорит о безопасности AV-1955 вакцины.
3. Наличие свободной N-концевой аспарагиновой кислоты $A\beta_{11}$ в AV-1955 вакцине не влияет на её иммуногенность.

ГЛАВА V. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ AV-1955 ВАКЦИНЫ НА МАКАКАХ-РЕЗУСАХ

5.1 Оценка гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцину AV-1955 у макак-резусов

Вышеописанные исследования AV-1955 вакцины на моделях мышей и кроликов показали, что животные генерируют функциональные Аβ-специфические антитела к данной вакцине без активации аутореактивных Т-клеток. Для следующего шага к клиническим испытаниям на людях эта вакцина была протестирована на макаках-резусах. Целью данного исследования было выяснение способности данной конструкции содействовать гуморальному ответу к Аβ без активации Аβ-специфичных Т-клеток, изучение кинетики иммунного ответа, частоты назначения ревакцинаций, необходимых для поддержания Аβ-специфичного антительного ответа, а так же оценка безопасности вакцины на макаках-резусах.

Для оценки иммуногенности и эффективности вакцины две экспериментальные группы, состоящие из 5 макак-резусов каждая, были иммунизированы на 0, 2 и 6-й неделях в дозе 0.4 мг (группа 1) или 4мг (группа 2). Контрольная группа, состоящая из 3 макак-резусов была иммунизирована 4мг пустого вектора. Иммунизация была проведена методом ЭП. Сыворотки, полученные из крови макак-резусов, были использованы для анализа гуморального иммунного ответа. РВМСs, выделенные из крови макак на 7-й неделе, после третьей иммунизации были использованы для выявления клеточного иммунного ответа (рис. 15).

Итак, анализ гуморального иммунного ответа методом ИФА показал, что стойкий иммунный ответ был вызван на второй неделе после второй иммунизации в обеих экспериментальных группах со значительно высокими титрами антител ($P < 0.05$), а также после третьей иммунизации в группе с дозой вакцины 4мг по сравнению с группой, получившей 0,4 мг вакцины. Кроме того, Аβ-специфические антитела были обнаружены и на 17-й неделе у всех животных, что составляет 11 недель после третьей иммунизации (рис. 16А). У трёх животных, как в группе с низкой так и в группе с высокой дозой вакцины, на 26-й неделе были обнаружены незначительные титры антител ($P > 0.05$) (рис. 16А). Как и ожидалось, Аβ-специфические антитела не были обнаружены в отрицательной контрольной группе.

Изотипирование антител сыворотки на 8-й неделе исследования в группах с обеими дозами показали, что подавляющее большинство A β -специфических антител со статистически значимой разницей принадлежали классу IgG ($^{***}P = 0.001$), что указывает на Th-опосредованный гуморальный ответ (рис. 16 В, С).

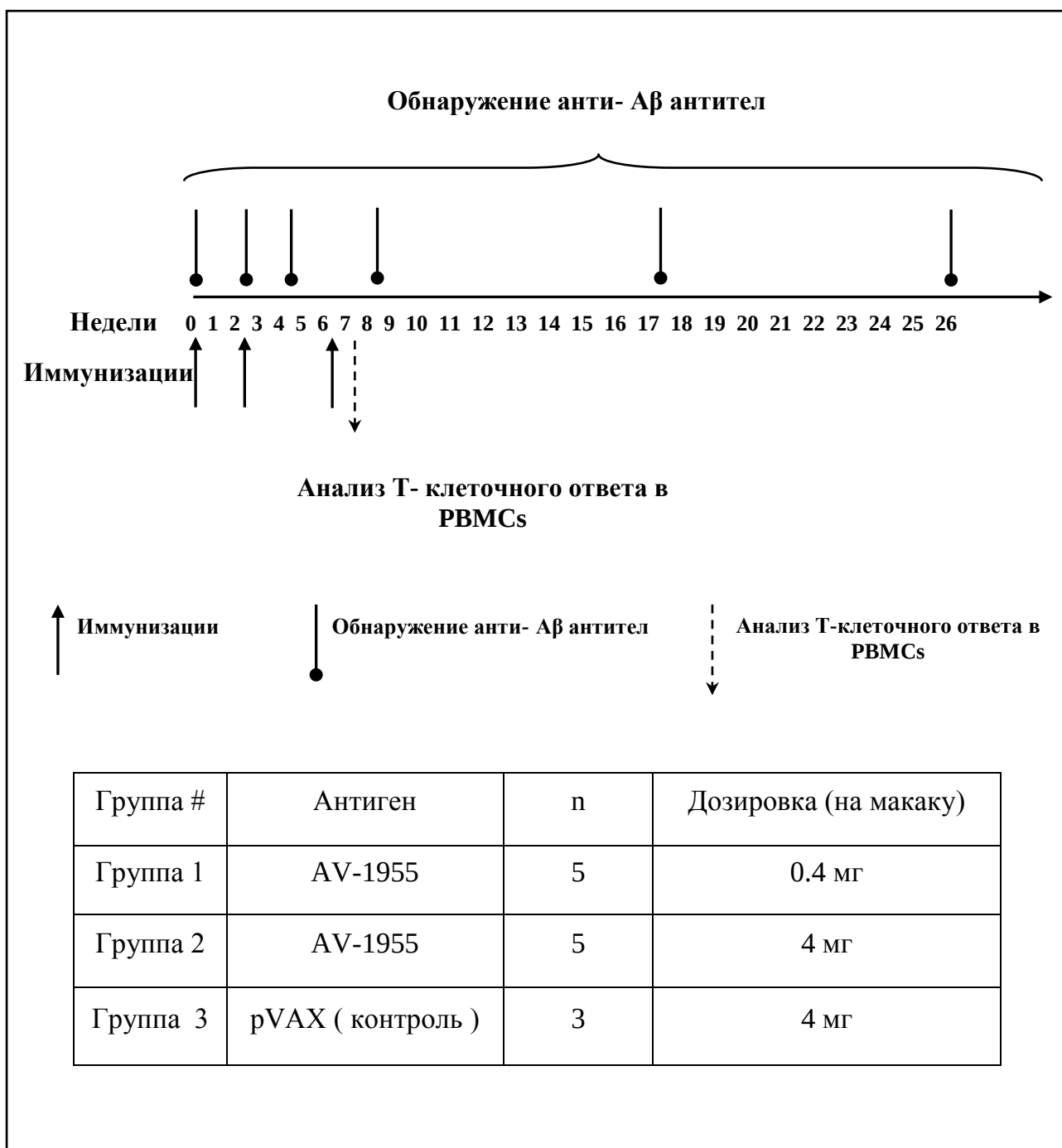


Рис. 15 Схематическое представление экспериментального протокола. п, количество макак на группу.

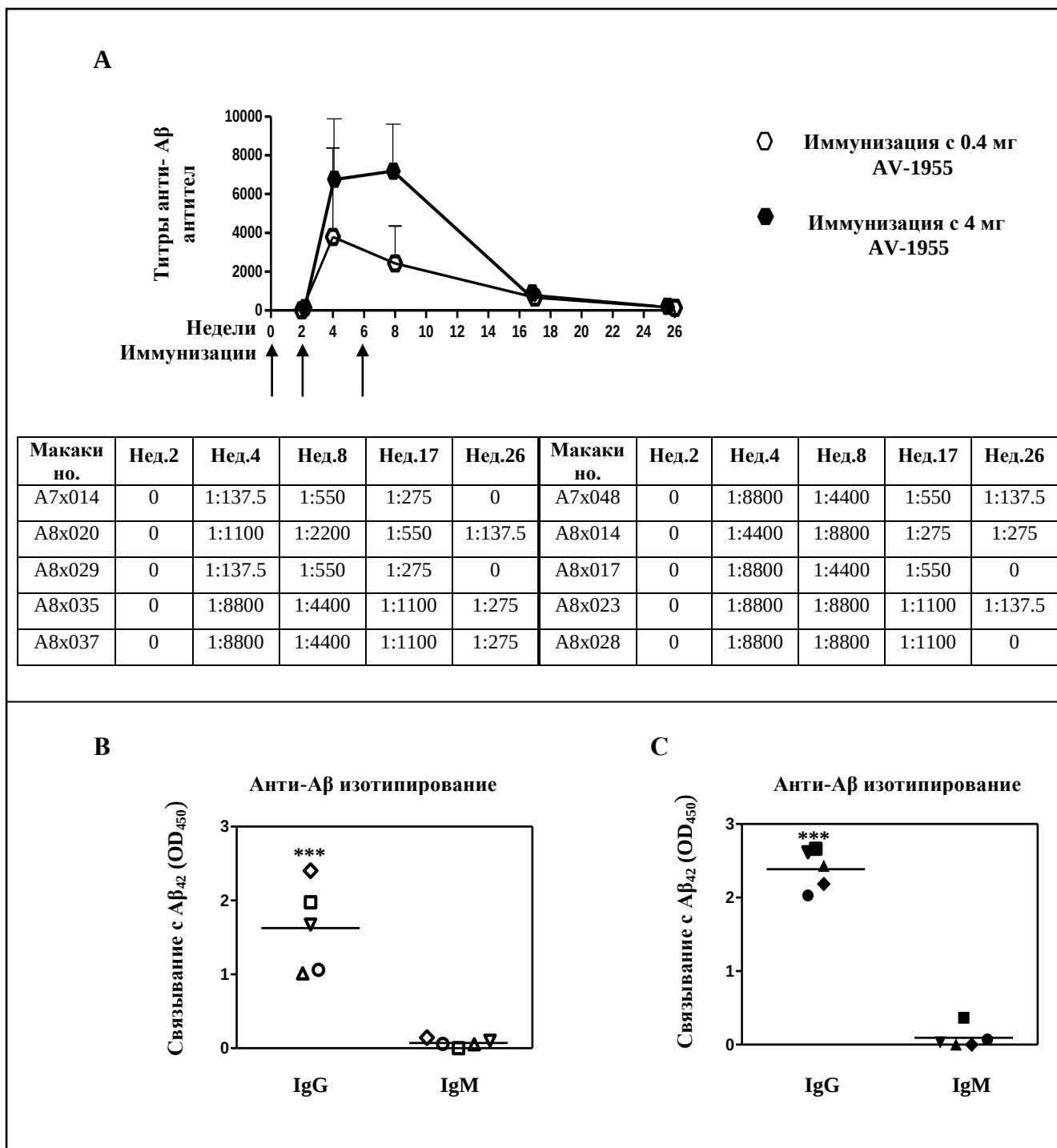
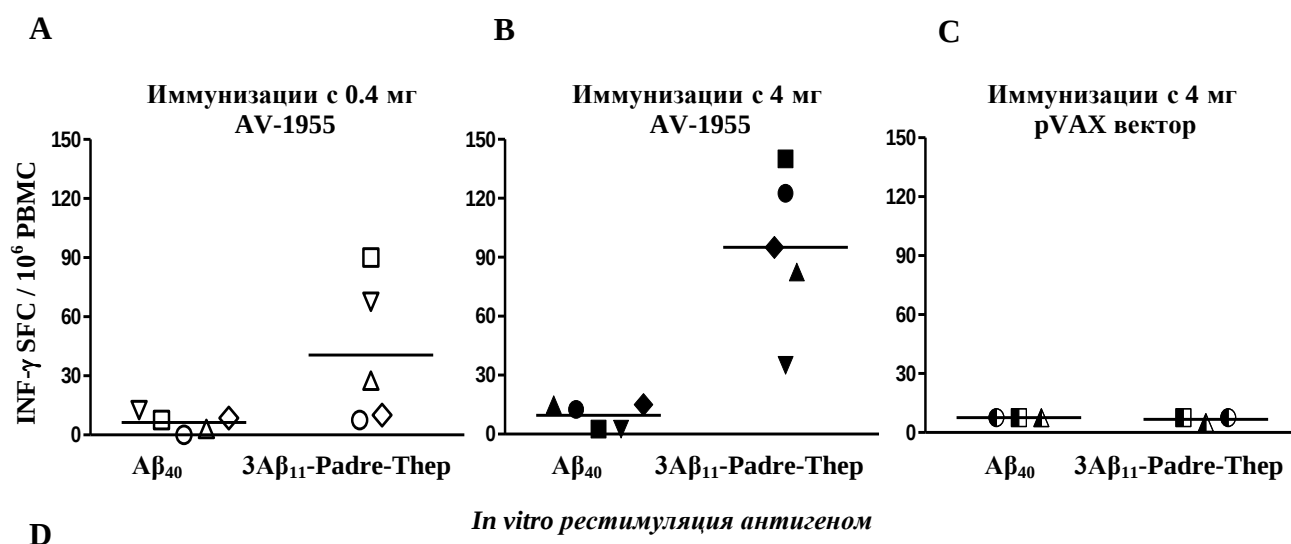


Рис. 16 Анти-Аβ антительный ответ макак-резусов после иммунизации AV-1955 вакциной. (A) В сыворотках макак-резусов было оценено среднее значение конечных точек титрования. Столбики ошибок указывают SD. (B, C) IgG и IgM изотипы антител были проанализированы в сыворотке животных после третьей иммунизации 0,4мг (B) и 4мг (C) вакциной AV-1955. Горизонтальные линии показывают среднее значение оптической плотности при длине волны 450 нм (OD₄₅₀). Нед., Неделя; но., номер.

Далее методом IFN-γ ELISPOT был изучен клеточный иммунный ответ в PBMCs, выделенных на 7-й неделе, после третьей иммунизации. Как показано на рис.

17, в PBMCs экспериментальных групп после *in vitro* рестимуляции рекомбинантным протеином 3A β ₁₁-PADRE-Ther были обнаружены IFN- γ -продуцирующие клетки. Клеточный иммунный ответ в группе, получившей 4 мг вакцины, был значительно выше (*P< 0.05), чем в группе с низкой дозой (рис. 17A, B). Важно отметить, что численность IFN- γ -продуцирующих PBMCs макак после рестимуляции A β ₄₀, иммунизированных 0,4 мг AV-1955 или 4 мг AV-1955 были на уровне фоновых. Как предполагалось, PBMC трёх контрольных животных, рестимулированные 3A β ₁₁-PADRE-Ther или A β ₄₀ протеинами не активировали клеточный иммунный ответ (рис. 17C). Эти данные показывают, что AV-1955, введенная методом ЭП, способствует активации клеточного иммунного ответа преимущественно за счёт содержащихся в ней чужеродных Th-клеточных эпитопов, что коррелирует с сильным A β ₄₂-специфичным гуморальным иммунным ответом (рис. 17D).



доза AV-1955 * (мг)	Среднее значение конечных точек титрования анти-А β . (неделя 8)	Среднее количество IFN- γ PBMCs посл стимуляции 3A β ₁₁ -PADRE-Ther (неделя 7)
0.4	1:2420 $\pm$ 862.6	40.5 $\pm$ 16.3
4	1:7040 $\pm$ 1078	97 $\pm$ 16.4
Статистическая значимость (P)	**P=0.01	**P=0.0410

*3 группа макак-резусов, получившая pVAX вектор не проявляет ни способности к синтезу анти- A β антител, ни активации IFN- γ T-клеточного ответа после рестимуляции A β ₄₀ или 3A β ₁₁-PADRE-Ther протеином.

Рис. 17 Оценка клеточного иммунного ответа методом ELISPOT в PBMCs, изолированных из крови макак-резусов, полученных на 7-й неделе, через неделю после третьей иммунизации AV-1955 вакциной или вектором. Количество IFN- γ -

секретирующих клеток отображается как число пятноформирующих колоний (SFCs) для каждой макаки, получившей 0,4 мг (А) или 4 мг (В) AV-1955 вакцины, или 4 мг pVAX1 вектора (С). Горизонтальные линии показывают среднее значение ответов. (D) Сравнение гуморального и клеточного иммунного ответов у макак-резусов после третьей иммунизации.

5.2 Функциональные характеристики анти-Аβ антител, генерированных вакциной AV-1955 у макак-резусов

Функциональность антител, генерированных в ответ на вакцинацию AV-1955, была изучена тремя различными подходами.

В первую очередь, с помощью SPR анализа была оценена аффинность связывания очищенных Аβ-специфических антител макак-резусов с различным формами Аβ₄₂. Как показано на рисунке 18, анти-Аβ антитела макак-резусов с высокой аффинностью связываются с иммобилизованными Аβ мономерами, олигомерами и фибриллами ($K_D = 19.2 \pm 0.4 \times 10^{-8}$ М, $2.52 \pm 0.06 \times 10^{-8}$ М и $9.96 \pm 0.04 \times 10^{-8}$ М, соответственно), в то время, как связывания обезьяньих IgG к данным пептидам не было обнаружено. Аффинность связывание антител к олигомерам, наиболее токсичной форме Аβ₄₂ [Lambert M et al., 1998], была значительно больше, чем к фибриллам и мономерам ($^{***}P < 0.0001$). Кроме того, аффинность связывания антител к фибриллам была значительно больше, чем к мономерным пептидам ($^{**}P < 0.001$). Таким образом, иммунизация макак-резусов вакциной AV-1955 привела к выработке анти-Аβ₁₁ антител, способных связывать различные формы Аβ₄₂ пептида, причём, с наибольшей аффинностью связывания к наиболее токсичной олигомерной форме, что может быть эффективным для предотвращения образования Аβ₄₂ агрегатов или их удаления из мозга вне зависимости от характера агрегированных форм.

