

Использование животных моделей для оценки эффективности препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний

Устюгов Алексей Анатольевич

Центр доклинических испытаний
Институт физиологически активных веществ РАН

Подготовлено для GLP Planet

30 июня – 1 июля 2022

Санкт-Петербург

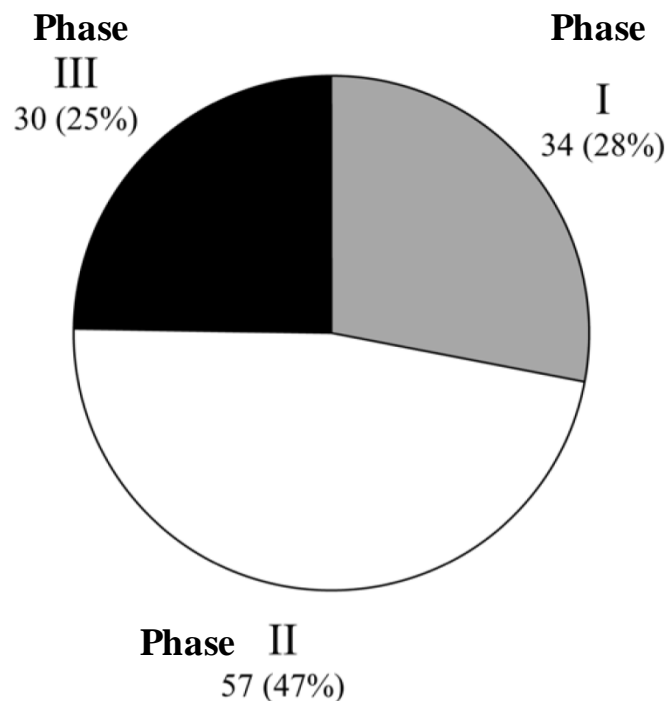
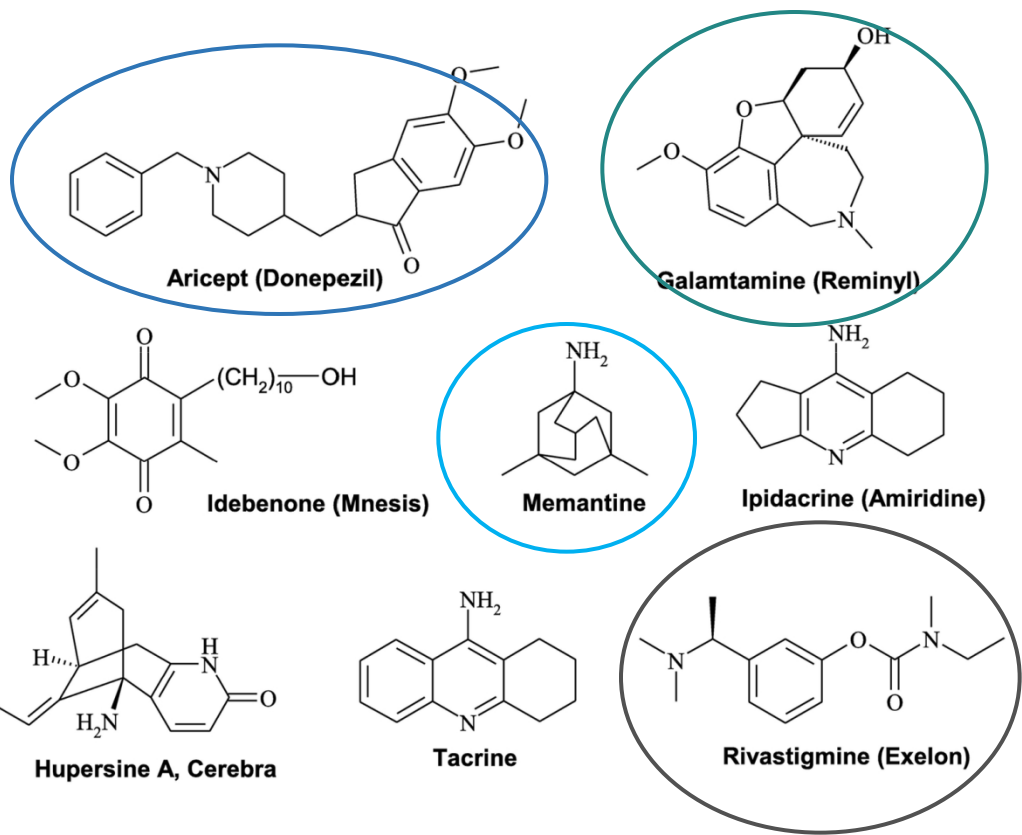
Нейродегенеративные заболевания

