

УДК 571.27

*А.В. Камынина*<sup>1,2</sup>, *В.С. Шалгунов*<sup>3,2</sup>, *Т.Д. Волкова*<sup>2</sup>, *Д.О. Короев*<sup>2</sup>,  
*М.Б. Обозная*<sup>2</sup>, *Н.И. Медвинская*<sup>4</sup>, *А.Н. Самохин*<sup>4</sup>, *Н.В. Бобкова*<sup>4</sup>,  
*О.М. Вольпина*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН

<sup>3</sup> Московская государственная академия тонкой химической технологии  
им. М.В. Ломоносова

<sup>4</sup> Институт биофизики клетки РАН

## Подход к терапии болезни Альцгеймера с помощью индукции антител, направленных к $\alpha 7$ -субъединице ацетилхолинового рецептора

Проведены исследования, демонстрирующие принципиальную возможность использования иммунизации фрагментами  $\alpha 7$ -субъединицы ацетилхолинового рецептора для коррекции памяти у мышей при болезни Альцгеймера. Показано, что иммунизация фрагментами  $\alpha 7$ -субъединицы, конъюгированными с белковым носителем, восстанавливая память у мышей в экспериментальной модели болезни Альцгеймера, приводит к выработке антител, которые проходят гематоэнцефалический барьер, что сопровождается снижением уровня  $\beta$ -амилоида в мозгу. Выявлен фрагмент  $\alpha 7$ -субъединицы последовательности 173–193, иммунизация которым в свободном виде без конъюгации с белковым носителем оказывает выраженное протективное действие на память животных в модели болезни Альцгеймера. Пептид 173–193 представляется перспективным для создания на его основе иммунотерапевтического препарата для профилактики и лечения болезни Альцгеймера.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, иммунизация, коррекция памяти, фрагменты  $\alpha 7$ -субъединицы ацетилхолинового рецептора, белковый носитель, уровень  $\beta$ -амилоида.

### I. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является одной из самых распространенных причин деменции в пожилом и старческом возрасте [1]. Это заболевание сопровождается массовой гибелью нейронов в основном в коре и гиппокампе больных [2]. Существующие на сегодняшний день основные методы лечения БА обладают симптоматическим эффектом [3]. Поэтому актуальна разработка новых подходов к радикальной терапии БА. Показано, что главную роль в механизме гибели нейронов при БА играют пептиды  $\beta$ -амилоидного ряда, в частности,  $\beta$ -амилоид (1–42) [4–7]. При БА отмечается поражение холинэргической системы, а именно: наблюдается уменьшение количества  $\alpha 7$ -субъединицы ацетилхолинового рецептора (АХР) на поверхности нейрональных клеток в разных отделах головного мозга [8]. Один из предполагаемых механизмов развития заболевания за-

ключается в том, что  $\beta$ -амилоид (1–42) с высокой аффинностью связывается с  $\alpha 7$ -субъединицей АХР и проникает внутрь нейрона, приводя к лизису клетки и к формированию на её месте амилоидной бляшки [9–11]. Ранее мы предположили, что антитела к  $\alpha 7$ -субъединице АХР могут препятствовать связыванию  $\beta$ -амилоида с рецептором и, таким образом, предохранять нейроны от гибели [12]. В соответствии с этим предположением была проведена иммунизация животных, при которой в качестве иммуногенов были использованы белковые конъюгаты синтетических фрагментов  $\alpha 7$ -субъединицы АХР, вызывающие выработку специфичных к данному рецептору антител. Моделью спорадической формы БА были выбраны бульбэктомированные (БЭ) мыши линии NMRI, развивающие в отдаленные сроки после удаления обонятельных луковиц поведенческие, морфологические и биохимические

признаки нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа, включая потерю пространственной памяти, снижение обучаемости и повышенный уровень мозгового  $\beta$ -амилоида [13–15]. Исследования, проведённые на БЭ мышах, подтвердили гипотезу о протективном действии иммунизации мышей пептидами, конъюгированными с гемоцианином улитки (KLH), на состояние пространственной памяти животных в модели БА. Результаты проведённых исследований показали, что среди БЭ мышей, иммунизированных KLH-конъюгатом фрагмента 1–23 (I)  $\alpha$ 7-субъединицы, обучились 20% животных, а среди БЭ мышей, иммунизированных KLH-конъюгатом пептида (159–168)-(179–188) (II), — 50% животных. При этом у контрольных ложнооперированных мышей (ЛО), проходивших все те же манипуляции, что и БЭ, но без удаления обонятельных луковиц, наблюдалось снижение обучаемости живот-

ных при иммунизации обоими пептидами. В случае иммунизации конъюгатом пептида II негативный эффект на ЛО мышах был ниже, чем в случае иммунизации пептидом I.