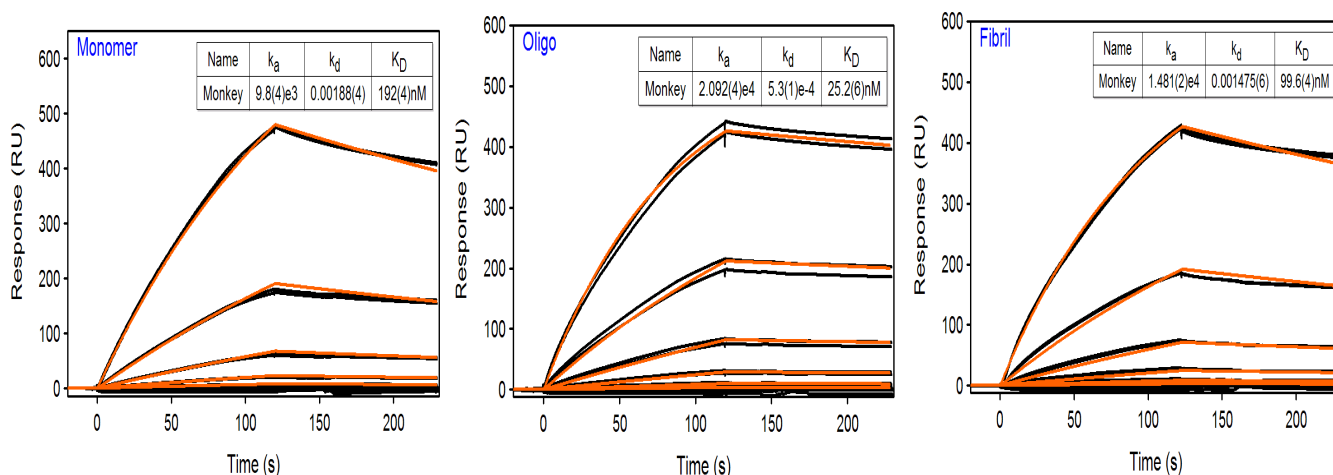


Рис. 18 Анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для получения накладной сенсограммы, изображающей связывание различных концентраций очищенных анти- $A\beta_{1-11}$ антител макак-резусов с иммобилизованными на поверхность биосенсорного чипа (CM5) мономерами, олигомерами и фибриллами $A\beta_{42}$ пептида. RU, (Резонансная единица или единица орвета).

Для проверки защитного эффекта анти- $A\beta$ антител, генерированных у макак-резусов в ответ на вакцину AV-1955, против $A\beta$ -индуцированной нейротоксичности, на SH-SY5Y клетках человеческой нейробластомы, был проведён *in vitro* анализ нейротоксичности методом МТТ. С этой целью SH-SY5Y клетки были инкубированы с $A\beta_{42}$ олигомерами и фибриллами в отсутствии или присутствии анти- $A\beta_{11}$ антител макак-резусов, или в присутствии кроличьих IgG (отрицательный контроль). Выживаемость клеток была проанализирована посредством определения OD с использованием тетразолового красителя МТТ.

Как показано на рисунке 19, олигомерные и фибриллярные $A\beta_{42}$, будуче нейротоксичными, снижают жизнеспособность SH-SY5Y клеток до 44% и 63%, соответственно. Однако, преинкубация $A\beta_{42}$ олигомеров и фибрилл с анти- $A\beta_{42}$ антителами макак-резусов, вакцинированных AV-1955 повысили жизнеспособность SH-SY5Y клеток до 82% и 94%, соответственно. Преинкубация же олигомеров или фибриллов с контрольными обезьяньими IgG не предохранили клетки нейробластомы от нейротоксичности этих пептидов. Эти данные говорят о том, что анти- $A\beta$ антитела макак-резусов способны подавлять $A\beta_{42}$ фибрилл- и олигомер-опосредованную нейротоксичности (рис. 19).

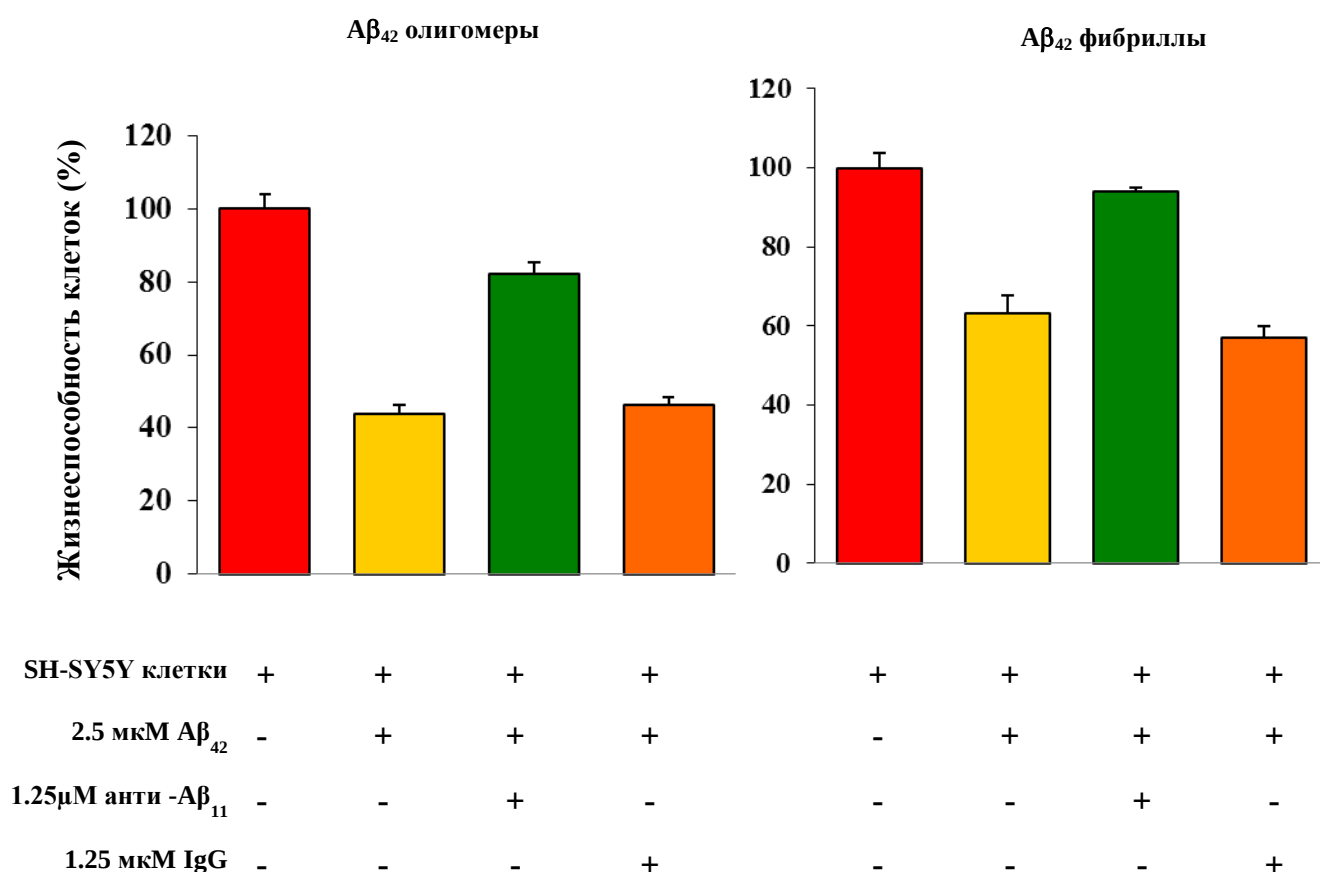


Рис. 19 Оценка ингибирования Аβ₄₂ фибрилл- и олигомер-опосредованной нейротоксичности анти-Аβ₁₁ антителами макак-резусов. Данные представлены в процентах от положительного контроля ± SD.

И наконец, для функциональной характеристики анти-Аβ антител, макак-резусов, иммуногистохимическим методом было проверено связывание данных антител с человеческими Аβ бляшками срезов тканей фронтальной части коры головного мозга с патологией БА. Как показано на рисунке 20 анти-Аβ антитела, синтезированные в ответ на иммунизацию вакциной AV-1955 связываются с Аβ бляшками срезов мозга с патологией БА аналогично 6E10 анти-Аβ моноклональным антителам (положительный контроль). Как и ожидалось, связывание IgG (отрицательный контроль) с Аβ бляшками не обнаружено (рис. 20). Следует отметить, что очищенные анти-Аβ антитела, полученные от иммунных макак-резусов, не связываются со срезами мозга без наличия патологии БА. Таким образом, антитела индуцированные AV-1955 вакциной, способны связываться с амилоидными бляшками срезов мозга больных БА.

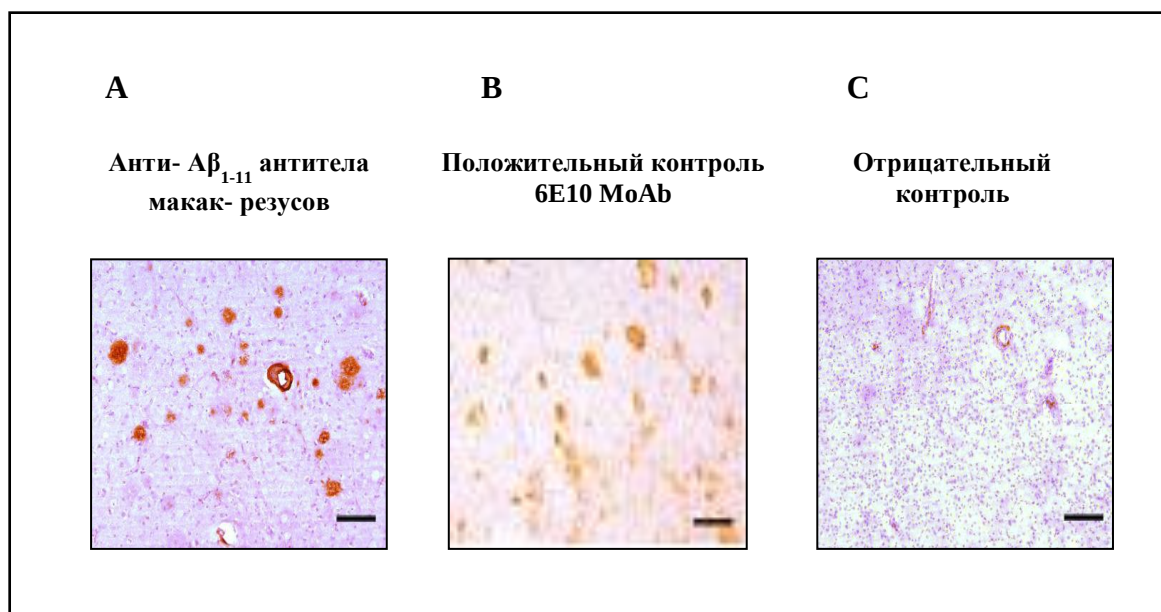


Рис. 20 Иммуногистохимическая оценка связывания анти-Аβ антител макак-резусов с человеческими Аβ бляшками срезов тканей коры головного мозга с патологией БА. (А) Использование анти-Аβ антител макак-резусов, индуцированных AV-1955 вакциной. (В) В качестве положительного контроля были использованы анти-Аβ моноклональные (МоАб) антитела – 6E10. (С) Применение обезьяньих IgG в качестве отрицательного контроля. Оригинальное увеличение составляет 10×, линейный масштаб – 100 мкм.

5.3 Продолжительность динамики иммунной реакции в ответ на AV-1955 у макак-резусов

Поскольку экспериментальная группа макак-резусов, иммунизированная дозой 4мг, показала значительно более высокий гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ после трёх иммунизаций ($^{**}P=0.0410$, $^{**}P=0.01$ соответственно) по сравнению с группой, иммунизированной дозой 0.4мг AV-1955, с целью получения большей информации для понимания кинетики иммунного ответа, было решено продолжить эксперимент с группой, иммунизированной дозой 4мг и контрольной группой в течение ещё 11 месяцев (рис. 21А). Таким образом, в ходе второго этапа данного исследования на 26, 44 и 48-й неделях экспериментальные макаки были ревакцинированы методом ЭП (аналогичная процедура была проведена и с контрольной группой макак, иммунизированной 4мг pVAX). Анти-Аβ антитела в сыворотках всех животных (экспериментальных и контрольных) были измерены на 28, 36, 44, 46, 48, 50, 54, 60 и 73-й неделях. Иммунизация макак после 20-и недельного периода покоя (на 26-й неделе) незначительно увеличила концентрацию анти-Аβ

антител на 28-й неделе, однако, на 36-й неделе антител уже не было обнаружено (рис. 21B). Тем не менее, после очередного 18-недельного периода покоя, иммунизация AV-1955 (на 44-й неделе), способствовала значительному повышению гуморального иммунного ответа: титры антител через 2 недели после пятой иммунизации поднялись до уровня антител, обнаруженных после второй и третьей иммунизаций. Дополнительная иммунизация на 48-й неделе ещё больше увеличивала уровень антител (рис. 21B). Важно отметить, что измерение титров антител после последней иммунизации AV-1955 показали очень медленное их снижение, что свидетельствует о длительности сохранения гуморального иммунного ответа. Фактически, титры антител оставались относительно высокими до последних дней исследования, на 73-й неделе, что составляет 25 недель после последней иммунизации (рис. 21B).

Далее, на 49-й неделе, через неделю после шестой иммунизации, в PBMCs экспериментальных и контрольных макак был оценён клеточный иммунный ответ методом IFN- γ ELISPOT. Как показано на рисунке 22, иммунизация AV-1955 вакциной на 48-й неделе статистически значимо увеличила клеточный иммунный ответ PBMCs, рестимулированных 3A β_{11} -PADRE-Ther протеином (**P < 0.0001). Данный клеточный иммунный ответ был примерно в четыре-пять раз выше, чем ответ в тех же макаках после третьей иммунизации AV-1955 (рис. 17B,D). Следует отметить, что иммунные PBMCs были также рестимулированы рекомбинантным протеином без наличия последовательности A β_{11} (PADRE-Ther). Полученные данные показывают, что оба протеина активируют одинаковое количество IFN- γ -продуцирующих клеток, что говорит об активации клеток за счёт Th-эпитопов вакцины AV-1955, а не за счёт эпитопа A β_{11} . Важно отметить, что рестимуляция PBMCs макак пептидом A β_{40} после шести иммунизаций AV-1955 вакциной, показала, что IFN- γ -продуцирующие клетки находятся на фоновом уровне (рис. 22).

В совокупности эти данные показывают, что даже после шести иммунизаций AV-1955 вакциной, не было выявлено аутореактивного A β -специфического клеточного иммунного ответа, в то время как желаемый клеточный иммунный ответ к чужеродным Th-эпитопам присутствовал. В соответствии с этими результатами, ключевым выводом в данном исследовании является то, что неблагоприятных эффектов, связанных с AV-1955 вакциной, в исследуемых животных в течение 18 месяцев и шести иммунизаций не было обнаружено.

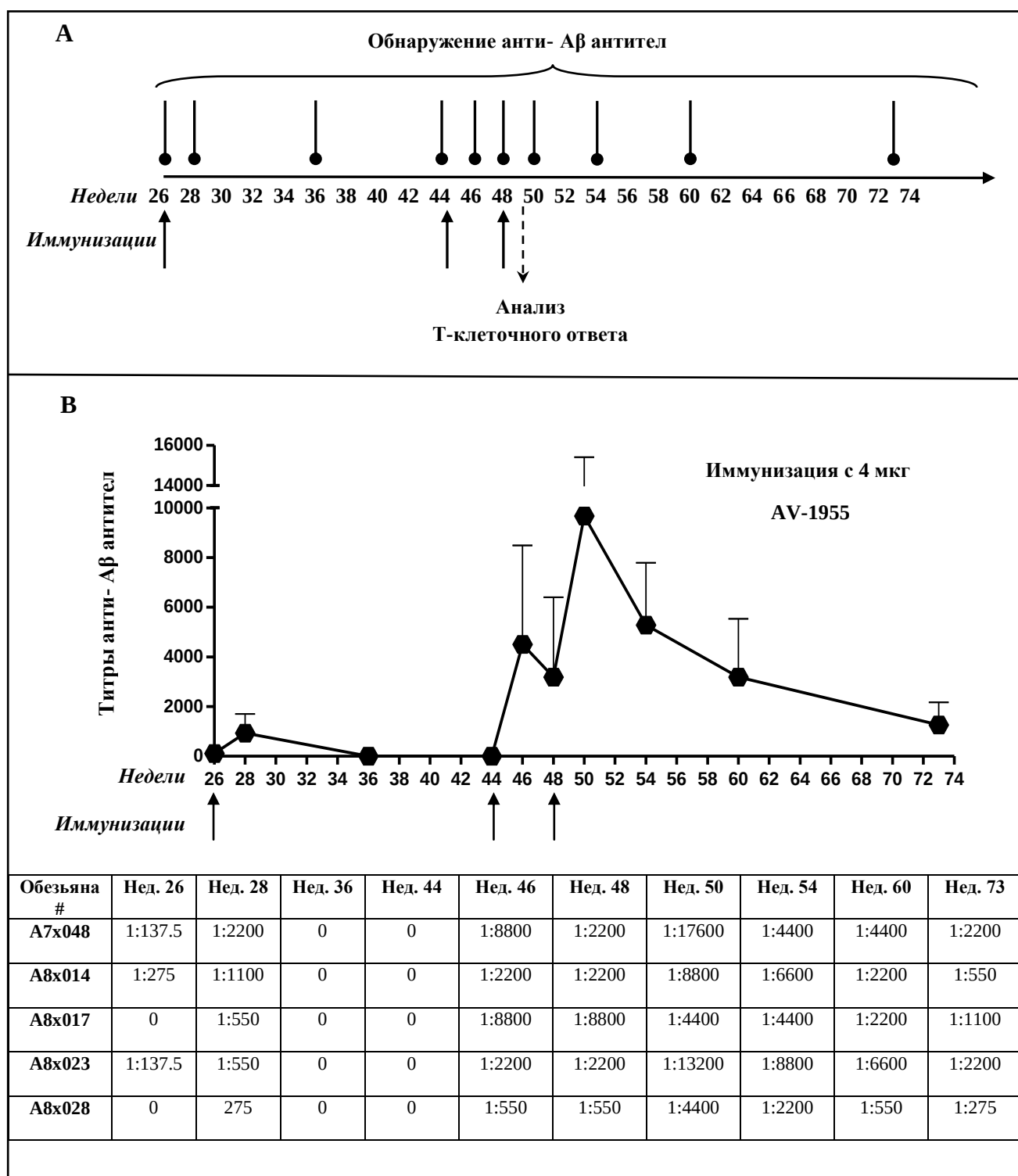


Рис. 21 Обзор второго этапа экспериментального исследования вакцины AV-1955 по изучению динамики гуморального иммунного ответа на макаках-резусах. (A) Схема иммунизаций макак вакциной AV-1955. (B) Оценка продолжительности динамики гуморального иммунного ответа. Столбики ошибок указывают SD.