- Неоднородная группа наследственных или приобретённых заболеваний нервной системы с прогрессирующей гибелью нейронов
- Приводит к деменции и нарушению двигательных функций.
- В мире к **2050**: 131,5 млн человек
- В России к **2030**: рост более чем в 1,5 раза и к **2050** году превысит эпидемиологический порог в **5%** населения страны – 7 млн. человек.

Разработка терапевтических средств для лечения болезни Альцгеймера – очень востребованная область современной медицинской химии

Мировой рынок препаратов составляет около 4-6 миллиардов долларов.

С 2002 года по настоящее время было проведено более 500 клинических испытаний (более 70 препаратов дошли до Ph III), но только 1 вышел на рынок.

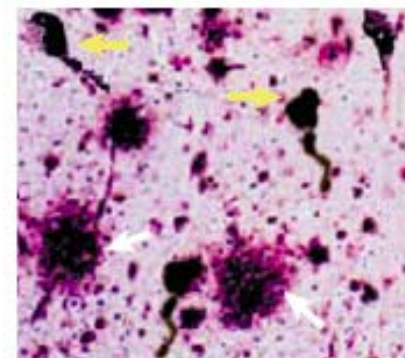


Нейродегенеративные заболевания

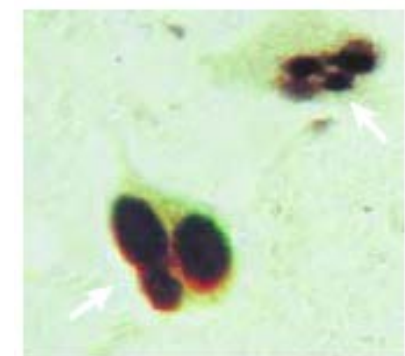
	частота встречаемости	<u>на 1 млн</u>	<u>% от общего</u>
Болезнь Альцгеймера	1 из 300	3,300	>90%
Болезнь Паркинсона	1 из 5,000	200	} <10%
Деменция с тельцами Леви	6 из 100,000	60	
Фронтотемпоральная деменция	3 из 100,000	30	
Боковой амиотрофический склероз	2 из 100,000	20	
Хорея Гентингтона	6 из 1,000,000	6	

Нейродегенеративные заболевания – протеинопатии:
изменение конформации, нарушение метаболизма,
агрегация и токсичность разных белков

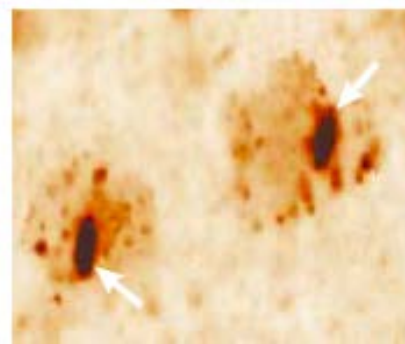
- **Болезнь Альцгеймера:**
бета-амилоид: сенильные бляшки
тау: нейрофибрилярные клубки
- **Болезнь Паркинсона:**
альфа-синуклеин: тельца Леви
- **Хорея Гентингтона:**
гентингтин: внутриядерные включения
- **Боковой амиотрофический склероз и фронтотемпоральная деменция:**
TDP-43 и FUS: цитоплазматические агрегаты



бляшки и клубки при БА



тельца Леви



включения гентингтина

Необходимость в создании новых модельных систем с заданной патологией и характеристики уже имеющихся моделей на новом уровне

Генетические модели – важная тест-система для изучения **патологических механизмов НДЗ**, а также для отбора и исследования механизма действия нейропротекторных препаратов

Центр доклинических испытаний ИФАВ РАН

Уникальные линии трансгенных животных, моделирующих
нейродегенеративные заболевания и другие социально-значимые болезни