Полученные результаты оставляли открытым ответ на вопрос о роли антител к фрагментам  $\alpha$ 7-субъединицы АХР в индукции протективного иммунитета, поэтому актуальным представлялось более детальное изучение механизмов воздействия иммунизации фрагментами  $\alpha$ 7-субъединицы на состояние пространственной памяти БЭ мышей. Принципиальным был также поиск новых пептидов, способных в свободном виде, без конъюгации с KLH, индуцировать иммунный ответ и оказывать более интенсивное терапевтическое действие на мышей в модели БА без снижения памяти у контрольных ЛО животных.

Т а б л и ц а 1

**Результаты тестирования пространственной памяти и титры антител в сыворотках крови и спинномозговой жидкости иммунизированных БЭ мышей**

Иммуноген	Соотношение числа обученных мышей к числу необученных (%)	Титр противопептидных антител ( $-\lg$ ) в сыворотке крови	Титр противопептидных антител ( $-\lg$ ) в спинномозговой жидкости
(I)-KLH	3/15(20)	5,1–5,7	1,6–3,4
(II)-KLH	8/16(50)	5,1–5,7	2,2–3,4
Контроль (KLH)	0/5(0)	< 1,0	< 1,0

Приведён диапазон титров антител, определённых индивидуально для каждого из животных в группе

## II. Результаты и обсуждение

Поскольку иммунизация KLH-конъюгатами пептидов I и II оказывала протективное действие на память БЭ мышей, представляет интерес более подробное изучение роли антител в этом процессе. Согласно нашему предположению, мишенью для выработанных противопептидных антител является АХР  $\alpha$ 7-типа, интегрированный в мембраны нейронов мозга. В связи с этим для доказательства участия антител в оказании протективного эффекта на память БЭ мышей нам было важно показать, что противопептидные антитела проходят гематоэнцефалический барьер. Для этих целей на первом этапе исследований выделяли спинномозговую

жидкость у БЭ мышей, иммунизированных KLH-конъюгатами пептидов I и II. Далее проводили анализ спинномозговой жидкости животных на содержание противопептидных антител. В результате таких исследований было выявлено наличие антител в спинномозговых жидкостях в обеих группах БЭ мышей (табл. 1). В первой группе животных, иммунизированных конъюгатом пептида I, титр антител находился в пределах от 1,6 до 3,4. Во второй группе, иммунизированной конъюгатом пептида II, значения титров колебались от 2,2 до 3,4. При этом иммунизация конъюгатами обоих пептидов индуцировала высокий иммунный ответ (титры в сыворотках крови 5,1–5,7) и оказывала протективное действие на состояние

пространственной памяти у БЭ мышей. В контрольной группе, иммунизированной КЛН, противопептидные антитела в спинномозговой жидкости отсутствовали.

Таким образом, показано, что противопептидные антитела проходят гематоэнцефалический барьер. Это даёт основание предполагать, что именно иммунизация пептидными фрагментами приводит к улучшению пространственной памяти у части БЭ мышей. Но при этом обучаемость в двух группах БЭ мышей различается, что даёт основание полагать, что терапевтическое действие антител зависит от того, к какому участку  $\alpha 7$ -субъединицы АХР направлены антитела. Возможно, иммунизация конъюгатом пептида II оказывала наибольший протективный эффект из-за близкого расположения этого участка к сайту связывания с ацетилхолином [16].