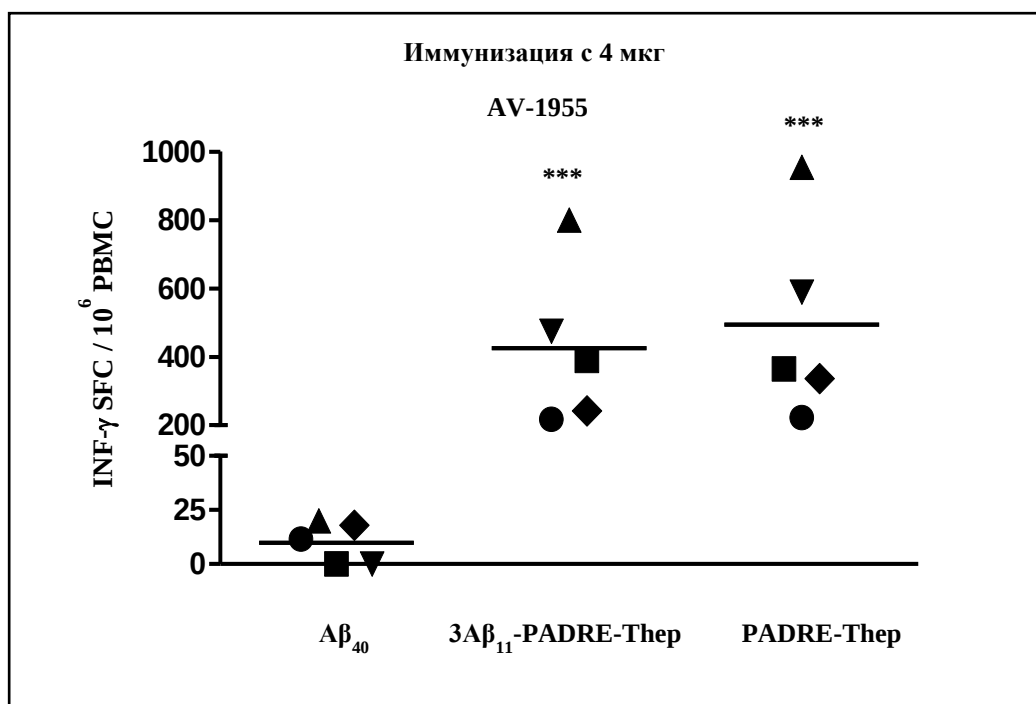


Рис. 22 Оценка клеточного иммунного ответа в PBMCs макак-резусов после шестой иммунизации вакциной AV-1955. Горизонтальные линии показывают среднее значение ответов. Статистическая достоверность разницы была высчитана в сравнении с $A\beta_{40}$ -специфическими SFC (***) ($P \leq 0.001$).

Таким образом, тестирование иммуногенности и эффективности ДНК-вакцины AV-1955 на макаках-резусах показали что:

1. Синтезированные анти- $A\beta$ антитела функциональны, так как: (i) способны распознавать патологические формы $A\beta_{42}$ пептида (мономеры, фибриллы и олигомеры); (ii) ингибируют $A\beta_{42}$ фибрилл- и олигомер-опосредованную нейротоксичность; (iii) специфически связывается с $A\beta$ бляшками на срезах человеческого мозга с патологией БА.

Исходя из этого следует, что AV-1955 вакцина может быть эффективна в клинических испытаниях, так как анти- $A\beta_{11}$ антитела способны: (i) предотвратить образование $A\beta_{42}$ агрегатов или удалить их из мозга вне зависимости от характера агрегированных форм; (ii) предотвратить или остановить деградацию нервных клеток, следовательно и возникновение когнитивных нарушений; (iii) очистить мозг от $A\beta$ бляшек.

2. Изучение динамики гуморального иммунного ответа на повторную иммунизацию AV-1955 вакциной после 18-и недельного покоя у макак-резусов

показало резкий подъём титров анти- $A\beta$ антител с последующим медленным спадом в течение 25 недель, что говорит о длительном сохранении гуморального иммунного ответа у макак-резусов.

3. Т-клеточный ответ специфичен к чужеродным Th-эпитолам и не распознаёт собственные Т-клеточные эпитолам $A\beta_{42}$, приводящие к активации аутореактивных Т-клеток даже после шести иммунизаций AV-1955 вакциной в течение 18 месяцев, что говорит о безопасности AV-1955 вакцины.

ГЛАВА VI. МОДИФИЦИРОВАНИЕ AV-1955 И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЕЁ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА МЫШАХ И МАКАКАХ-РЕЗУСАХ

6.1 Модифицирование AV-1955 вакцины

Как было описано выше ДНК-вакцина AV-1955 показала высокую иммуногенность и относительную безопасность у мышей, кроликов и макак-резусов, так как она способствовала генерации потенциально терапевтически эффективных анти-А β антител IgG класса без активации аутореактивных Т-клеток. Однако, известно, что гены молекул МНС у человека чрезвычайно полиморфны, в связи с чем, различные эпитопы одного и того же чужеродного антигена, включённого в дизайн вакцины, представляемые молекулами МНС II класса CD4⁺ Th-клеткам могут активировать широкий репертуар Th-клеток.

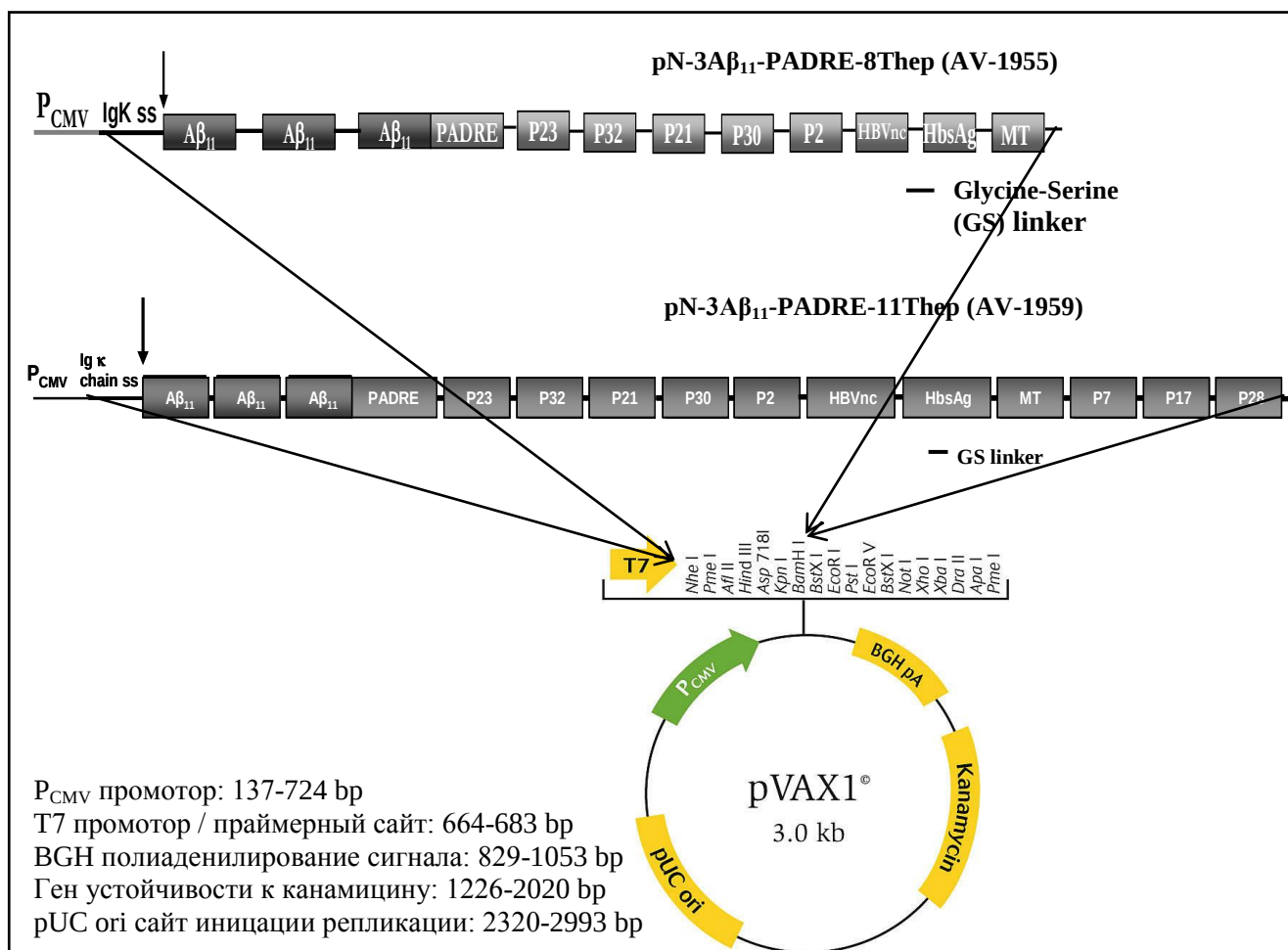


Рис. 23 Эпитопная вакцина против БА, основанная на MultiTER платформе. Схематическое изображение AV-1955 и AV-1959 конструкций, кодирующих три копии первых одиннадцати аминокислот человеческого А β пептида с последующими за ними восемью (AV-1955) или одиннадцатью (AV-1959) чужеродными Ther и

синтетическим Th- эпитопом– PADRE. Сигнальная последовательность Igkss находится непосредственно перед первой копией N-концевой $A\beta_{1-11}$. рN-3 $A\beta_{1-11}$ -PADRE-8Ther и рN-3 $A\beta_{1-11}$ -PADRE-11Ther ПЦР конструкции были встроены в рVAX1 вектор в BamHI и NheI рестрикционных сайтах. P_{CMV}, промотор из цитомегаловируса человека; GS, глицин- серин.

Таким образом, есть вероятность, что один и тот же чужеродный Th-эпитоп может быть распознан TCR CD4⁺ Th-клетками у одного индивида и остаться нераспознанным у другого. Исходя из этого, повышение иммуногенности вакцины AV-1955, в данном случае, подразумевает включение в состав вакцины большего количества различных чужеродных эпитопов. С этой целью было решено в дизайн данной вакцины добавить ещё три эпитопа из столбнячного токсина (P7, P17, P28). Выбор именно этих эпитопов объясняется тем, что они входят в состав стандартной вакцины против столбняка. То есть, почти у каждого человека к данным эпитопам уже существуют CD4⁺ Т-клетки памяти, приобретенные в течение вакцинаций, полученных в детстве, что в свою очередь будет способствовать повышению иммуногенности вакцины. Модифицированная AV-1955 вакцина была названа AV-1959 (рис. 23).

6.2 Оценка иммунологической эффективности AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 у мышей

Для сравнения иммуногенности вакцины AV-1955 с AV-1959 две группы мышей, H-2^b гаплотипа, методом ЭП были иммунизированы на 0, 14, 28 и 42-й день данными вакцинами в дозе 10 мкг/мышь в одну из передних большеберцовых мышц. Сыворотки, изолированные из крови мышей на 12-й день после третьей иммунизации, были использованы для анализа гуморального иммунного ответа. На 7-й день после четвертой иммунизации мыши были умерщвлены, а спленоциты, выделенные из их селезёнок, были использованы для выявления клеточного иммунного ответа (рис. 24).

Кроме того, для того, чтобы было возможно в дальнейшем тестировать AV-1955 и AV-1959 вакцины в клинических испытаниях, было решено впервые охарактеризовать репертуар В- и Т-клеточного иммунного ответа у вакцинированных макак-резусов. Как известно $A\beta_{42}$ последовательность макак идентична человеческой, что говорит о критической важности этих животных в исследованиях вакцин против БА [Zahn L et al., 2007]. Перед началом испытаний вакцины AV-1959 на макаках-

резусах было решено сначала картировать В- и Т- клеточные эпитопы мышей Н-2^b гаплотипа, иммунизированных AV-1955 и AV-1959. Цель такого подхода заключается в сравнения этих результатов с результатами, которые будут в дальнейшем получены при картировании В- и Т-клеточных эпитопов макак-резусов.

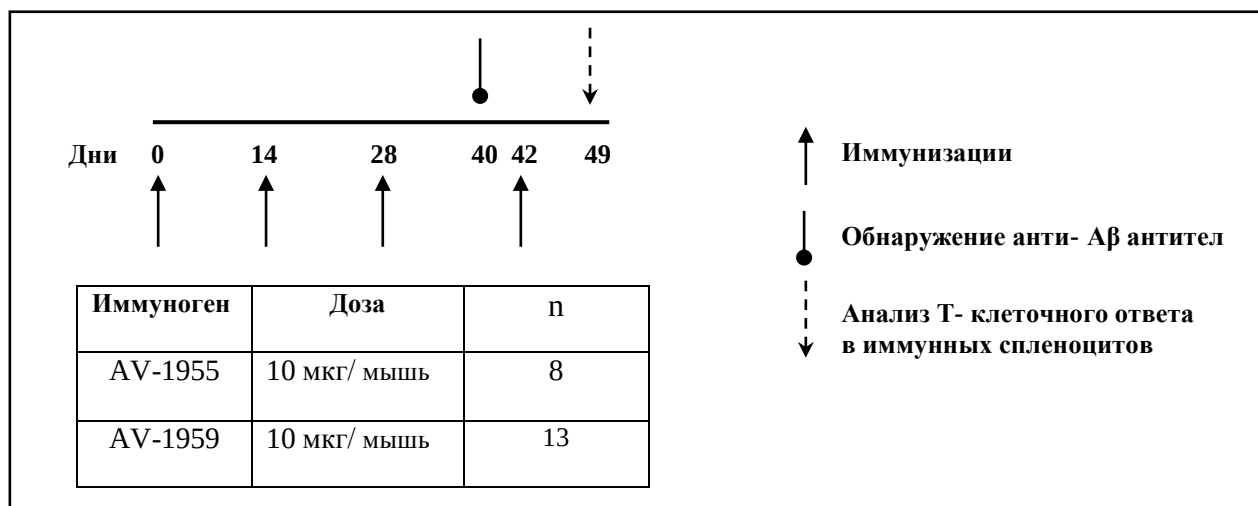


Рис. 24 Дизайн экспериментального протокола иммунизации мышей вакцинами AV-1955 и AV-1959.

Анализ гуморального иммунного ответа методом ИФА у индивидуальных C57BL/6 мышей, вакцинированных AV-1955 (n=8) или AV-1959 (n=13), после третьей иммунизации показал, что последний иммуноген способствовал синтезу анти-Аβ антител в более высоких концентрациях со статистически значимой разницей (**P < 0.01), (рис. 25А).

Ранее, различными группами [Cribbs D et al., 2007; Lemere C et al., 2001] был картирован иммунодоминантный В-клеточный эпитоп Аβ₄₂ (первые 15 аминокислот N-концевой части этого пептида). Кроме того, имеются данные, позволяющие предположить, что N-концевая аспаргиновая кислота Аβ₄₂ может иметь важное значение для индукции антител, по крайней мере в людях [Lee M et al., 2005]. Так как в состав AV-1955 и AV-1959 включён один и тот же иммунодоминантный В-клеточный эпитоп Аβ₄₂ (Аβ₁₁) со свободной N-концевой аспарагиновой кислотой, было решено методом конкурентного ИФА исследовать специфичность антител сыворотки мышей, иммунизированных AV-1955 или AV-1959, к семи перекрывающимся 12-мерным пептидам (Аβ₂₋₁₀, Аβ₁₋₁₁, Аβ₁₋₁₂, Аβ₂₋₁₃, Аβ₃₋₁₄, Аβ₅₋₁₆, Аβ₇₋₁₈) или Аβ₄₂ (положительный контроль), (рис. 25В, С).