Название	Модельное состояние	Особенности линии
5xFAD (Tg(APP ^S W ^F ILon, PSEN1* ^M 146L* ^L 286V) 6799 ^V as/J)	Церебральный амилоидоз (болезнь Альцгеймера)	<i>APP</i> : K670N/M671L; I716V; V717L. Ген <i>PS1</i> : M146L; L286V; - амилоидные отложения, глиоз, нейродегенерацию, нарушения памяти; - накопление внутриклеточного Аβ и выраженная гибель нейронов.
3xFAD Tg(APP ^S we,tauP301L) 1Lfa	Синаптическая дисфункция при накоплении амилоидных отложений (болезнь Альцгеймера)	Мутация в гене <i>APP</i> и в тау белке tauP301L - увеличение бета-амилоидных отложений в возрасте 3-4 мес; - к 12-15 месяцами в гиппокампе обнаруживаются агрегаты конформационно измененного и гиперфосфорилированного тау.
APP/PS1 Tg(APP ^S we,PSEN1dE9) 85Dbo	Ранняя стадия болезни Альцгеймера	- Экспрессия химерного белка- предшественника амилоида (Mo/HuAPP695swe) и мутированного человеческого PS1-dE9 в ЦНС под прионовым промотером мыши
TauP301S Tg(Thy1- MAPT*P301S)2541Godt	Таупатия	Мутация: <i>MAPT</i> : P301S - нейродегенерация в спинном мозге (6 месяцев) – снижение количества мотонейронов на 49%; - формирование филаментов с гиперфосфорилированной формой тау;
FUSΔ(1-359)	Моторная дисфункция (боковой амиотрофический склероз)	- высокий уровень экспрессии белка укороченной человеческой изоформы белка FUSΔ(1-359) под пан- нейрональным промоутером Thy1; - ранняя манифестация моторных дисфункций: 50-60 дней; - множество FUS-позитивных включений в спинном мозге различного размера, морфологии и локализации.

Линия: Тау^{P301S}

Наименовани:

Tg(Thy1-MAPT*P301S)2541Godt

Моделируемое заболевание:

Таупатия

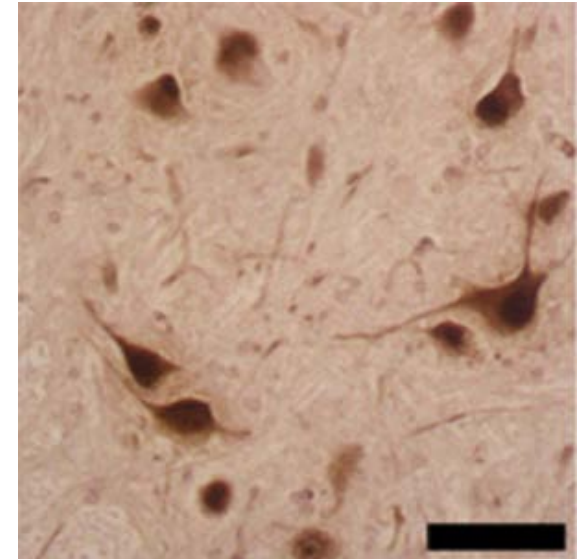
Мутации:

Ген *MAPT*: P301S



Фенотип 5-6 месячных животных:

- тяжелые парализации;
- нейродегенерация в спинном мозге (6 месяцев) – снижение количества мотонейронов на 49%;
- выраженные признаки **таупатии человека**;
- формирование филаментов с гиперфосфорилированной формой tau.



Гипер-фосфорилированный tau в нейронах спинного мозга

Линия: 5xFAD

Наименование:

Tg(APP^{S_w}Fl^{Lon},PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799^{Vas}

Моделируемое заболевание:

Болезнь Альцгеймера

Мутации:

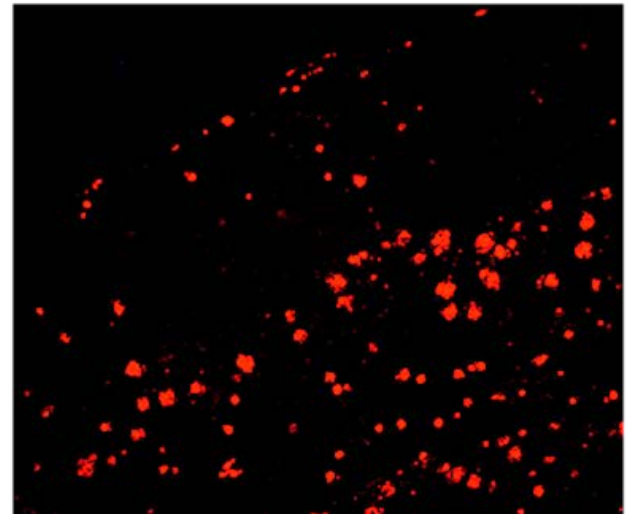
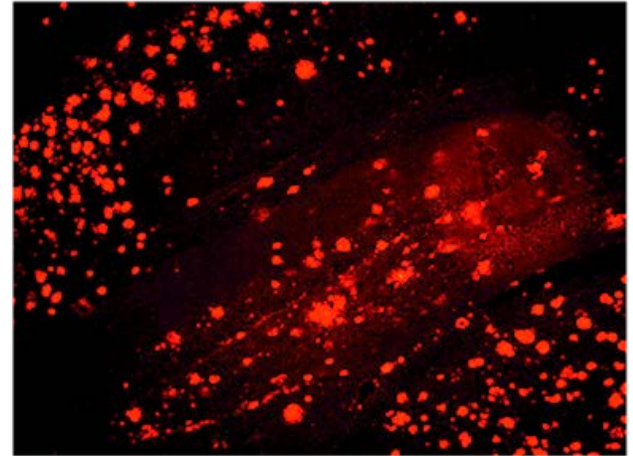
Ген *APP*: K670N/M671L; I716V; V717I

Ген *PS1*: M146L; L286V

Патологический фенотип:

- амилоидные отложения, глиоз, нейродегенерация, нарушения памяти;
- накопление внутриклеточного A β и выраженная гибель нейронов

Линия 5xFAD воспроизводит **основные признаки амилоидоза** характерного для БА и может быть использована как модель A β -индуцированной нейродегенерации и формирования амилоидных бляшек



Соматосенсорная кора (вверху) и зубчатая извилина (внизу), возраст 15-месяцев, окраска Конго красным.

Линия: $\Delta FUS(1-359)$

Моделируемое заболевание:

Боковой амиотрофический склероз

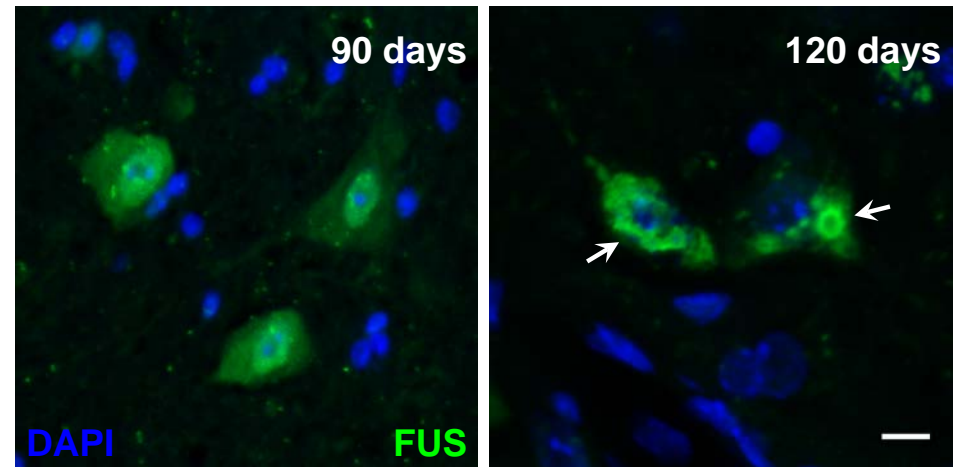
Мутации:

Ген *FUS* трунктированная форма

FUS – высоко-консервативный ядерный РНК/ДНК-связывающий белок. При БАС выявляются цитоплазматические и/или внутриядерные включения агрегатов мутантного *FUS*.