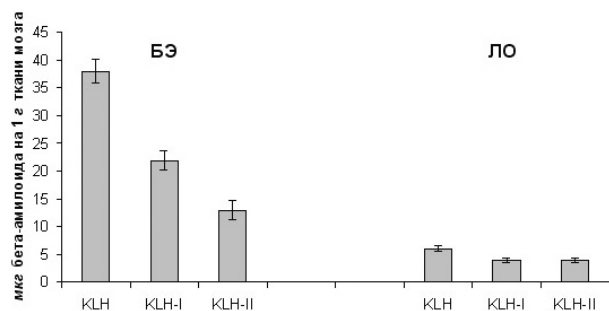


Рис. 1

Одним из признаков развития БА является повышение содержания  $\beta$ -амилоида в мозгу больных [3]. Поэтому на следующем этапе мы исследовали влияние иммунизации конъюгатами пептидов на уровень  $\beta$ -амилоида в индивидуальных образцах мозга животных. В контрольной группе БЭ мышей, иммунизированных КЛН, уровень  $\beta$ -амилоида в среднем составляет ( $38 \pm 2,1$ ) мкг на 1 г ткани мозга и не отличается от результатов, полученных на неиммунизированных БЭ мышцах (рис. 1). Было показано, что в группе БЭ мышей, иммунизированных КЛН-конъюгатом фрагмента I, уровень  $\beta$ -амилоида снизился до ( $22 \pm 1,75$ ) мкг на 1 г ткани, в то же время во второй группе, иммунизированной конъюгатом пептида II, — до  $13 \pm 1,76$  мкг на 1 г ткани мозга. Исследование тканей мозга контрольных ЛО животных показало, что иммунизация КЛН-конъюгатами обоих пептидов не приводит к изменениям в содержании  $\beta$ -амилоида в

мозговых тканях — уровень  $\beta$ -амилоида находится в пределах нормы (4–6 мкг/г ткани) (рис. 1). В результате таких исследований была выявлена корреляция между обучаемостью БЭ животных, иммунизированных КЛН-конъюгатами пептидов I и II, и содержанием  $\beta$ -амилоида в мозговой ткани. В группе мышей, иммунизированных конъюгатом пептида II, был наибольший процент обучившихся (50%) животных и наименьший уровень  $\beta$ -амилоида в мозгу. Таким образом, показано, что в результате иммунизации конъюгатом пептида II, оказывающей большее терапевтическое действие, наблюдается наиболее значительное снижение уровня  $\beta$ -амилоида в мозгу животных.

Мы предположили, что негативное влияние иммунизации конъюгатами пептидов на состояние памяти контрольных ЛО мышей происходит из-за стимуляции очень высокого уровня противопептидных антител, направленных к эндогенному белку ( $\alpha 7$ -субъединица) [12]. Поэтому была предпринята попытка понизить титры противопептидных антител, отказавшись от конъюгации с гемоцианином улитки, но сохранив при этом иммуногенные и протективные свойства пептидов. Более выраженное терапевтическое действие иммунизации конъюгатом пептида II по сравнению с иммунизацией конъюгатом пептида I означало, что возможна оптимизация структуры пептидов и целесообразен их выбор в районе связывания ацетилхолина с рецептором (171–193). Поэтому помимо двух уже рассмотренных пептидов 1–23 (I) и (159–168) – (179–188) (II) были выбраны ещё два пептида, являющихся фрагментами 173–188 (III) и 173–193 (IV)  $\alpha 7$ -субъединицы АХР и содержащих теоретически рассчитанные Т-хелперные эпитопы [17] (табл. 2). Пептид IV содержит два цистеина C190 и C191 и включает ацетилхолин, связывающий сайт. Были проведены исследования по изучению способности пептидов в свободном виде индуцировать иммунный ответ у мышей линии NMRI (табл. 3). Было показано, что пептиды I и IV в свободном виде индуцировали иммунный ответ у мышей, в то время как пептиды II и III — нет. В связи с этим дальнейшие работы по изучению влияния иммунизации на память БЭ мышей были проведены с пептидами I и IV.

В результате таких исследований было показано, что в группе БЭ мышей, иммунизированных пептидом I в свободном виде, ни одно животное не обучилось, в то время как во второй группе, иммунизированной пептидом IV, 82% мышей (9 из 11) демонстрировали наличие пространственной памяти. В случае иммунизации ЛО мышей пептидом IV негативное влияние на память контрольных животных отсутствовало: все мыши в группе демонстрировали наличие пространственной памяти (табл. 2). В настоящее время ведутся работы, направленные на исследование способности антител к пептиду IV проходить гематоэнцефалический барьер и на изучение влияния иммунизации этим фрагментом на уровень  $\beta$ -амилоида в тканях мозга БЭ мышей.