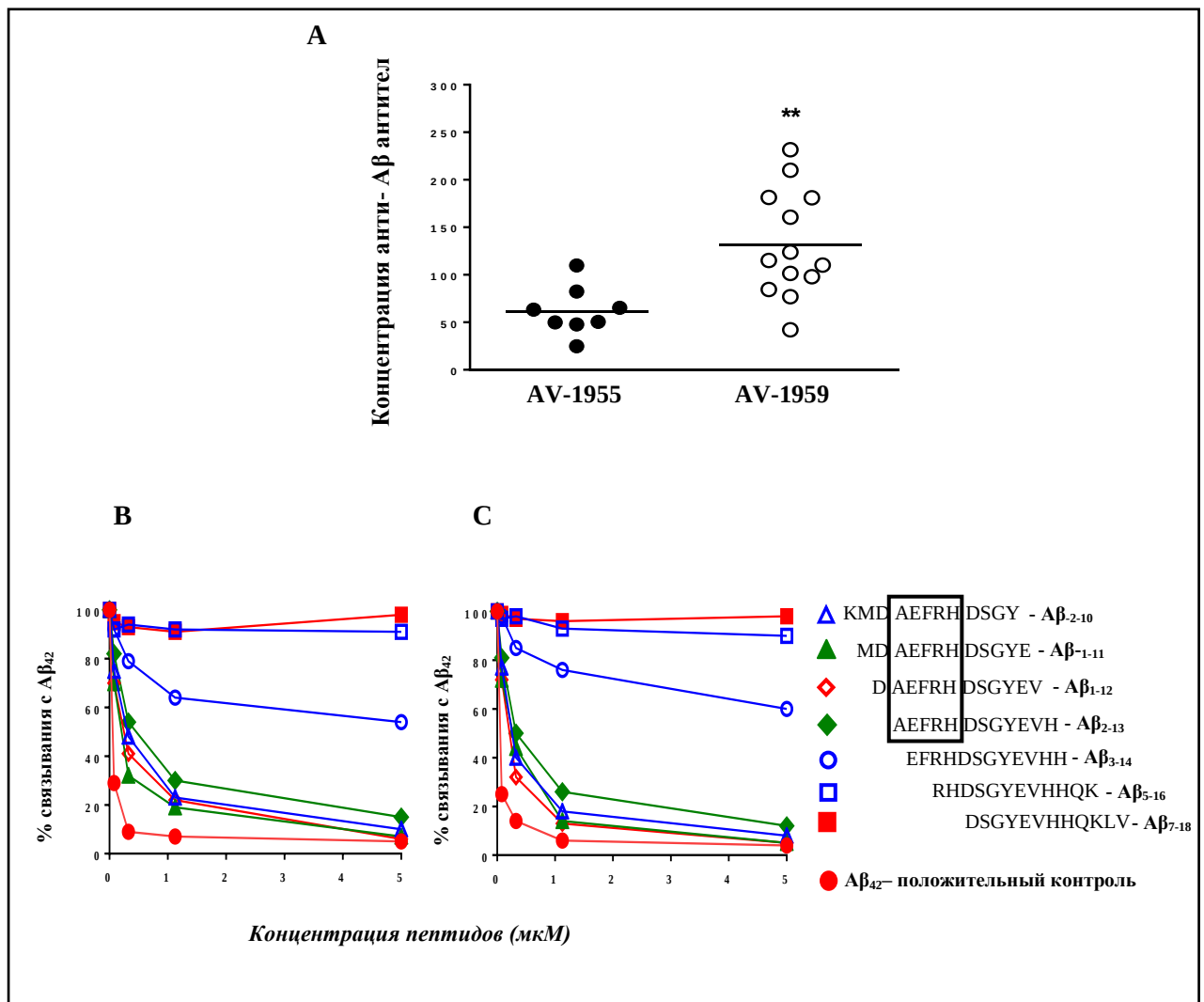


Рис. 25 Оценка гуморального иммунного ответа мышей Н-2^b гаплотипа получивших AV-1959 вакцину. (А) Сравнение В клеточного ответа мышей, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцинами. Горизонтальные линии показывают среднее значение концентраций (**P<0.01). (В, С) Исследование ингибирования сывороток мышей, иммунизированных AV-1955 (В) и AV-1959(С) ДНК-вакцинами с указанными концентрациями Aβ₂₋₁₀, Aβ₁₋₁₁, Aβ₁₋₁₂, Aβ₂₋₁₃, Aβ₃₋₁₄, Aβ₅₋₁₆, Aβ₇₋₁₈ и Aβ₄₂ пептидов методом конкурентного ИФА. Процент ингибирования короткими пептидами и контрольным Aβ₄₂ пептидом был рассчитан относительно связывания сывороток без конкурирующих пептидов к Aβ₄₂, взятых за 100%. Рамкой выделена ключевая аминокислотная последовательность В-клеточного эпитопа пептида Aβ₄₂.

Для этого, иммунные сыворотки мышей были разведены 1:500 и смешаны с короткими перекрывающимися пептидами (Aβ₂₋₁₀, Aβ₁₋₁₁, Aβ₁₋₁₂, Aβ₂₋₁₃, Aβ₃₋₁₄, Aβ₅₋₁₆, Aβ₇₋₁₈) или Aβ₄₂ пептидом в разных концентрациях: 0.078 мкМ, 0.312 мкМ, 1.25 мкМ, и 5 мкМ. После преинкубации с пептидами, стандартным методом ИФА было

определено связывание иммунных сывороток с $A\beta_{42}$, предварительно покрытых 96-луночных микропланшет. Связывание сывороток без конкурирующих пептидов с $A\beta_{42}$ было принято за 100% (положительный контроль), а блокирующее воздействие пептидов вычиталось относительно него, в процентах. Данные показали (рис. 25B), что сыворотка мышей, иммунизированных обеими вакцинами при концентрации 5мкМ демонстрирует высокую распознаваемость (до 80-95%) четырёх пептидов, охватывающих KMDAEFRHDSGY, MDAEFRHDSGYE, DAEFRHDSGYEV и AEFRHDSGYEVH аминокислоты. Тем не менее, удаление одной аминокислоты – аланина в AEFRHDSGYEVH пептиде, значительно ингибирует связывание иммунной сыворотки мышей, иммунизированных AV-1955 или AV-1959 относительно положительного контроля (** $P < 0.01$). Обе иммунные сыворотки не распознали RHDSGYEVNHQK и DSGYEVNHQKLV пептиды. Эти результаты свидетельствуют о том, что AEFRH ($A\beta_{2-6}$) является самой короткой последовательностью, которая распознается анти- $A\beta$ антителами, синтезированными у мышей в ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины и, кроме того, свободная аспаргиновая кислота не играет никакой роли в иммуногенности данных ДНК-вакцин у мышей.

Далее был проанализирован клеточный иммунный ответ в спленоцитах, выделенных из селезёнок мышей, вакцинированных AV-1955 и AV-1959 и рестимулированных *in vitro* пептидом $A\beta_{40}$ или коктейлем пептидов, входящих в состав MultiTEP платформы AV-1959. По результатам, обе вакцины не индуцировали аутореактивный иммунный ответ, показав фоновый уровень IFN- γ -продуцирующих клеток после рестимуляции иммунных спленоцитов $A\beta_{40}$ пептидом, анализированных методом ELISPOT. И, наоборот, спленоциты, выделенные из селезёнок мышей, получивших обе вакцины и рестимулированные коктейлем из 12 пептидов, представляющих чужеродные Th-эпитопы, способствовали активации клеточного иммунного ответа. Кроме того, клеточный иммунный ответ на AV-1959 был значительно выше, чем ответ на вакцинацию AV-1955 (* $P < 0.05$), (рис. 26A). Данные представляют собой средние результаты, полученные в 2-х отдельных экспериментах. Можно предположить, что именно добавление трёх новых эпитопов из TT (P7, P17 и P28) в MultiTEP платформу отвечает за повышение иммуногенности вакцины AV-1959. Чтобы подтвердить эту гипотезу, было решено проанализировать Th-клеточный

иммунный ответ, при рестимулировании иммунных спленоцитов отдельными пептидами, входящими в состав MultiTEP платформы AV-1959 вакцины.

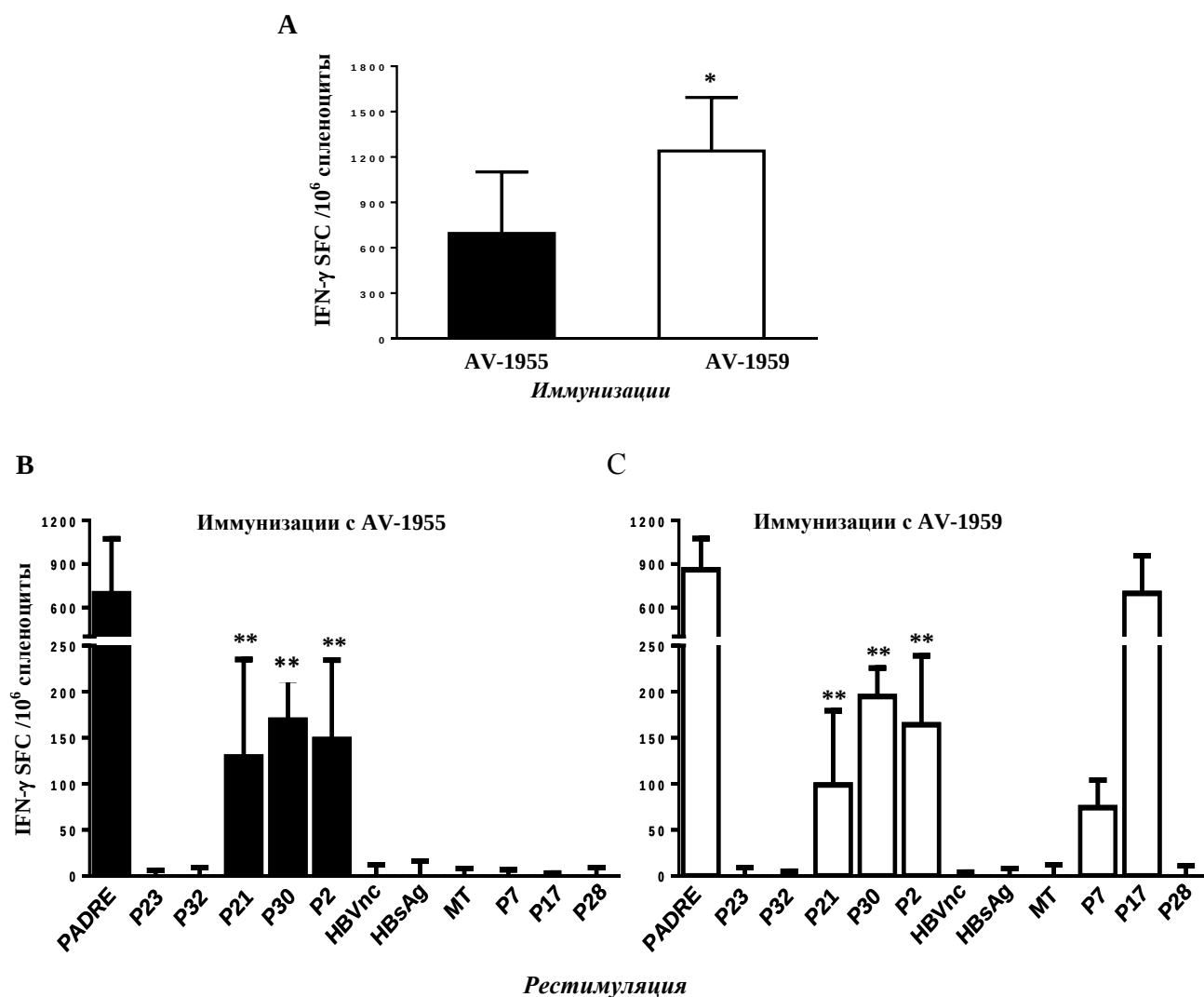


Рис. 26 Оценка клеточного иммунного ответа мышей H-2^b гаплотипа получивших AV-1959 вакцину. (А) Сравнение Т-клеточного иммунного ответа мышей, иммунизированных AV-1955 или AV-1959 ДНК-вакцинами. Столбики ошибок указывают среднее значение $\pm$ SD (* $P \leq 0.05$, $n = 6$ /на группу). (В, С) Картирование Th-эпитопов, выявленных антиген-специфичными Th-клетками, синтезированными в ответ на иммунизацию мышей AV-1955 (В) и AV-1959 (С) вакцинами. Столбики ошибок указывают среднее значение $\pm$ SD ($n = 6$ /группу). Количество IFN- γ -секретирующих клеток отображается как число пятноформирующих колоний SFC (** $P \leq 0.01$).

Картирование Th-клеточного ответа показало статистически значимую активацию обеими вакцинами Th-клеток специфичных PADRE, P21, P30, и P2 эпитопам (рис. 26В, С). Важно отметить, что, как и предполагалось, в спленоцитах селезёнок мышей,

иммунизированных AV-1959, были обнаружены Th-клетки специфичные к двум новым пептидам, P7 и P17, дополнительно включенным в состав MultiTER платформы (рис. 26B). Хотя, некоторые эпитопы MultiTER платформы у мышей оказались неиммуногенными, следует отметить, что они, как известно, обладают иммуногенностью для человека [James E et al., 2007]. Таким образом, сравнение иммуногенности вакцины AV-1955 с AV-1959 у инбредных мышей H-2^b иммунного гаплотипа показали, что включение дополнительных Th-эпитопов в MultiTER платформу ещё больше повысило её иммуногенность.

6.3 Иммунологическая эффективность AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 у макак-резусов

Как было предложено выше, для того, чтобы было возможно в дальнейшем тестировать AV-1955 и AV-1959 вакцины в клинических испытаниях, было решено впервые охарактеризовать репертуар В- и Т-клеточного иммунного ответа у вакцинированных макак-резусов, которые не только имеют A β ₄₂ последовательность, идентичную человеческой, но и, как известно, обладают высокой полиморфностью генов молекул МНС класса II, подобно человеческой [James E et al., 2007]. Кроме того, средняя идентичность генома человека и макак-резусов составляет 93%, что даёт возможность предположить, что и иммунный ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины у макак-резусов будет достаточно близко к иммунному ответу человека.

В данном преклиническом исследовании, с учётом того, что макаки-резусы, иммунизированные высокой дозой вакцины AV-1955 (4 мг/животное) показали преобладающую иммуногенность со статистически значимой разницей по сравнению с макаками-резусами, иммунизированными низкой дозой AV-1955 (0.4 мг/животное), (* $P \leq 0.05$), (рис. 26A), было решено после 18-и недельного периода покоя от предварительной иммунизации низкой дозой AV-1955 (0.4 мг/животное) в дальнейшем иммунизировать высокой дозой AV-1959 (4мг/животное). Макаки, которые получали высокую дозу AV-1955 были по-прежнему иммунизированы высокой дозой AV-1955 (рис. 27).

Анализ гуморального иммунного ответа методом ИФА у индивидуальных макак- резусов, вакцинированных AV-1955 (n = 5) или AV-1959 (n = 5), на 50-й неделе иммунизации показал, что обе вакцины одинаково эффективны в стимулировании синтеза анти-A β антител со средним значением конечных точек титрования $9680 \pm$

5736 и 6050 ± 4731 соответственно (рис. 28 В). Кроме того, показан резкий подъем титров антител до значения со средней конечной точкой титрования 9680 ± 5736 с последующим медленным динамическим спадом, при котором титры антител у 7 из 10 макак, были обнаружены даже через почти 1.2 года после последней иммунизации (неделя 106) (рис. 28А). Следует отметить, что IgG и IgM изотипирование анти-А β антител на 50-й неделе показало, что обе вакцины, AV-1955 и AV-1959, приводят к синтезу анти-А β антител преимущественно IgG изотипа ($^{***}P = 0.001$), что свидетельствует о том, что гуморальный иммунный ответ был опосредован Т-клетками (рис. 28 С, D).

Чтобы определить специфику антител, индуцированных у макак-резусов, было проведено картирование В-клеточных эпитопов сывороток крови макак, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами. Так как в состав AV-1955 и AV-1959 включён один и тот же иммунодоминантный В-клеточный эпитоп А β_{42} (А β_{11}) со свободной N-концевой аспарагиновой кислотой, было решено методом конкурентного ИФА исследовать специфичность антител сывороток макак-резусов, иммунизированных AV-1955 или AV-1959, к семи перекрывающимся 12-мерным пептидам (А β_{2-10} , А β_{1-11} , А β_{1-12} , А β_{2-13} , А β_{3-14} , А β_{5-16} , А β_{7-18}) или А β_{42} (положительный контроль), (рис. 28Е, F). Для этого, иммунные сыворотки макак были разведены 1:250 и смешаны с короткими перекрывающимися пептидами (А β_{2-10} , А β_{1-11} , А β_{1-12} , А β_{2-13} , А β_{3-14} , А β_{5-16} , А β_{7-18}) или А β_{42} пептидом в разных концентрациях: 0.078 мкМ, 0.312 мкМ, 1.25 мкМ, и 5 мкМ. После преинкубации с пептидами, стандартным методом ИФА было определено связывание иммунных сывороток с А β_{42} , предварительно покрытых 96-луночных микропланшет. Процент связывания сывороток, блокированных короткими пептидами с А β_{42} был рассчитан относительно связывания сывороток без конкурирующих пептидов к А β_{42} , взятый за 100% (положительный контроль).

Данные показали, что процент связывания анти-А β антител сывороток макак-резусов, полученных после иммунизации обеими вакцинами (AV-1955 и AV-1959) с пептидными последовательностями DAEFRHDSGYEV и AEFRHDSGYEVH при концентрации 5 мкМ составлял 92% и 88% соответственно (рис. 28Е, F). Те же самые иммунные сыворотки связывают KMDAEFRHDSGY и MDAEFRHDSGYE пептиды, содержащие AEFRH последовательность, с более низкой аффинностью (75-78%), в то

время как удаление аланина из AEFRHDSGYEVH значительно повышает связывание анти-A β антител относительно положительного контроля ($P \leq 0.01$), (рис. 28E, F). Как и у мышей, картографические данные иммунной сыворотки макак-резусов, вакцинированных AV-1955 и AV-1959 показали, что анти-A β антитела не распознают RHDSGYEVH₁₉ и DSGYEVH₁₉ пептиды. Эти результаты говорят о том, что AEFRH последовательность является самым маленьким иммуногенным B-клеточным эпитопом, индуцирующим анти-A β антителы у макак-резусов на AV-1955 и AV-1959 вакцины. Что касается того утверждения, что наличие свободного N-концевого остатка аспарагиновой кислоты может быть важным для активации В-клеток человека, то результаты картирования в данном эксперименте показали, что это условие не является столь необходимым для связывания антител макак-резусов к A β ₄₂.