$\Delta FUS(1-359)$ фенотип:

- ранняя манифестация: 60-90 дней;
- множество *FUS*-позитивных включений в спинном мозге различного размера, морфологии и локализации



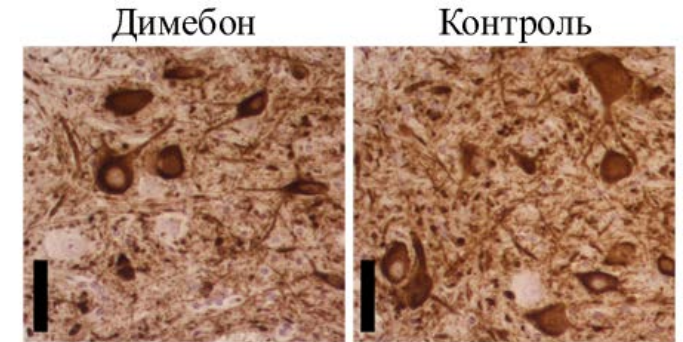
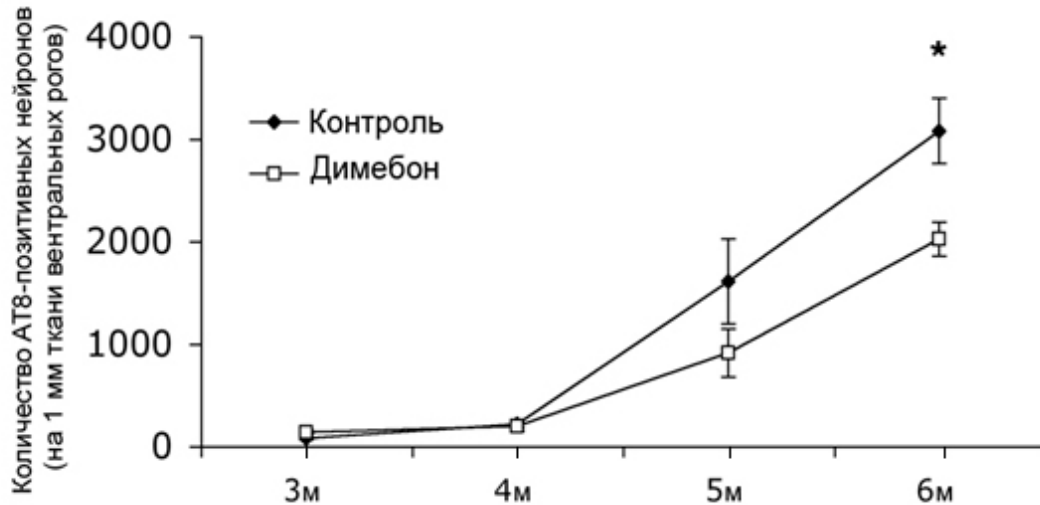
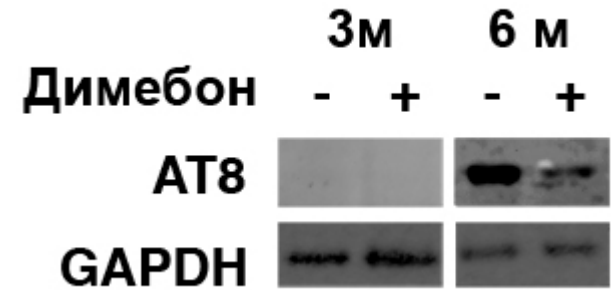
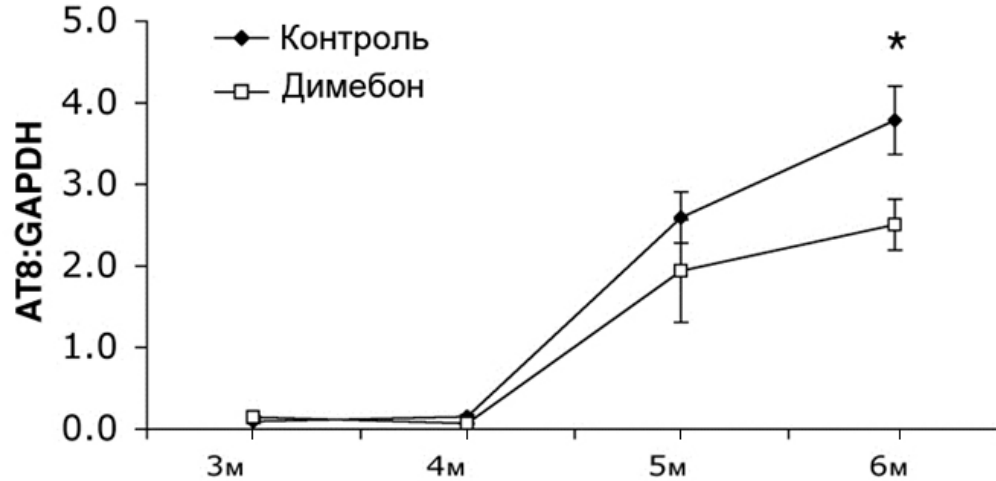
FUS-позитивные включения образуют патологические белковые включения в спинном мозге мышей.