Проведённые исследования показывают принципиальную возможность ис-

пользования иммунизации фрагментами  $\alpha 7$ -субъединицы для коррекции памяти при БА. При этом показано, что иммунизация фрагментами  $\alpha 7$ -субъединицы АХР, конъюгированными с гемоцианином улитки, приводит к выработке антител, которые проходят гематоэнцефалический барьер, и снижению уровня  $\beta$ -амилоида в мозгу мышей в экспериментальной модели БА. Наибольшую терапевтическую активность проявил пептид 173–193 (IV), иммунизация которым оказывала выраженное протективное действие на память животных в экспериментальной модели БА при отсутствии негативного влияния на память контрольных ЛО мышей. На основе пептида IV представляется перспективным создание иммунотерапевтического препарата для профилактики и лечения болезни Альцгеймера.

Т а б л и ц а 2

**Аминокислотные последовательности пептидов  
I, II, III и IV**

Название пептида	Аминокислотная последовательность
I (1–23)	GEFQ RKLYKELVKNY NPLERPVA
II (159–168)-(179–188)	QMQEADISG Y-IPGKRSERFY
III (173–188)	E WDLVGIPGK RSERFY
IV (173–193)	E WDLVGIPGK RSERFYECCKE

Выделены участки, являющиеся расчётными Т-хелперными эпитопами

Т а б л и ц а 3

**Результаты тестирования пространственной памяти и титры антител  
в сыворотках крови и спинномозговой жидкости БЭ и ЛО животных  
после иммунизации свободными пептидами**

Иммуноген	% обученных БЭ мышей	% обученных ЛО мышей	Титр противопептидных антител ( $-\lg$ ) в сыворотке крови
I	0	100	2,2–3,7
II	н. о.	н. о.	< 1,6
III	н. о.	н. о.	< 1,6
IV	82	100	2,2–4,8
Контроль (PBS)	100	100	< 1,0

Н. о. — не определяли. Приведён диапазон титров антител, определённых индивидуально для каждого из животных в группе.

### III. Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария). В иммунологических исследованиях использовали раствор KLH в PBS в концентрации 5,3 мг/мл (Sigma,

США), 25% водный раствор глутарового альдегида (Sigma, США), полный адъювант Фрейнда (ПАФ), неполный адъювант Фрейнда (НАФ), козьи антитела против иммуноглобулинов мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена

(Sigma, США), 96-луночные планшеты Maxisorp (Nunc, Дания) для иммуноферментного анализа. Для иммунизации использовали 2-месячных мышей самцов линии NMRI.

#### IV. Твердофазный синтез пептидов

Пептиды I, II, III и IV синтезировали твердофазным методом на пара-алкоксибензильном полимере как описано в [18].

Схема опыта:

1-й день — первая иммунизация;

28-й день — операция бульэктомии;

35-й день — вторая иммунизация;

45-й день — забор крови;

45–50-е дни — обучение;

50-й день — тестирование.

#### V. Иммунизация животных

Мыши были иммунизированы дважды. Первую иммунизацию проводили в ПАФ, вторую — в НАФ. Растворы пептидов в концентрации 1 мг/мл в PBS (0,15 М раствор NaCl в 0,01 М растворе  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (рН7,4)) смешивали с равным объемом адьюванта до получения эмульсии. Эмульсию вводили подкожно в основании хвоста в объёме 0,2 мл из расчёта 100 мкг пептида на одну мышь.

#### VI. Получение сывороток и спинномозговой жидкости и определение титра противопептидных антител

Кровь и спинно-мозговую жидкость отбирали после тотального забоя мышей. Для этих целей мышь сначала усыпляли хлороформом, затем вскрывали грудную клетку и шприцем отбирали кровь из правого желудочка. Далее проводили перфузию сердца 10 мл физ. раствора. Из спинно-мозгового канала в шейном отделе позвоночника мыши отобрали спинно-мозговую жидкость. Сыворотку крови готовили из индивидуально отобранной крови мышей. Титры противопептидных антител определяли с помощью твердофазного

иммуноферментного анализа, как описано в работе [12].

Операция бульэктомии и тест на пространственную память животных проводили, как описано в работе [12].