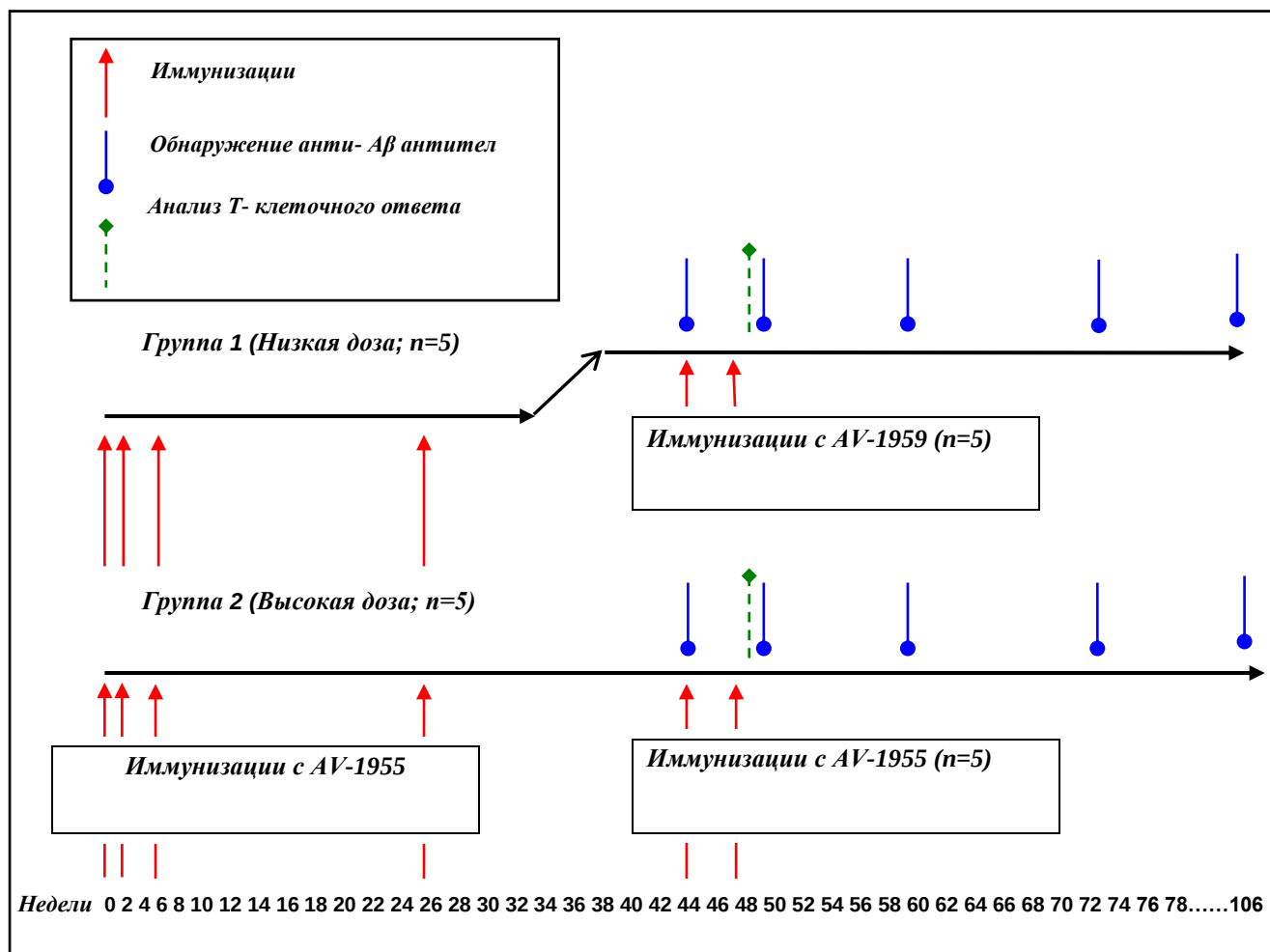


Рис. 27 Обзор эксперимента. Схематическое представление экспериментального протокола иммунизации макак-резусов высокими дозами вакцин AV-1955 и AV-1959

после 18-и недельного периода покоя от предварительной иммунизации низкой дозой AV-1955; n, количество макак на группу.

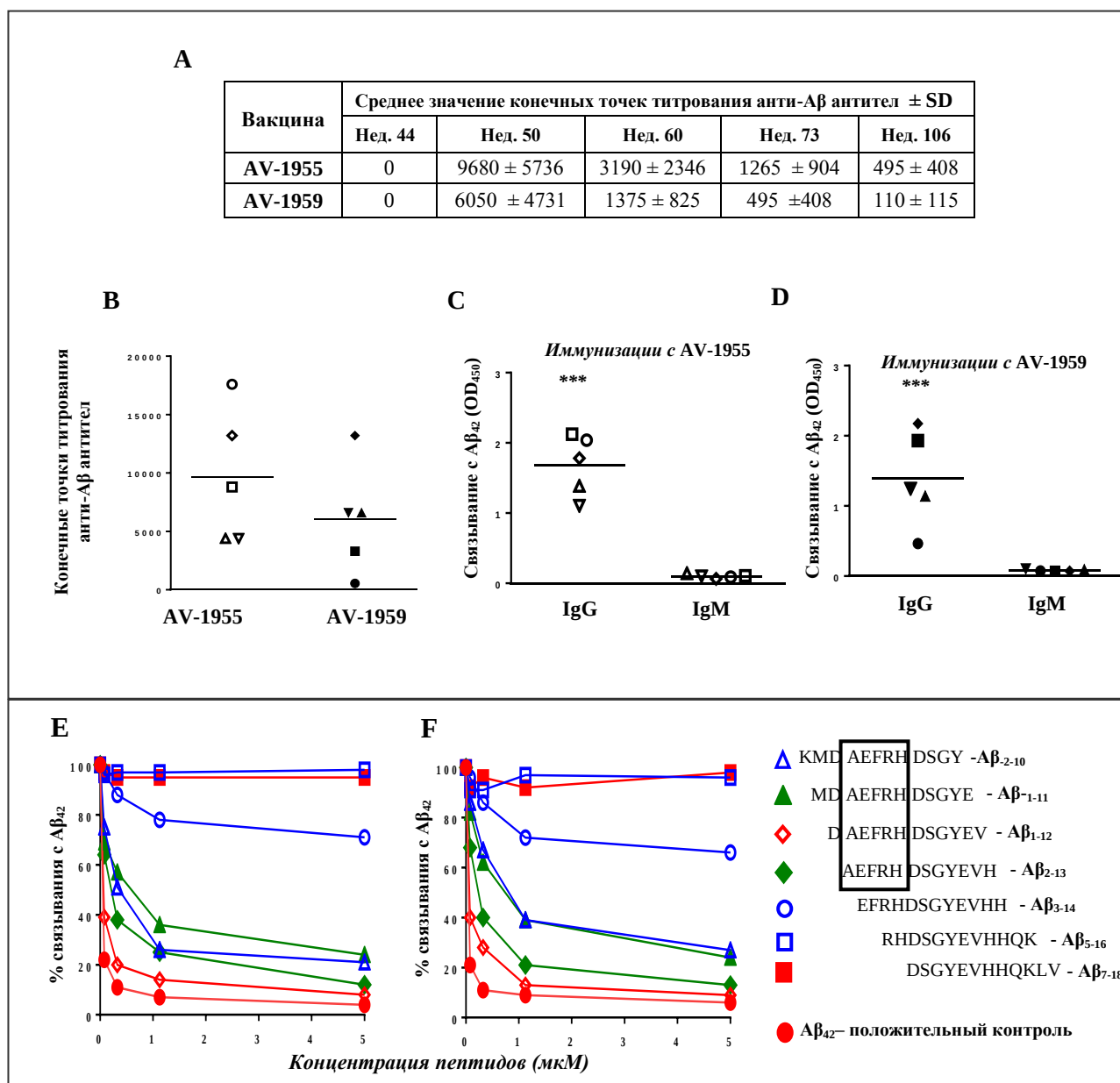


Рис. 28 Сравнение гуморального иммунного ответа в сыворотках макак-резусов, иммунизированных AV-1955 или AV-1959 ДНК-вакцинами. (A) Среднее значение конечных титров анти-A β антител в сыворотках макак-резусов в различных временных точках. (B) Значение конечных титров анти-A β антител в сыворотках макак-резусов, выделенных на 50-й неделе. Горизонтальные линии демонстрируют среднее значение. (C, D) Анализ IgG и IgM изотипов антител в сыворотке индивидуальных макак-резусов (50-й недели), вакцинированных AV-1955 (C) и AV-1959 (D) вакцинами. (E, F) Исследование ингибирования сыворотки макак-резусов, иммунизированных AV-1955 (E) и AV-1959 (F) вакцинами с указанными концентрациями A β ₂₋₁₀, A β ₁₋₁₁, A β ₁₋₁₂, A β ₂₋₁₃, A β ₃₋₁₄, A β ₅₋₁₆, A β ₇₋₁₈ и A β ₄₂ пептидов

методом конкурентного ИФА. Процент ингибирования короткими пептидами и контрольным $A\beta_{42}$ пептидом был рассчитан относительно связывания сывороток без конкурирующих пептидов к $A\beta_{42}$, взятых за 100%. Рамкой выделена ключевая аминокислотная последовательность В-клеточного эпитопа пептида $A\beta_{42}$.

Далее, впервые был проанализирован гуморальный иммунный ответ специфичный к чужеродным эпитопам, входящим в состав MultiTER платформы у макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами. С этой целью, методом дот-блот было оценено связывание иммунных сывороток вакцинированных макак к двенадцати пептидам MultiTER платформы AV-1959 вакцины и $A\beta_{42}$ пептида, адсорбированных к нитроцеллюлозе. Данные дот-блот анализа показали, что иммунизации обеими вакцинами, AV-1955 и AV-1959, индуцируют антитела специфичные только к $A\beta$ последовательности из всех последовательностей, включенных в обе вакцины (рис. 29). Иными словами, обе вакцины у макак-резусов не стимулируют В-клетки, продуцирующие антитела специфичные к чужеродным Th-эпитопам, использованным для дизайна MultiTER платформы.

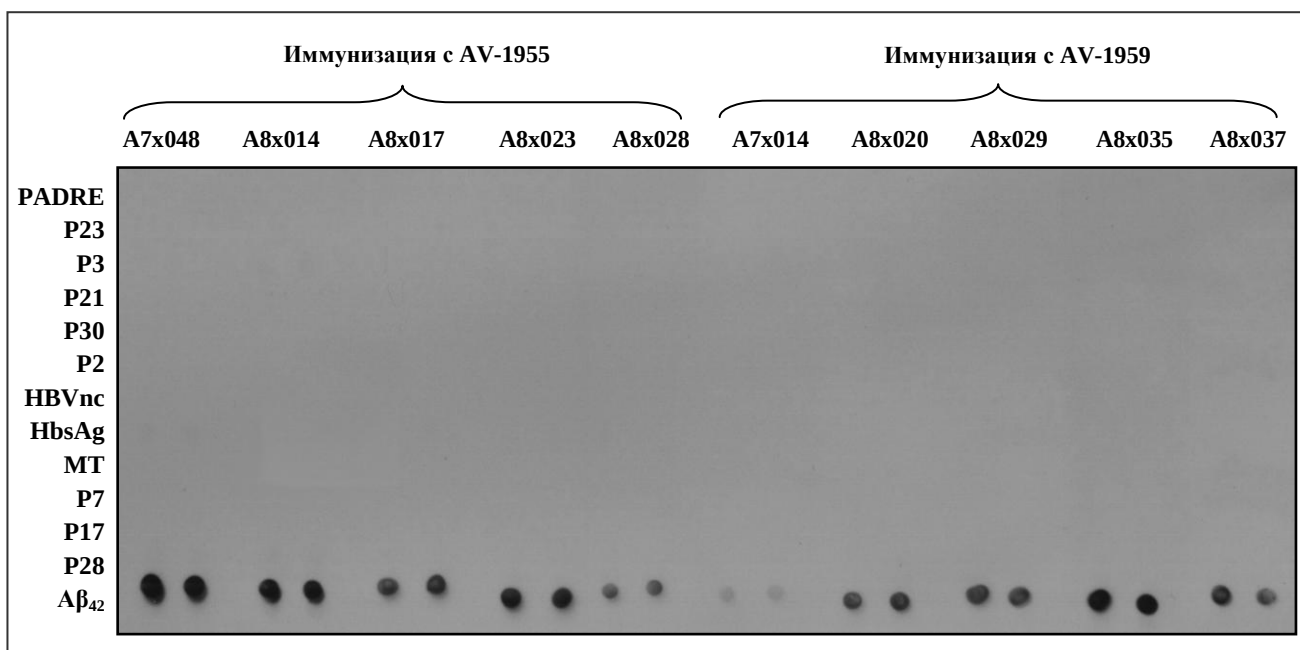


Рис. 29 Анализ репертуара антител у макак-резусов, иммунизированных вакцинами AV-1955 и AV-1959 дот-блот методом.

Чтобы подтвердить, что те же пептиды, которые не активируют В-клетки, продуцирующие антитела специфичные к чужеродным Th-эпитопам, могут стимулировать Th-клетки в иммунных PBMCs макак методом IFN- γ ELISPOT был

анализирован клеточный иммунный ответ. С этой целью иммунные PBMCs макак были рестимулированы коктейлем, состоящим из 12 пептидов MultiTER платформы AV-1959 вакцины. Данные эксперимента показали, что обе вакцины идентично активируют клеточный иммунный ответ ($P > 0.05$), (рис. 30А). Следует отметить, что не было обнаружено активации Th-клеток после рестимуляции PBMCs индивидуальных макак пептидом A β_{40} , что говорит о безопасности вакцин, так как они не активирует потенциально опасные аутореактивные Т-клетки иммунного ответа. Антиген-специфичный иммунный ответ был обнаружен также после рестимуляции иммунных PBMCs обеими рекомбинантными вакцинами и соответствующими им MultiTER рекомбинантными протеинами. Оба, AV-1959 и его MultiTER протеин в *in vitro* условиях активируют одинаковое количество IFN- γ -продуцирующих клеток ($SFC = 368 \pm 161$ и $SFC=372\pm182$ на 10^6 PBMC соответственно), и эти цифры сравнимы с цифрами, полученными в случае с AV-1955 его MultiTER протеина ($SFC = 446 \pm 175$ и $SFC=507\pm194$ на 10^6 PBMC соответственно), ($P > 0.05$).

В совокупности, данные рисунка 27 и эти результаты подтверждают, что обе ДНК-вакцины активируют Т-клетки, специфичные к чужеродным Th-эпитолам, входящим в состав MultiTER, но не к A β_{1-11} пептиду. Для дальнейшего анализа антиген-специфичного клеточного иммунного ответа было проведено картирование Th-клеточного ответа после рестимуляции иммунных PBMCs каждым из эпитопов, входящих в состав MultiTER платформы. Данные показали, что AV-1955 и AV-1959 вакцины индуцировали Th-клеточный ответ у всех 10-и макак, хотя, как и ожидалось, иммуногенность Th-эпитопов в пределах MultiTER платформы варьировала между индивидуальными животными. Количественный анализ показал, что эпитопы, которые значительно иммуногенны у одной обезьяны могут иметь незначительную иммуногенность у других (рис. 30В). Например, статистически значимые Th-клеточные иммунные ответы (свыше 100 IFN- γ положительных SFC на 10^6 PBMC, (** $P < 0.01$)) были обнаружены у двух животных после рестимуляции PBMCs P32 пептидом, в то время как этот же ответ был ниже (50-100 IFN- γ положительных SFC на 10^6 PBMC, (* $P < 0.05$)) у 1-ой макаки, незначительным (менее 50 IFN- γ положительных SFC на 10^6 PBMC, (* $P < 0.05$)) у 3-х макак и отсутствовал у 4-х животных (Рис. 30В).