Задача: Использовать трансгенные тест-системы для отбора соединений способных влиять на протеинопатию

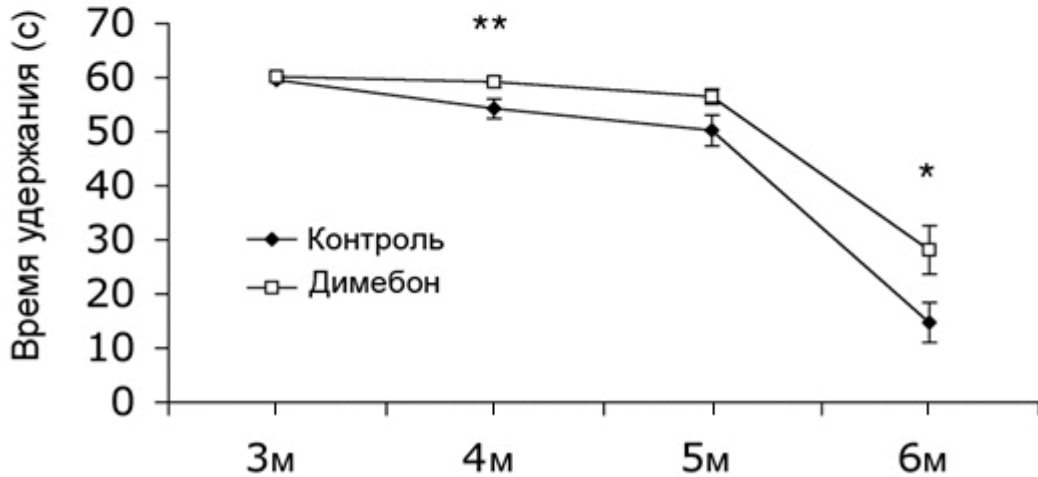
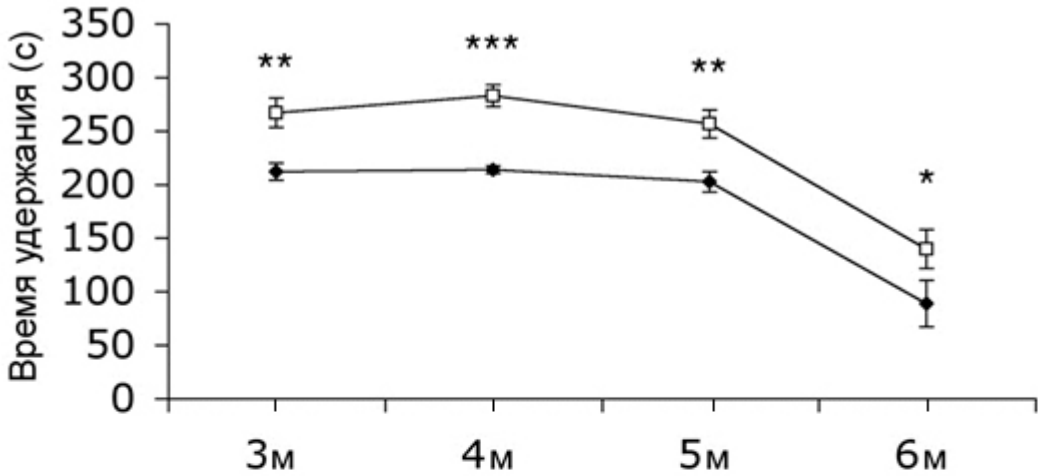
- Ustyugov A, Shevtsova E, Bachurin S. Novel Sites of **Neuroprotective Action of Dimebon (Latrepidine)**. Mol Neurobiol. 2015 Oct;52(2):970-8.
- OM Peters, N Connor-Robson, VB Sokolov, AYu Aksinenko, MS Kukharsky, SO Bachurin, N. Ninkina, VL Buchman. **Chronic administration of Dimebon ameliorates pathology in TauP301S transgenic mice**. J Alzheimers Dis. 2013;33(4):1041-9.
- SO Bachurin, TA Shelkovnikova, AA Ustyugov, O Peters, I Khritankova, MA Afanasieva, TV Tarasova, II Alentov, VL Buchman, NN Ninkina. **Dimebon slows progression of proteinopathy in γ -synuclein transgenic mice**. Neurotox Res. 2012 Jul;22(1):33-42.
- Устюгов АА, Шелковникова ТА, Кохан ВС, Хританкова ИВ, Петерс О, Бухман ВЛ, Бачурин СО, Нинкина НН. (2011). «Димебон» снижает содержание агрегированных форм амилоидогенного белка в детергент-нерастворимых фракциях *in vivo*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Т. 152(12), р. 675-678.
- M. Yamashita, T. Nonaka, T. Arai, F. Kametani, VL Buchman, N Ninkina, SO Bachurin, H Akiyama, M. Goedert, M. Hasegawa. **Methylene blue and Dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models**. FEBS Lett. 2009 Jul 21;583(14):2419-24.