#### VII. Определение уровня $\beta$ -амилоида в мозгу животных

Выделение и очистку  $\beta$ -амилоида из ткани мозга БЭ и ЛО мышей проводили, как описано в работе [13]. Уровень бета-амилоида определялся в экстрактах мозга всех групп экспериментальных животных с помощью ДОТ-анализа и использованием специфических моноклональных антител к бета-амилоиду 4G8 [13].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 06-04-48710-а) и программ РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки в медицине».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Torpy J.M.* Dementia // JAMA patient page. — June 6, 2007. — V. 297, N. 21.
2. *Mattson M.P.* Pathways towards and away from Alzheimer's disease // Nature. — 2004. — V. 430. — P. 631–639.
3. *Beach T.G., Walker D.G., Roher A.E., Potter P.E.* Anti-amiloidogenic activity of cholinergic agents // Drug Dev. Res. — 2002. — V. 56. — P. 242–247.
4. *Hardy J., Selkoe D.J.* The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // Science. — 2002. — V. 297. — P. 353–356.
5. *LaFerla F.M., Tinkle B.T., Bieberich C.J., Haudenschild C.C., Jay G.* The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice // Nat. Genet. — 1995. — V. 9. — P. 21–30.
6. *Tabira T., Chui D.H., Kuroda S.* Significance of intracellular Abeta42 accumulation in Alzheimer's disease // Front. Biosci. — 2002. — V. 7. — P. a44–a49.
7. *Blennow K., De Leon M.J., Zetterberg H.* Alzheimer's disease // Lancet. — 2006. — V. 368. — P. 387–403.
8. *Court J., Martin-Ruiz C., Piggott M., Spurdin D., Griffiths M., Perry E.* Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease

// *Biol. psychiatry.* — 2001. — V. 49. — P. 175–84.

9. *D'Andrea M.R., Lee D.H., Wang H.Y., Nagele R.G.* Targeting intracellular A $\beta$ 42 for Alzheimer's disease drug discovery // *Drug development research.* — 2002. — V. 56. — P. 194–200.

10. *D'Andrea M.R., Nagele R.G.* MAP-2 immunolabeling can distinguish diffuse from dense-core amyloid plaques in Alzheimer's disease brains // *Biotechnic histochem.* — 2002. — V. 77(2). — P. 95–103.

11. *D'Andrea M.R., Nagele R.G., Wang H.Y., Peterson P.A., Lee D.H.* Evidence for neuronal origin of amyloid plaques in Alzheimer's disease // *Histopathology.* — 2001. — V. 38. — P. 120–134.

12. *Вольпина О.М., Волкова Т.Д., Титова М.А., Гершович Ю.Г., Медвинская Н.И., Самохин А.Н., Камынина А.В., Шалгунов В.С., Короев Д.О., Филатова М.П., Обозная М.Б., Бобкова Н.В.* Новые подходы к иммунотерапии болезни Альцгеймера с использованием синтетических фрагментов  $\alpha$ 7-субъединицы ацетилхолинового рецептора // *Биоорган. химия.* — 2008. — Т. 34, № 1. — С. 50–55.

13. *Александрова И.Ю., Кувичкин В.В., Кашпаров И.В., Медвинская Н.И., Нестерова И.В., Лунин С.М., Самохин А.Н., Бобкова Н.В.* Повышенный уровень  $\beta$ -амилоида в мозге у бульбэк-

томированных мышей // *Биохимия.* — 2004. — Т. 69. — С. 218–224.

14. *Bobkova N.V., Nesterova I.V., Medvinskaya N.I., Aleksandrova I.Y., Samokhin A.N., Gershovich J.G., Gershovich P.M., Yashin V.A.* Possible role of the olfactory system in Alzheimer's disease genesis // *Medimond.* — 2005. — P. 91–95.

15. *Бобкова Н.В., Нестерова И.В., Нестеров В.И.* Состояние холинергических структур переднего мозга у бульбэктомированных мышей // *БЭБМ.* — 2001. — Т. 131. — С. 507–511.

16. *Clementi F., Fornasari D., Gotti C.* Handbook of experimental pharmacology. Neuronal nicotinic receptors. V. 144. — Berlin: Springer-Verlag, 2000.

17. *Вольпина О.М., Титова М.А., Жмак М.Н., Короев Д.О., Обозная М.Б., Волкова Т.Д., Иванов В.Т.* Предсказание структуры пептидов, способных индуцировать образование антител у мышей // *Биоорган. химия.* — 2002. — Т. 28, № 5. — С. 387–395.

18. *Вольпина О.М., Титова М.А., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Обозная М.Б., Жмак М.Н., Алексеев Т.А., Цетлин В.И.* Получение антител к  $\alpha$ 7-субъединице никотинового ацетилхолинового рецептора человека с помощью иммуноактивных синтетических пептидов // *Биоорган. химия.* — 2006. — Т. 32. — С. 169–17.

*Поступила в редакцию 17.01.2008.*