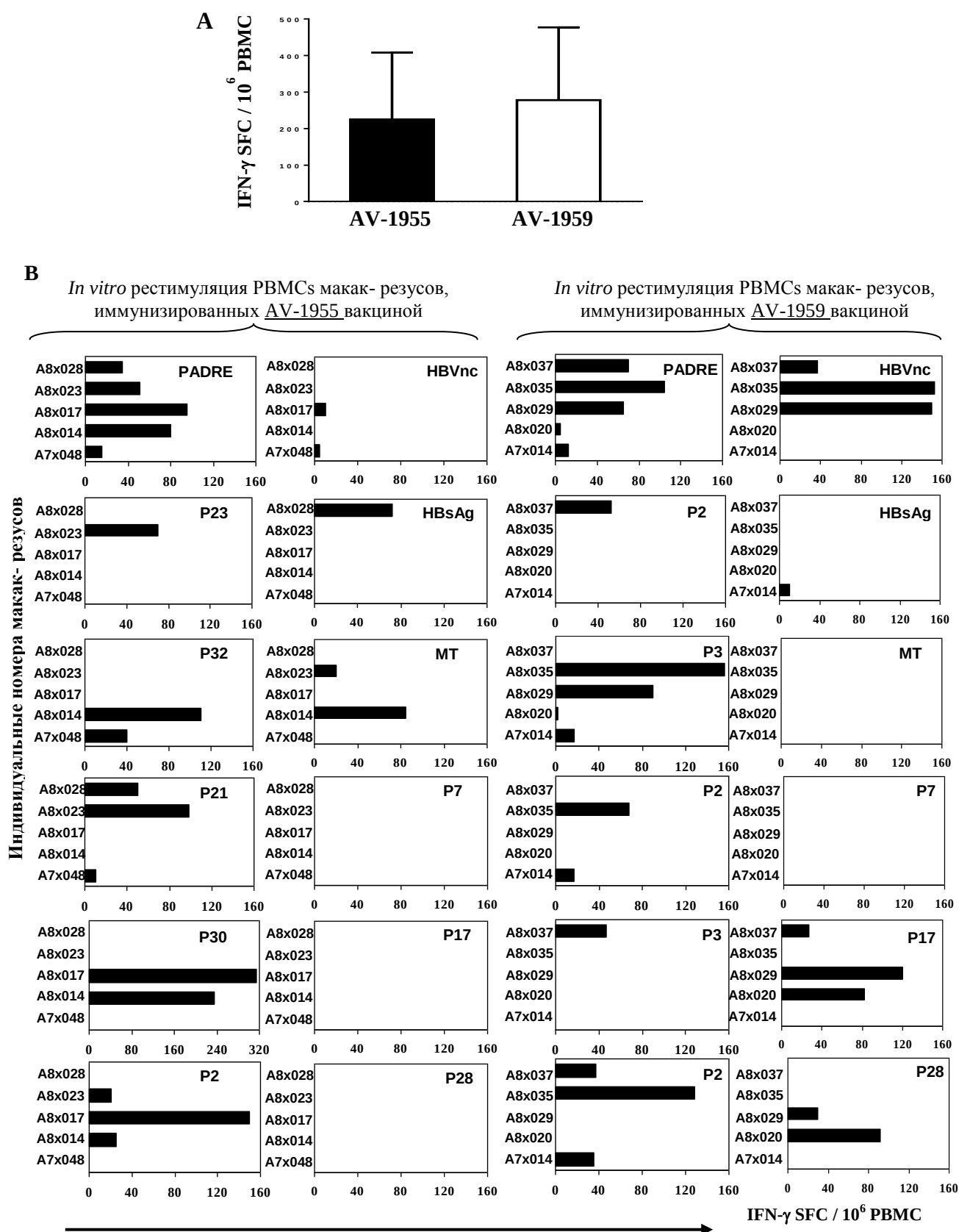


Рис. 30 Сравнение клеточного иммунного ответа в PBMCs макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцинами. (А) PBMCs были рестимулированы коктейлем из 12-и пептидов (2 мкг/мл каждого), входящих в состав

AV-1959 конструкции. Столбики ошибок показывают среднее значение $\pm$ SD ($n = 5$ / на группу). (В) Т-клеточные ответы PBMCs макак-резусов, иммунизированных AV-1955 или AV-1959 вакцинами на индивидуальные Ther.

В таблице 2 представлены результаты степени распространенности Th-эпитопов у макак-резусов, использованных в данном эксперименте. Полученные данные показали, что каждая макака, имея определённый набор MHC класса II молекулу, по-разному ответила на различные Th-эпитопы MultiTER платформы. Как продемонстрировано в таблице 2, эпитоп PADRE иммуногенен у 100% макак: PBMCs всех животных ответили на рестимуляцию синтетическим чужеродным Th-эпитопом – PADRE, который, как известно, распознаётся 14-ю из 15-и человеческих молекул DR [Alexander J et al., 1994]. Следующими наиболее распространенными эпитопами были: P2, P32, P17, P21 из TT и HBV_{nc} из HBV, иммуногенность которых составляла 50-60% от всех вакцинированных животных. Остальные Th-эпитопы были способны активировать Th-клетки 20-30% животных, в то время как один Th-эпитоп – P7, не был распознан ни одним из 5-и макак, иммунизированных AV-1959 вакциной.

Таким образом, оценка иммуногенности и характеристика В- и Т-клеточного иммунного ответа на ДНК-вакцины AV-1955 и AV-1959, состоящие из 9-и и 12-и чужеродных Th-клеточных эпитопов соответственно и собственного В-клеточного эпитопа A β ₄₂ пептида (A β ₁₁) со свободной N-концевой аминокислотой у мышей и макак-резусов показали что:

1. AEFRH (A β ₂₋₆) является самой короткой последовательностью A β ₄₂ пептида, В-клеточным эпитопом, распознаваемым анти-A β антителами, синтезированными у мышей и макак-резусов в ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины.
2. Наличие свободной N-концевой аспарагиновой кислоты В-клеточного эпитопа A β ₁₋₁₁ в AV-1955 и AV-1959 вакцинах показало незначительное повышение аффинности анти-A β антител иммунных сывороток макак-резусов.
3. Удаление аланина из AEFRHDSGYEVH (A β ₂₋₁₃) пептида значительно снижает аффинитет анти-A β антител.
4. AV-1955 и AV-1959 вакцины у макак-резусов индуцируют антитела специфичные только к A β ₁₋₁₁ и не стимулируют В-клетки, продуцирующие антитела специфичные к чужеродным Th-эпитопам, использованным в дизайне MultiTER платформы.

5. Клеточный иммунный ответ специфичен к чужеродным Th-эпитолам и не распознаёт собственные Т-клеточные эпитолам $A\beta_{42}$, приводящие к активации аутореактивных Т-клеток даже после шести иммунизаций AV-1955 и AV- 1959 вакцинами в течение 18 месяцев, что говорит об их безопасности.
6. Th-эпитолам MultiTер платформы AV-1955 и AV-1959 вакцин показали различную иммуногенность у индивидуальных макак-резусов, связанную с полиморфностью генов молекулы MHC класса II.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были проведены многочисленные исследования относительно различных типов вакцин против БА, основанные на рекомбинантном протеине/пептиде, вирусных векторах, состоящих из различных N-концевых регионов $A\beta_{42}$ (от $A\beta_{1-6}$ до $A\beta_{1-15}$) и белков-транспортёров или чужеродных Th-клеточных эпитопов [Petrushina I et al., 2007; Lobello K et al., 2012]. В совокупности, данные показали, что эти вакцины ингибируют накопление патологических $A\beta$ у моделей мышей с БА и предотвращают развитие поведенческих нарушений без побочных признаков в мозге взрослых трансгенных мышей (например микрогеморрагии, накопление Т-клеток, В-клеток, макрофагов и т.д.). Так же эти данные говорят, что подобные вакцины эффективны только тогда, когда вакцинация начинается на очень ранних стадиях БА. Тем не менее, в настоящее время есть несколько эпитопных вакцин (ACC-001, V-950, CAD-106, UB-311, AFFITOPE AD01-03), проходящие I или II фазы клинических испытаний на пациентах с легкой и умеренной стадией БА. Однако, до сих пор опубликованы лишь иммунологические данные исследования только CAD-106 вакцины.

В данной диссертационной работе представлена идея создания эпитопных ДНК-вакцин, направленных против БА, состоящих из нескольких копий собственных В-клеточных эпитопов, дополненных различными чужеродными Th-клеточными эпитопами традиционных вакцин или различных патогенов, с которыми человек сталкивается в течение жизни, например, эпитопы вируса гриппа. Использование таких чужеродных Th-эпитопов для иммунизации пациентов, находящихся на ранних стадиях БА или пациентов среднего/пожилого возраста, обладающих предсуществующей Т-клеточной памятью к данным Th-эпитопам, было бы безопасно и эффективно. Следуя этой идее были созданы AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцины против БА на основе эпитопов, которые были тестированы на мышах, кроликах и макаках-резусах.

Так как известно, что ДНК-вакцины обладают относительно низкой иммуногенностью, в данных исследованиях ДНК-вакцина была усовершенствована включением в её состав трёх копий собственных В-клеточных эпитопов $A\beta_{42}$ ($A\beta_{1-11}$) и девяти/двенадцати дополнительных Th-эпитопов. А также, с целью повышения эффективности трансфекции ДНК в клетки, для иммунизации была использована

TriGrid система электропорации (ЭП) [Bureau M et al., 2000]. ЭП может увеличить экспрессию генов *in vivo* от 100 до 1000 раз по сравнению с инъекцией плазмиды ДНК посредством иглы [Widera G et al., 2000; Rizzuto G et al., 1999]. Результаты AV-1955 и AV-1959 вакцинаций, продемонстрировали высокую иммуногенность, относительную безопасность, так как они не способствовали активации потенциально опасных аутореактивных Т-клеток, вместе с тем, генерируя терапевтически эффективные Аβ-специфичные антитела IgG класса, как у мышей C57BL/6 H-2b гаплотипа, так и у кроликов и макак-резусов.

В данных экспериментальных исследованиях была рассмотрена иммуногенность AV-1955 вакцины в сравнении с ранее изученной вакциной р3Aβ11-PADRE в кроликах. Данные исследования показали, что AV-1955 способствует синтезу значительно сильному гуморальному иммунному ответу в кроликах по сравнению с вакциной р3Aβ11-PADRE. Анти-Аβ₁₋₁₁ антитела распознали все формы человеческого Аβ пептида (аффинность связывания с олигомерами ($K_D = 7,04 \times 10^{-8}$ М) была выше, чем к мономерам ($K_D = 2,22 \times 10^{-7}$) или фибриллам ($K_D = 2,03 \times 10^{-7}$)); были способны связать амилоидные бляшки на срезах человеческого мозга с патологией БА *ex vivo*; снизили олигомер- и фибрилл - опосредованную нейротоксичность в культуре клеток нейробластомы человека (выживаемость клеток была 83.7% и 93% соответственно) [Ghochikyan A et al., 2013].

Кроме того, для того, чтобы было возможно в дальнейшем тестировать AV-1955 и AV-1959 вакцины в клинических испытаниях, было решено впервые охарактеризовать репертуар В- и Т-клеточного иммунного ответа у вакцинированных макак-резусов, которые, не только имеют Аβ₄₂ последовательность, идентичную человеческой, но и, как известно, макаки-резусы обладают высокой полиморфностью генов молекул МНС класса II, подобно человеческой [de Groot N et al., 2004]. Кроме того, средняя идентичность генома человека и макак-резусов составляет 93%, что даёт возможность предположить, что и иммунный ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины у макак-резусов будет достаточно близок к иммунному ответу индивидов, вакцинированных теми же вакцинами, что говорит о критически важной роли этих животных в исследованиях вакцин против БА [Zahn L et al., 2007]. Так же, с целью повышения способности ДНК-вакцины вовлекать более широкий спектр молекул МНС класса II в формирование иммунного ответа, была синтезирована новая

конструкция AV-1959 добавлением к MultiTER платформе вакцины AV-1955 трёх новых чужеродных Th-эпитопов из ТТ (рис. 23). До начала испытания ДНК-вакцин на макаках-резусах, было проведено картирование В- и Т-клеточных эпитопов на мышцах H-2^b иммунного гаплотипа, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцинами. Данные эксперимента показали, что у инбредных мышей AV-1959 вакциной генерируется значительно более мощный гуморальный и клеточный иммунный ответ, чем AV-1955 вакциной (рис. 25A, 26A). В то же время, В-клеточное картирование, показало, что обе вакцины индуцируют продукцию анти-A β антител, способных лучше всех распознавать AEFRN последовательность A β пептида; удаление же остатка аланина значительно снижает аффинность связывания этих антител (рис. 25B, C). Важно отметить, что анализ репертуара Т-клеток показал, что значительно более сильный клеточный иммунный ответ у мышей, иммунизированных AV-1959 вакциной (рис. 26A), вероятно, связан с добавлением к её MultiTER платформе двух из трёх новых Th-эпитопов – P7 и P17 (рис. 26B, C). Таким образом, данные, полученные в эксперименте на инбредных мышцах показали, что AV-1959 вакцина может быть лучшим кандидатом для клинических испытаний.

Далее, как уже упоминалось выше, была проведена сравнительная характеристика AV-1959 вакцины с её прототипом – AV-1955 в не-инбредных животных – макаках-резусах с полиморфными генами МНС класса II. Известно, что макаки-резусы не только имеют идентичную A β последовательность с человеческой, но и их иммунная система так же очень близка к человеческой. В отличие от исследований, проведенных на мышцах, было обнаружено, что иммунизации с любой из вакцин индуцирует аналогичные уровни гуморального и клеточного иммунного ответа (рис. 28A, B и 30A). Тем не менее, следует отметить, что макаки 1-й и 2-й группы получили разные дозы вакцин в течение всего исследования: каждое животное 1-й группы получило 1,6 мг AV-1955 и 8 мг AV-1959, в то время как каждая макака 2-й группы получила 24 мг AV-1955. Кроме того, одна макака из 1-й группы, которая скудно ответила на вакцинацию 8 мг AV-1959 (рис. 28B) практически не ответила и на иммунизацию 1,6 мг AV-1955 ещё до переключения на вакцинацию AV-1959 вакциной, это говорит о том, что данная обезьяна могла иметь иммунодефицит. Картирование В-клеточных эпитопов показало, что сыворотки иммунизированных макак связывают DAEFRN последовательность A β с

относительно высокой аффинностью, чем АЕFRH (рис. 28Е, F). Возможно, что свободная аспарагиновая кислота является лучшим иммуногеном для генерации мощного анти-Аβ антительного ответа у людей, как это уже было предложено в AN-1792 исследовании [Lemere C et al., 2001] и требует дальнейшего изучения в будущих испытаниях на людях. Примечательно, что AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцины содержат по крайней мере один В-клеточный эпитоп (Аβ₁₋₁₁) со свободной аспарагиновой кислотой. Следует подчеркнуть, что иммунные сыворотки, выделенные из всех десяти вакцинированных макаков, не распознают пептиды, включённые в состав MultiТЕР платформы (рис. 29). Это чрезвычайно важно, потому что антитела, специфичные к MultiТЕР платформе могли бы ускорить выведение AV-1955 или AV-1959 из организма и тем самым снизить иммуногенность данных вакцин после ревакцинации людей. Фактически, данные о продолжительности динамики иммунной реакции в ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины показали их способность долговременно производить эффективные Аβ-специфичные антитела (рис. 28А); даже на 106 неделе (58 недель после последней иммунизации) у 4 из 5 животных, иммунизированных AV-1955 вакциной (с титрами 1:275; 1:550; 1:550 и 1:1100) и у 3 из 5 животных иммунизированных AV-1959 вакциной (с титрами 1:137,5; 1:137,5 и 1:250) были обнаружены измеряемые титры антител. В то время как, САD-106 вакцина способствовала синтезу как анти-Аβ антител, так и антител, специфичных к бактериофагу-носителю (Qβ) во всех вакцинированных обезьянах [Imbert G et al., 2009] и в 34 из 46 пациентах [Winblad B et al., 2012], чем и можно объяснить резкое падение титров антител к Аβ пептиду в вакцинированных индивидах. Несмотря на то, что никаких опубликованных данных относительно АСС-001 не имеется, однако, вероятность индукции сильного гуморального ответа специфичного к протеину-носителю (CRM197) при многократных инъекциях достаточно высока [Del Giudice G 1992]. Результаты исследования AV-1955 и AV-1959 вакцин, безусловно, повлияют на выбор графика иммунизаций (количество и частоту иммунизаций) для проведения клинических испытаний на людях, однако, не ясно, будет ли частая иммунизация способствовать повышению титров антител. Предполагается, что как и у макаков-резусов, предварительная вакцинация, чередующаяся последующим периодом покоя перед дальнейшей ревакцинацией, будет эффективна для генерации продукции долговременных Аβ-специфических антител и в пациентах.

Пожалуй, одним из наиболее ценных данных в этой работе являются результаты картирования Th-клеточных ответов у макак-резусов. У вакцинированных макаках, AV-1955 и AV-1959 вакцины активируют широкий спектр Th-клеток специфичных к PADRE и к 10 из 11 других пептидов различных патогенов, включенных в конструкцию MultiTER платформы (рис. 30B и таблица 2). Кроме того, чтобы идентифицировать обширность Th-клеточного спектра и к вакцинации, были выявлены различия в распространенности Th-эпитопов AV-1955 и AV-1959 вакцин. В частности, эпитоп PADRE был активен у всех вакцинированных макаках-резусах, в то время как P32, P21, P2, HBV_{нс} и P17 были активны у 50-60% макак. Пептид P7 не вызвал T-клеточный ответ ни у одной макаки, хотя известно, что он иммуногенен для человека, а остальные Th-эпитопы MultiTER платформы были активны только в 20-30% иммунизированных макаках-резусах. В совокупности, картирование Th-клеточных эпитопов вакцинированных макак наглядно продемонстрировало широкий индивидуальный репертуар анти-MultiTER специфичных Th-клеток и даёт возможность предположить, что AV-1959 вакцина будет превосходить AV-1955 вакцину, так как сможет стимулировать иммунный ответ у более широкой популяции вакцинированных пациентов с высокой полиморфностью генов MHCII. Важно отметить, что AV-1959 вакцина может одновременно активировать и наивные Th-клетки, и Th-клетки памяти, что может сыграть важную роль при преодолении возрастных изменений T-клеточного иммунитета, которая у человека, как известно, приводит к уменьшению пропорции наивных клеток и увеличению пропорции клеток памяти [Derhovanessian E et al., 2008]. В одной из последних публикаций сообщалось, что Th-клетки памяти к P30 эпитопу TT могут резко повысить иммунный ответ после однократной иммунизации рекомбинантной эпитопной вакциной, содержащей данный эпитоп [Davtyan H et al., 2013]. В свою очередь, активация наивных и уже существующих Th-клеток памяти может содействовать индукции высоких титров терапевтически мощных анти-A β антител, как было показано у макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 (рис. 28B).

Тем не менее, понятно, что даже самая иммуногенная вакцина против БА, направленная на подавление патологических форм A β , не может быть терапевтической, если вакцинация будет начата на поздних стадиях БА. Последние данные показывают, что даже у пациентов с ранней стадией БА уже имеются

нейропатологические изменения, которые заключаются в наличии диффузных и нейритных бляшек, а также гибели нейронов [Tarawneh R et al., 2009]. Модель основных биомаркеров БА [Jack C et al., 2011] указывает на то, что А β патология возникает за долго до накопления tau -патологии и даже еще раньше, чем появление первых признаков когнитивных нарушений. Данные, опубликованные после клинического испытания первой активной вакцины AN-1792 [Gilman S et al., 2005] и недавние результаты пассивной иммунизации в испытаниях Pfizer/Janssen AIP [Eli La et al., 2012] и Eli-Lilly [Johnson, J et al., 2012] показали, что анти-А β иммунотерапия может быть эффективна только при очень ранней патологии БА (на продромальной стадии БА) или даже у индивидов, находящихся в группе риска. В частности, стало известно, что введением бацинеозумаба удалось улучшить когнитивные характеристики у лиц, входящих в группу риска с наличием ApoE- ϵ 4 маркера и лиц, имеющих легкую форму БА по сравнению с группой плацебо. Тем не менее, в некоторых случаях, введение бацинеозумаба значительно снизило амилоидную нагрузку и CSF p-tau у больных с легкой формой БА. Соланезумаб же в двух независимых исследованиях не был эффективен; однако, анализ совместных данных обоих исследований показал статистически значимое замедление когнитивных нарушений у вакцинированных пациентов с легкой, но не умеренной формой БА.