Известия Академии наук. Серия химическая, 2020, 4. с. 781-786

Линия Тау^{P301S}: Количество гиперфосфорилированного tau снижается при многократном введении Димебона

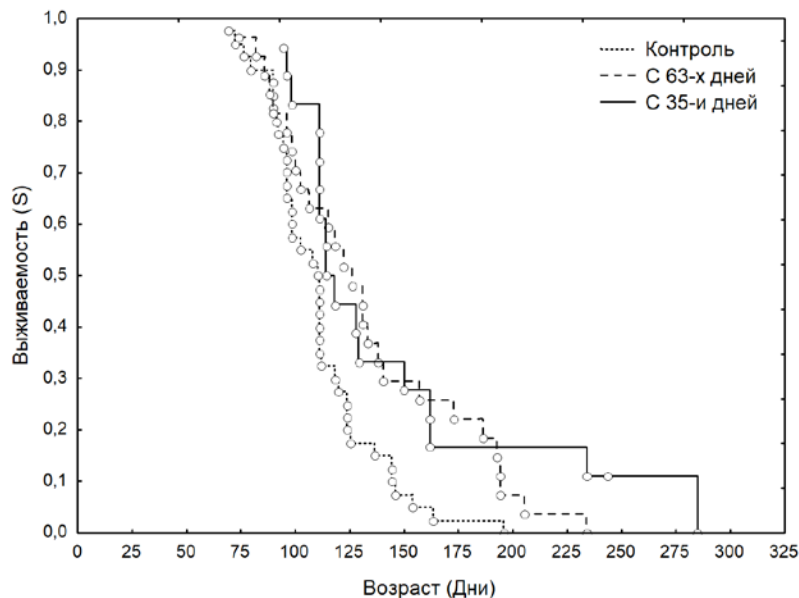


Линия Тау^{R301S}: Анализ моторной функции



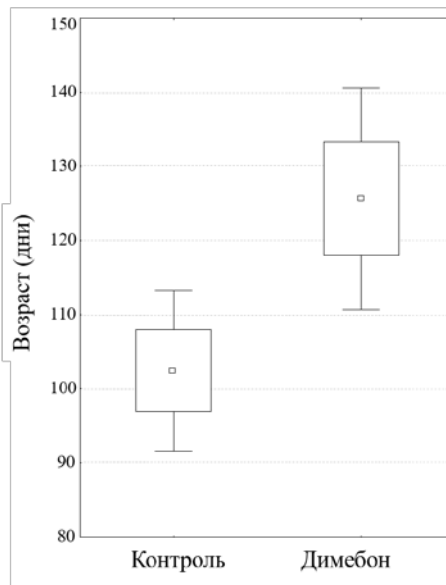
Линия Δ FUS(1-359): многократное введение Димебона отдаляет дебют заболевания в модели FUS-протеинопатии (БАС)