Поэтому, для того, чтобы вакцинация AV-1959 была максимально эффективной, целесообразно начать её у пациентов, не имеющих симптомов заболевания как можно раньше, чтоб не только эффективно снизить А β патологию в мозге, но и предотвратить tau патологию и сохранить когнитивные функции. Современные достижения в развитии диагностических и прогностических методов позволяют успешно реализовать данную схему ДНК вакцинации путём измерения биомаркеров, таких как отношений tau/A β и ptau/A β в СМЖ, фосфолипидных биомаркеров [Mapstone, M. et al., 2014], и/или обнаружения накопления А β в мозге, используя PIB-PET сканирование [Klunk W et al., 2004] с последующей ежегодной ревакцинацией.

Интересно, что раннее полученные *in vitro* данные однозначно указывают на необходимость проведения профилактической вакцинации, которая способна предотвратить БА или же отсрочить её наступление, так как терапевтическая вакцинация не способна разрушить токсичные олигомеры; она всего лишь в

минимальной степени облегчает уже существующую патологию [Mamikonyan G et al., 2007]. Недавно, National Alzheimer's Project также предложил приступить к анти-А β клиническим испытаниям лиц с продромальной формой БА и/или лиц с пре-симптоматической к семейной болезни Альцгеймера (FAD – familial Alzheimer's disease), у которых прогрессия болезни легко определяема и предсказуема, и, которые в конечном счёте будут подвержены БА. Считается, что стратегия пассивной вакцинации не практична для профилактического лечения в связи с расходами в течении длительного периода лечения. Кроме того, будущие исследования должны показать является ли иммуногенная активная вакцина против БА, направленная на определенные патологические протеины (А β , tau, α -syn, ApoE4 или комбинации этих молекул) безопасной (не будет активировать потенциально опасный клеточный иммунный ответ) и эффективной (будут индуцировать синтез терапевтически мощных антител).

Следует отметить, что до сих пор управление контроля качества продуктов и лекарственных средств США (FDA – Food and Drug Administration) одобрило только одну терапевтическую вакцину (sipuleucel), которая способна повысить среднюю выживаемость больных раком предстательной железы до 4.5 месяцев.

ВЫВОДЫ

1. ДНК-вакцины, синтезированные на основе MultiTER платформы, состоящие из трёх копий собственных В-клеточных эпитопов пептида $A\beta_{42}$ ($A\beta_{1-11}$) и девяти/двенадцати чужеродных Th-эпитопов (AV-1955/AV-1959) у кроликов и макаках-резусов индуцируют продукцию анти- $A\beta$ специфичных антител, распознающих агрегированные формы $A\beta_{42}$ пептида, способных ингибировать $A\beta_{42}$ -опосредованную нейротоксичность и специфически связывающихся с амилоидными бляшками.
2. AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцины у мышей, кроликов и резус-макак стимулируют антиген-специфический клеточный и гуморальный иммунный ответ, но не индуцируют активацию аутореактивных Т-клеток и В-клеток, специфически распознающих чужеродные Th-эпитопы MultiTER платформы.
3. Установлено, что наличие свободной N-концевой аспарагиновой кислоты В-клеточного эпитопа $A\beta_{1-11}$ не влияет на иммуногенность AV-1955 и AV-1959 вакцин у мышей и кроликов, однако, у макак-резусов способствует незначительному повышению аффинности анти- $A\beta$ антител и стойкому, длительно сохраняющемуся гуморальному иммунному ответу.
4. Картирование В-клеточного ответа показало, что пептид AEFRH ($A\beta_{2-6}$) является самым коротким иммуногенным В-клеточным эпитопом, распознаваемым анти- $A\beta$ антителами, синтезированными у мышей и макак-резусов в ответ на иммунизацию вакцинами AV-1955 и AV-1959.
5. Выявлено, что удаление аланина из пептида AEFRHDSGYEVH ($A\beta_{2-13}$) значительно снижает аффинность анти- $A\beta$ антител, синтезированных у мышей и макак-резусов в ответ на вакцинацию AV-1955 и AV-1959.
6. Картирование Т-клеточного ответа показало, что Th-эпитопы MultiTER платформы AV-1955 и AV-1959 вакцин имеют разную иммуногенность у индивидуальных макак-резусов, что ассоциировано с полиморфностью генов молекул МНС класса II.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилова С. Фармакотерапия болезни Альцгеймера. Москва: Пульс, 2003; 281-320.
2. Захаров В., Яхно Н. Когнитивные расстройства в пожилом и старческом возрасте. Москва: Методическое пособие для врачей, 2005; 65-71.
3. Agadjanyan M., Ghochikyan A, Petrushina I, Vasilevko V, Movsesyan N, Mkrtichyan M, Saing T, Cribbs D. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from beta-amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *J Immunol.* 2005; 174:1580–6.
4. Alexander J, del Guercio M., Maewal A, Qiao L, Fikes J, Chesnut R., Paulson J, Bundle D., DeFrees S, Sette A. Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. *J Immunol.* 2000; 164:1625–1633.
5. Alexander J, Fikes J, Hoffman S, Franke E, Sacci J, Appella E, Chisari F., Guidotti L., Chesnut R., Livingston B, Sette A. The optimization of helper T lymphocyte (HTL) function in vaccine development. *Immunol Res.* 1998; 18:79–92.
6. Andersen K, Launer L., Dewey M., et al. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology.* 1999; 53 (9): 1992–7.
7. Antoine C, Antoine P, Guermonprez P, Frigard B. Awareness of deficits and anosognosia in Alzheimer's disease. (French). *Encephale.* 2004; 30 (6): 570–7.
8. Arnáiz E, Almkvist O. Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand., Suppl.* 2003; 179: 34–41.
9. Bär M, Kruse A, Re. Situations of emotional significance in residents suffering from dementia. (German). *Z Gerontol Geriatr* 2003; 36 (6): 454–62.
10. Baraldo K, Mori E, Bartoloni A, Petracca R, Giannozzi A, Norelli F, et al. N19 polyepitope as a carrier for enhanced immunogenicity and protective efficacy of meningococcal conjugate vaccines. *Infect Immunol* 2004; 72:4884–7.
11. Broytman O, Malter J. Anti-Aβeta: The good, the bad, and the unforeseen. *J Neurosci Res.* 2004; 75:301–306.

12. Becker J., Overman A. The semantic memory deficit in Alzheimer's disease. (Spanish; Castilian). *Rev Neurol* 2002; 35 (8): 777–83.
13. Benke T. Two forms of apraxia in Alzheimer's disease. *Cortex* 1993; 29 (4): 715–25.
14. Bennett C, Crawford F, Osborne A, Diaz P, Hoyne J, Lopez R, Roques P, Duara R, Rossor M, Mullan M. Evidence that the APOE locus influences rate of disease progression in late onset familial Alzheimer's Disease but is not causative. *Am J Med Genet.* 1995 Feb 27; 60(1):1–6.
15. Berkhout A., Cools H., van Houwelingen H. The relationship between difficulties in feeding oneself and loss of weight in nursing-home patients with dementia. *Age Ageing* 1998; 27 (5): 637–41.
16. Bermejo-Pareja F., Benito-León J, Vega S., Medrano M., Román G. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J. Neurol. Sci.* 2008; 264 (1–2): 63–72.
17. Blacker D., Albert M., Bassett S., Go R., Harrell L., Folstein M. Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch. Neurol.* 1994; 51 (12): 1198–204.
18. Bonin-Guillaume S., Zekry D., Giacobini E., Gold G., Michel J. The economical impact of dementia. (French). *Presse Med* 2005; 34 (1): 35–41
19. Bonte F., Harris T., Hynan L., Bigio E., White C. Tc-99m HMPAO SPECT in the differential diagnosis of the dementias with histopathologic confirmation. *Clin Nucl Med* 2006; 31 (7): 376–8.
20. Bouras C., Hof P., Giannakopoulos P, Michel J., Morrison J. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb. Cortex* 1994; 4 (2): 138–50.
21. Boyer J., Ugen K., Wang B., Agadjanyan M., Gilbert L., Bagarazzi M., Chattergoon M., Frost P., Javadian A., Williams W., Refaeli Y., Ciccarelli R., McCallus D., Coney L., Weiner D. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med.* 1997; 3:526–32.

22. Brookmeyer R., Gray S., Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health* 1998 88(9): 1337–42.
23. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 2007; 3 (3): 186–91.
24. Bureau M., Gehl J., Deleuze V., Mir L., Scherman D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1474: 353-9.
25. Candore G., Balistreri C., Colonna-Romano G., Grimaldi M., Lio D, Listi F, Scola L, Vasto S, Caruso C. Immunosenescence and anti-immunosenescence therapies: the case of probiotics. *Rejuvenation Res.*2008; 11:425–32.
26. Carlesimo G., Oscar-Berman M. Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. *Neuropsychol Rev* 1992; 3 (2): 119–69.
27. Chartier-Harlin M., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J., Mullan M. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene.- *Nature*, 1991, 353(6347): 844-6.
28. Chen X., Yan S. Mitochondrial Abeta: a potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 2006; 58 (12): 686–94.
29. Clarfield A. The decreasing prevalence of reversible dementias: an updated meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* 2003; 163 (18): 2219–29.
30. Coors E., Seybold H., Merk H., Mahler V. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 95: 593–599.
31. Cribbs D., Ghochikyan A., Tran M., Vasilevko V., Petrushina I., Sadzikava N., Kesslak P., Kieber-Emmons T., Cotman C., Agadjanyan M. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol.* 2003; 15:505–14.
32. Cribbs D., Ghochikyan A., Tran M., Vasilevko V., Petrushina I., Sadzikava N., Kesslak P., Kieber-Emmons T., Cotman C., Agadjanyan M. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol.* 2003; 15:505–514.

33. Cruz V., Pais J., Teixeira A., Nunes B. The initial symptoms of Alzheimer disease: caregiver perception (Portuguese). *Acta Med Port* 2004; 17 (6): 435–44.
34. Das P., Chapoval S., Howard V., David C., Golde T. Immune responses against Abeta1–42 in HLA class II transgenic mice: implications for Abeta1–42 immune-mediated therapies. *Neurobiol Aging*. 2003; 24: 969–76.
35. Davtyan H., Ghochikyan A., Petrushina I., Hovakimyan A., Davtyan A., Poghosyan A., et al. Immunogenicity, Efficacy, Safety, and Mechanism of Action of Epitope Vaccine (Lu AF20513) for Alzheimer's Disease: Prelude to a Clinical Trial. *J Neurosci*. 2013; 33(11): 4923–34.
36. Davtyan H., Ghochikyan A., Cadagan R., Zamarin D., Petrushina I., Movsesyan N., Martinez-Sobrido L., Albrecht A., García-Sastre A., Agadjanyan M. The immunological potency and therapeutic potential of a prototype dual vaccine against influenza and Alzheimer's disease. *J Transl Med*. 2011; 9:127.
37. Davtyan H., Mkrtichyan M., Movsesyan N., Petrushina I., Mamikonyan G., Cribbs D., Agadjanyan M., Ghochikyan A. DNA prime/protein boost increased the titer, avidity and persistence of anti-A β antibodies in wild-type mice. *Gene Therapy*, 2010; 17: 261–271.
38. de Groot N., Doxiadis G., De Groot N., Otting N., Heijmans C., Rouweler A., Bontrop R. Genetic makeup of the DR region in rhesus macaques: gene content, transcripts, and pseudogenes. *J Immunol* 2004; 172: 6152–6157.
39. de Jong D., Jansen R., Kremer B., Verbeek M. Cerebrospinal fluid amyloid beta42/phosphorylated tau ratio discriminates between Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61: 755–8.
40. del Guercio M., Alexander J., Kubo R., Arrhenius T., Maewal A., Appella E., Hoffman S., Jones T., Valmori D., Sakaguchi K., Grey H., Sette A. Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. *Vaccine*. 1997; 15: 441–8.
41. del-Giudice, G. New carriers and adjuvants in the development of vaccines. *Curr. Opinions Immunol*. 1992; 4: 454–459.
42. Derhovanessian E., Solana R., Larbi A., Pawelec G. Immunity, ageing and cancer. *Immun Ageing*. 2008; 5:11.

43. Di Carlo A., Baldereschi M., Amaducci L., et al. Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50 (1): 41–8.
44. Donnelly J., Liu M., Ulmer J. Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 190–3.
45. Dougall N., Bruggink S., Ebmeier K. Systematic review of the diagnostic accuracy of 99mTc-HMPAO-SPECT in dementia. *Am J Geriatr Psychiatry* 2004; 12 (6): 554–70.
46. Dubois B., Feldman H., Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007; 6(8): 734–46.
47. Edward H., Raphael K. Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration; *Nature Medicine* 2004; 10: 26–S33.
48. Eli La, C.A. Eli Lilly and Company Announces Top-Line Results on Solanezumab Phase 3 Clinical Trials in Patients with Alzheimer's Disease. 2012. Available at <http://newsroom.lilly.com/releasedetail.cfm?releaseid=702211>.
49. Ferrer I., Rovira M., Guerra M., Rey M., Costa-Jussa F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2004; 14:11–20.
50. Ferri C., Prince M., Brayne C., et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 2005; 366 (9503): 2112–7.
51. Forbes K., Shanks M., Venneri A. The evolution of dysgraphia in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 2004; 63 (1): 19–24.
52. Förstl H., Kurz A. Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 1999; 249 (6): 288–290.
53. Franceschi C., Olivieri F., Marchegiani F., Cardelli M., Cavallone L., Capri M., Salvioli S., Valensin S., De Benedictis G., Di Iorio A., Caruso C., Paolisso G., Monti D. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126: 351–61.

54. Frank E. Effect of Alzheimer's disease on communication function. *J S C Med Assoc.* 1994; 90 (9): 417–23.
55. Galasko D., Schmitt F., Thomas R., Jin S., Bennett D. Detailed assessment of activities of daily living in moderate to severe Alzheimer's disease. *Journal of the International Neuropsychology Society* 2005; 11 (4): 446–453.
56. Gambassi G., Landi F., Lapane K., Sgadari A., Mor V., Bernabei R. Predictors of mortality in patients with Alzheimer's disease living in nursing homes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1999; 67 (1): 59–65.
57. Geldmacher D., Whitehouse P. Differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 48(5 Suppl 6): 2–9.
58. Ghochikyan A. Rationale for peptide and DNA based epitope vaccines for Alzheimer's disease immunotherapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009; 8(2):128-43.
59. Gilman S., Koller M., Black R., Jenkins L., Griffith S., Fox N., et al. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* 2005; 64(9):1553–62.
60. Goate A., Chartier-Harlin M., Mullan M., Brown G., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Rogues P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M., Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. - *Nature*, 1991, 349: 704-706.
61. Gold D., Reis M., Markiewicz D., Andres D. When home caregiving ends: a longitudinal study of outcomes for caregivers of relatives with dementia. *J Am Geriatr Soc* 1995; 43(1): 10–6.
62. Greig N., Mattson M., Perry T., et al. New therapeutic strategies and drug candidates for neurodegenerative diseases: p53 and TNF-alpha inhibitors, and GLP-1 receptor agonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1035: 290–315.
63. Haass C., Selkoe D. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:101–12.
64. Hanisch U. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002; 40:140–55.
65. Hardy J., Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1991; 12 (10): 383–88.

66. Hardy J., Selkoe D. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297: 353–356.
67. Harvey P., Moriarty P., Kleinman L., et al. The validation of a caregiver assessment of dementia: the Dementia Severity Scale. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2005; 19(4): 186–94.
68. Hashimoto M., Rockenstein E., Crews L., Masliah E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med*. 2003; 4 (1–2): 21–36.
69. Hebert L., Scherr P., Bienias J., Bennett D., Evans D. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol*. 2003; 60 (8): 1119–22.
70. Hernández F., Avila J. Tauopathies. *Cell. Mol. Life Sci*. 2007; 64 (17): 2219–33.
71. Hodges J., Patterson K. Is semantic memory consistently impaired early in the course of Alzheimer's disease? Neuroanatomical and diagnostic implications. *Neuropsychologia*. 1995; 33 (4): 441–59.
72. Honig L., Mayeux R. Natural history of Alzheimer's disease. *Aging (Milano)* 2001; 13(3): 171–2.
73. Hooper N. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem. Soc. Trans*. 2005; 33 (Pt 2): 335–8.
74. Imbert G., Marrony S., Ulrich P., Goldsmith P. Antibody immune response in cynomolgus monkeys following treatment with the active A β immunotherapy CAD106 Alzheimer's & Dementia: Journal of Alzheimer's Association. 2009; 5 Suppl (4):427.
75. Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Watanabe K., Sekiguchi M., Hosoki E., Kawashima-Morishima M., Lee H., Hama E., Sekine-Aizawa Y., Saido T. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*. 2000; 6:143–50.
76. Jack C., Knopman D., Jagust W., Petersen R., Weiner M., Aisen P. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol*. 2013;12(2): 207-16.

77. James E., Bui J., Berger D., Huston L., Roti M., Kwok W. Tetramer-guided epitope mapping reveals broad, individualized repertoires of tetanus toxin-specific CD4⁺ T cells and suggests HLA-based differences in epitope recognition. *Int Immunol.* 2007; 19(11):1291–301.
78. Jelacic M., Bonebakker A., Bonke B. Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review. *International Psychogeriatrics* 1995; 7 (3): 385–392.
79. Johnson, J. Johnson & Johnson Announces Discontinuation Of Phase 3 Development of Bapineuzumab Intravenous (IV). Mild-To-Moderate Alzheimer's Disease. 2012. Found at <http://www.jnj.com/connect/news/all/johnson-and-johnson-announces-discontinuation-of-phase-3-development-of-bapineuzumab-intravenous-iv-in-mild-to-moderate-alzheimers-disease>.
80. Kazui H., Matsuda A., Hirono N., et al. Everyday memory impairment of patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005; 19 (5–6): 331–7.
81. Kemppainen N., Aalto S., Karrasch M., et al. Cognitive reserve hypothesis: Pittsburgh Compound B and fluorodeoxyglucose positron emission tomography in relation to education in mild Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 2008; 63 (1): 112–8.
82. Kim H., Jin J., Maxwell J., Fukuchi K. Enhancing Th2 immune responses against amyloid protein by a DNA prime-adenovirus boost regimen for Alzheimer's disease. *Immunol Lett.* 2007; 112:30–8.
83. Kim J., Nottingham L., Tsai A., Lee D., Maguire H., Oh J., Dentchev T., Manson K., Wyand M., Agadjanyan M., Ugen K., Weiner D. 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.
84. Klafki H., Staufenbiel M., Kornhuber J., Wiltfang J. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* 2006; 129 (Pt 11): 2840–55.
85. Klunk W., Engler H., Nordberg A., Wang Y., Blomqvist G., Holt D., Bergstrom M., Savitcheva I., Huang G., Estrada S., Ausen B., Debnath M., Barletta J., Price J., Sandell J., Lopresti B., Wall A., Koivisto P., Antoni G., Mathis C., Langstrom B.

- Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004; 55:306–19.
86. La Rosa C., Wang Z., Brewer J., Lacey S., Villacres M., Sharan R., Krishnan R., Crooks M., Markel S., Maas R., Diamond D. Preclinical development of an adjuvant-free peptide vaccine with activity against CMV pp65 in HLA transgenic mice. *Blood*. 2002; 100:3681–3689.
 87. La Rosa C., Wang Z., Brewer J., Lacey S., Villacres M., Sharan R., Krishnan R., Crooks M., Markel S., Maas R., Diamond D. Preclinical development of an adjuvant-free peptide vaccine with activity against CMV pp65 in HLA transgenic mice. *Blood*. 2002; 100:3681–9.
 88. Lambert M., Barlow A., Chromy B., Edwards C., Freed R., Liosatos M., et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(11): 6448-6453.
 89. Lee M., Bard F., Johnson-Wood K., Lee C., Hu K., Griffith S., Black R., Schenk D., Seubert P. Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. *Ann Neurol*. 2005; 58:430–435.
 90. Lemere C., Maron R., Selkoe D., Weiner H. Nasal vaccination with beta-amyloid peptide for the treatment of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol*. 2001; 20: 705–11.
 91. Lemere C., Maron R., Spooner E., Grenfell T., Mori C., Desai R., Hancock W., Weiner H., Selkoe D. Nasal A β treatment induces anti-A β antibody production and decreases cerebral amyloid burden in PD-APP Mice. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 920:328–31.
 92. Lemere C., Spooner E., Leverone J., Mori C., Clements J. Intranasal immunotherapy for the treatment of Alzheimer's disease: Escherichia coli LT and LT(R192G) as mucosal adjuvants. *Neurobiol Aging*. 2002; 23:991–1000.
 93. Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D., Oshima J., Pettingell W., Yu C., Jondro P., Schmidt S., Wang K., et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995; 269(5226): 973–977.
 94. Lobello K., Ryan J., Liu E., Rippon G., Black R. Targeting Beta amyloid: a clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012; 2012:628070.

95. Mamikonyan G., Necula M., Mkrtichyan M., Ghochikyan A., Petrushina I., Movsesyan N., Mina E., Kiyatkin A., Glabe C., Cribbs D., Agadjanyan M. Anti-Abeta 1–11 antibody binds to different beta-amyloid species, inhibits fibril formation, and disaggregates preformed fibrils, but not the most toxic oligomers. *J Biol Chem.* 2007; 282: 22376–86.
96. Mapstone M., Cheema A., Fiandaca M., Zhong X., Mhyre T., Macarthur L., Hall W., Fisher S., Peterson D., Haley J., Nazar M., Rich S., Berlau D., Peltz C., Tan M., Kawas C., Federoff H. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults." *Nature medicine.* 2014; 20(4):415-8.
97. Marksteiner J., Hinterhuber H., Humpel C. Cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease: beta-amyloid(1-42), tau, phospho-tau-181 and total protein. *Drugs Today* 2007; 43 (6): 423–31.
98. McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34 (7): 939–44.
99. Meek P., McKeithan K., Schumock G. Economic considerations in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* 1998; 18 (2 Pt 2): 68–73; discussion 79–82.
100. Mendez M. The accurate diagnosis of early-onset dementia». *International Journal of Psychiatry Medicine* 2006; 36(4): 401–412.
101. Moir R., Tseitlin K., Soscia S., Hyman B., Tri-zarry M., Tanzi R. Autoantibodies to redox-modified oligomeric Aβeta are attenuated in the plasma of Alzheimer's disease patients. *J Biol Chem.* 2005; 280:17458–63.
102. Mölsä P., Marttila R., Rinne U. Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia». *Acta Neurol. Scand.* 1986; 74 (2): 103–7.
103. Mölsä P., Marttila R., Rinne U. Long-term survival and predictors of mortality in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurol. Scand.* 1995; 91 (3): 159–64.
104. Monsonego A., Imitola J., Zota V., Oida T., Weiner H. Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells following amyloid beta-peptide presentation to Th1 cells. *J Immunol.* 2003; 171(5):2216–24.

105. Morgan D., Diamond D., Gottschall P., Ugen K., Dickey C., Hardy J., Duff K., Jantzen P., DiCarlo G., Wilcock D., Connor K., Hatcher J., Hope C., Gordon M., Arendash G. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000; 408:982–985.
106. Movsesyan N., Ghochikyan A., Mkrtichyan M., Petrushina I., Davtyan H., Olkhanud P., Head E., Biragyn A., Cribbs D., Agadjanyan M. Reducing AD-like pathology in 3xTg-AD mouse model by DNA epitope vaccine - a novel immunotherapeutic strategy. *PLoS One*. 2008; 3(5): e2124.
107. Mudher A., Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?. *Trends Neurosci*. 2002; 25 (1): 22–26.
108. Murrell J., Farlow M., Ghetti B., Benson M. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. - *Science*, 1991; 254: 97-99.
109. Neumann H. Control of glial immune function by neurons. *Glia*. 2001; 36:191–9.
110. Scarmeas N., Brandt J., Blacker D., et al . Disruptive behavior as a predictor in Alzheimer disease. *Arch. Neurol*, 2007, 64 (12): 1755–61.
111. Nicoll J., Barton E., Boche D., Neal J., Ferrer I., Thompson P., Vlachouli C., Wilkinson D., Bayer A., Games D., Seubert P., Schenk D., Holmes C. Abeta species removal after abeta42 immunization. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65:1040–1048.
112. Nikolic W., Bai Y., Obregon D., Hou H., Mori T., Zeng J., Ehrhart J., Shytle R., Giunta B., Morgan D., Town T., Tan J. Transcutaneous beta-amyloid immunization reduces cerebral beta-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 2507–2512.
113. Ohnishi S., Takano K. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell. Mol. Life Sci*. 2004; 61 (5): 511–24.
114. Orgogozo J., Gilman S., Dartigues J., Laurent B., Puel M., Kirby L., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B., Boada M., Frank A., Hock C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. 2003; 61(1):46–54.
115. Panina-Bordignon P., Tan A., Termijtelen A., Demotz S., Corradin G., Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC

- class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol.* 1989; 19:2237–42.
116. Paresce D., Chung H., Maxfield F. Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J Biol Chem.* 1997; 272:29390–7.
 117. Pasquier F. Early diagnosis of dementia: neuropsychology. *J. Neurol.* 1999; 246 (1): 6–15.
 118. Patton R., Kalback W., Esh C., Kokjohn T., Van Vickle G., Luehrs D., Kuo Y., Lopez J., Brune D., Ferrer I., Masliah E., Newel A., Beach T., Castano E., Roher A. Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: a biochemical analysis. *Am J Pathol.* 2006; 169:1048–1063.
 119. Perneczky R., Pohl C., Sorg C., Hartmann J., Komossa K., Alexopoulos P., Wagenpfeil S., Kurz A. Complex activities of daily living in mild cognitive impairment: conceptual and diagnostic issues. *Age Ageing* 2006; 35 (3): 240–245.
 120. Petersen R. The current status of mild cognitive impairment—what do we tell our patients?. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3 (2): 60–1.
 121. Petrushina I., Ghochikyan A., Mkrtichyan M., Mamikonyan G., Movsesyan N., Ajdari R., Vasilevko V., Karapetyan A., Lees A., Agadjanyan M., Cribbs D. Mannan-Abeta28 conjugate prevents Abeta-plaque deposition, but increases microhemorrhages in the brains of vaccinated Tg2576 (APPsw) mice. *J Neuroinflammation.* 2008; 5:42.
 122. Petrushina I., Ghochikyan A., Mkrtichyan M., Mamikonyan G., Movsesyan N., Davtyan H., Patel A., Head E., Cribbs D., Agadjanyan M. Alzheimer's disease peptide epitope vaccine reduces insoluble but not soluble/oligomeric A β species in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci.* 2007; 27:12721–31.
 123. Pfeifer M., Boncristiano S., Bondolfi L., Stalder A., Deller T., Staufenbiel M., Mathews P., Jucker M. Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science.* 2002; 298:1379.
 124. Poirier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P., Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1993; 342(8873):697–699.
 125. Potter G., Steffens D. Contribution of depression to cognitive impairment and dementia in older adults. *Neurologist* 2007; 13 (3): 105–17.

126. Price D., Sisodia S. Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models. *Annu Rev Med.* 1994; 45:435–446.
127. Price K., Hamilton R. Anaphylactoid reactions in two patients after omalizumab administration after successful long-term therapy. *Allergy Asthma Proc.* 2007; 28:313–319.
128. Pride M., Seubert P., Grundman M., Hagen M., Eldridge J., Black R. Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792- associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis.* 2008; 5:194–196.
129. Priller C., Bauer T., Mitteregger G., Krebs B., Kretzschmar H., Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 2006; 26 (27): 7212–21.
130. Qiu W., Walsh D., Ye Z., Vekrellis K., Zhang J., Podlisny M., Rosner M., Safavi A., Hersh L., Selkoe D. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem.* 1998; 273:32730–8.
131. Qiu W., Ye Z., Kholodenko D., Seubert P., Selkoe D. Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem.* 1997; 272:6641–6.
132. Racke M., Boone L., Hepburn D., Parsadainian M., Bryan M., Ness D., Piroozii K., Jordan W., Brown D., Hoffman W., Holtzman D., Bales K., Gitter B., May P., Paul S., DeMattos R. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. *J Neurosci.* 2005 Jan 19; 25(3):629-36.
133. 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.
134. Rogaev E., Sherrington R., Rogaeva E. et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. - *Nature,* 1995; 376: 775-778.
135. Sartori G., Snitz B., Sorcinelli L., Daum I. Remote memory in advanced Alzheimer's disease. *Arch Clin Neuropsychol* 2004; 19 (6): 779–89.50

136. Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20(Suppl 6):vi3–9.
137. Schellenberg G., Anderson L., O'dahl S., Wisjman E., Sadovnick A., Ball M., Larson E., Kukull W., Martin G., Roses A., et al. APP717, APP693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. 1991; 49(3):511–517.
138. Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K, Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandever C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999; 400(6740):173-7.
139. Schickli J., Flandorfer A., Nakaya T., Martinez-Sobrido L., Garcia-Sastre A., Palese P. Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001, 356:1965-1973.
140. Schley D., Carare-Nnadi R., Please C., Perry V., Weller R. Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes out of the brain. *J Theor Biol*. 2006; 238:962–74.
141. Shen Z. Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses* 2004; 63 (2): 308–21.
142. Sherrington R., Rogaev E., Liang Y. al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. - *Nature*, 1995; 375: 754-760.
143. Shibata M., Yamada S., Kumar S., Calero M., Bading J., Frangione B., Holtzman D., Miller C., Strickland D., Ghiso J., Zlokovic B. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1–40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2000; 106:1489–99.
144. Shin W., Lee D., Park K., Kim S., Yang M., Joe E., Jin B. Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo. *Glia*. 2004; 46:142–52.
145. Sigurdsson E., Knudsen E., Asuni A., Fitzner-Attas C., Sage D., Quartermain D., Goni F., Frangione B., Wisniewski T. An attenuated immune response is sufficient to

- enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *J Neurosci.* 2004; 24:6277–82.
146. Singh H., Raghava G. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics.* 2003; 19:1009–14.
 147. Small B., Gagnon E., Robinson B. Early identification of cognitive deficits: preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Geriatrics* 2007; 62 (4): 19–23.
 148. Sounders A., Strittmayer W., Schmechel D., Georehyslop P., Perkakvance M., Joo S., Rosi B., Gusella J., Crappermaclachian D., Alberts M., Hnlette C., Cram B., Goldhaber D., Roses A. *Neurology.* 1993; 43: 1467-1472.
 149. Souren L., Franssen E., Reisberg B. Contractures and loss of function in patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 1995; 43 (6): 650–5.
 150. Strittmatter W., Saunders A., Schmechel D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G., Roses, A. Apolipoprotein E: High avidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. - *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 1993; 90: 1977-1981.
 151. Tabert M., Liu X., Doty R., Serby M., Zamora D., Pelton G., Marder K., Albers M., Stern Y., Devanand D. A 10-item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 2005; 58 (1): 155–160.
 152. Tanzi R., Valula G., Romano D., Mortilla M., Huang T., et al. Assesment of amyloid beta-protein precursor gene mutations in a large set of familial and sporadic Alzheimer disease cases. - *Am.J.Hum.Genet.,* 1992; 51: 273-282.
 153. Tatsch M., Bottino C., Azevedo D., et al. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease and cognitively impaired, nondemented elderly from a community-based sample in Brazil: prevalence and relationship with dementia severit. *Am J Geriatr Psychiatry* 2006; 14 (5): 438–45.
 154. Tiraboschi P., Hansen L., Thal L., Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 2004; 62 (11): 1984–9.
 155. Tombaugh T., McIntyre N. The mini-mental state examination: a comprehensive review. *J Am Geriatr Soc,* 1992, 40 (9): 922–35.

156. Turner P., O'Connor K., Tate W., Abraham W. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 2003; 70 (1): 1–32.
157. Van Broeck B., Van Broeckhoven C., Kumar-Singh S. Current insights into molecular mechanisms of Alzheimer disease and their implications for therapeutic approaches. *Neurodegener Dis* 2007; 4 (5): 349–65.
158. Vasan S., Hurley A., Schlesinger S., 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.
159. Volicer L., Bass E., Luther S. Agitation and resistiveness to care are two separate behavioral syndromes of dementia. *J Am Med Dir Assoc* 2007; 8 (8): 527–32.
160. Volicer L., Harper D., Manning B., Goldstein R., Satlin A. Sundowning and circadian rhythms in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 2001; 158 (5): 704–11.
161. Wada H., Nakajoh K., Satoh-Nakagawa T., et al. Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 2001; 47 (5): 271–6.
162. Waldemar G., Dubois B., Emre M., et al. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur. J. Neurol.* 2007; 14 (1): e1–26.
163. Weber J., Hua F., Spears L., Marty V., Kuniyoshi C., Celis E. A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J Immunother.* 1999; 22:431–40.
164. Weinberger B., Hernler-Brandstetter D., Schwanninger A., Weiskopf D., Grubeck-Loebenstien B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:1078–84.
165. Weller R., Massey A., Newman T., Hutchings M., Kuo Y., Roher A. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1998; 153:725–33.
166. Wenk G. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 2003; 64 Suppl 9: 7–10.
167. 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.

168. Wilcock D., Jantzen P., Li Q., Morgan D., Gordon M. Amyloid-beta vaccination, but not nitrononsteroidal anti-inflammatory drug treatment, increases vascular amyloid and microhemorrhage while both reduce parenchymal amyloid. *Neuroscience*. 2007; 144:950–960.
169. Wilcock D., Rojiani A., Rosenthal A., Levkowitz G., Subbarao S., Alamed J., Wilson D., Wilson N., Freeman M., Gordon M., Morgan D. Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci*. 2004; 24:6144–51.
170. Wilcock D., Rojiani A., Rosenthal A., Subbarao S., Freeman M., Gordon M., Morgan D. Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2004; 1:24.
171. Winblad B., Andreasen N., Minthon L., Floesser A., Imbert G., Dumortier T., et al. Safety, tolerability, and antibody response of active Abeta immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol*. 2012; 11(7):597–604.
172. Yamamoto M., Kiyota T., Walsh S., Liu J., Kipnis J., Dcezu T. Cytokine-mediated inhibition of fibrillar amyloid-beta peptide degradation by human mononuclear phagocytes. *J Immunol*. 2008; 181:3877–86.
173. Yankner B., Duffy L., Kirschner D. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 1990; 250 (4978): 279–82.
174. Zahn L., Jasny B., Culotta E., Pennisi E. A Barrel of Monkey Genes. *Science*. 2007; 316(5822): 215.