Сравнение кривых выживаемости

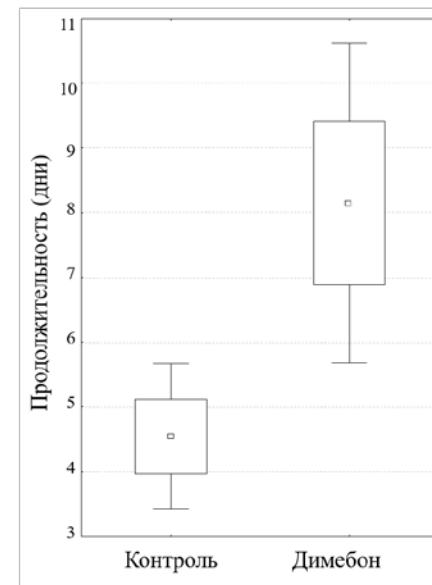


Димебон в дозе **11 мг/кг с возраста 35** (n=18) и **63 дней** (n=27), контрольная группа (n=40).

Средний возраст начала симптомов



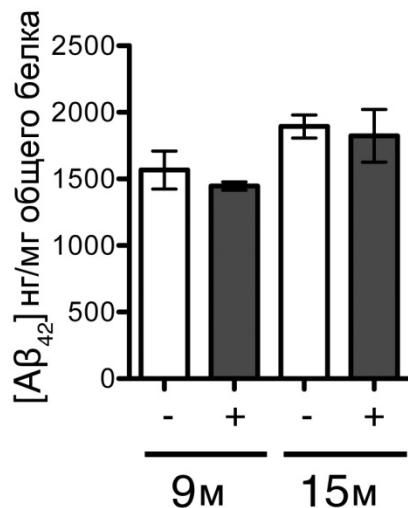
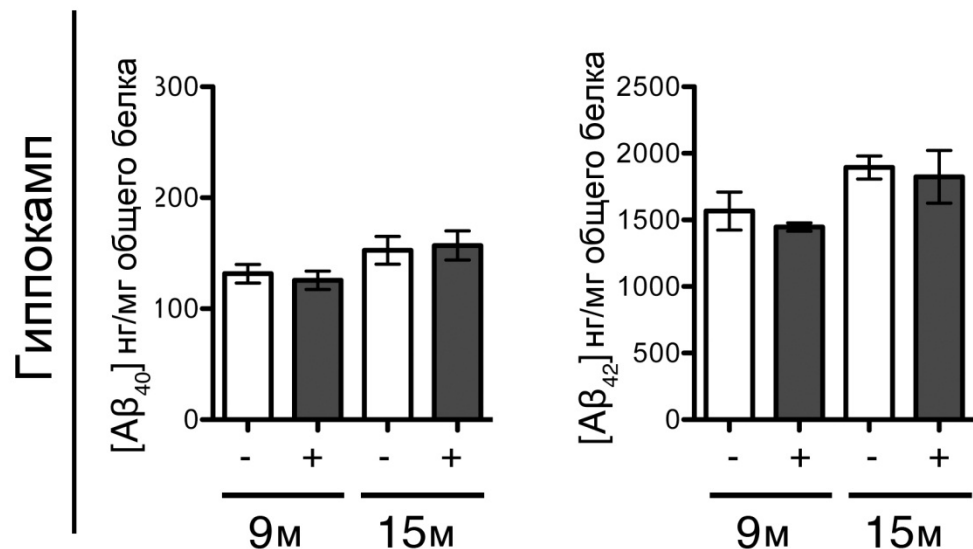
Продолжительность симптоматической фазы



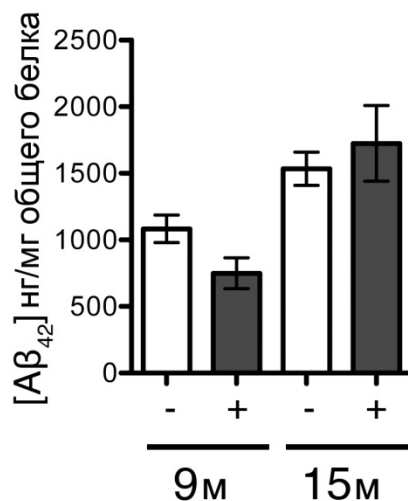
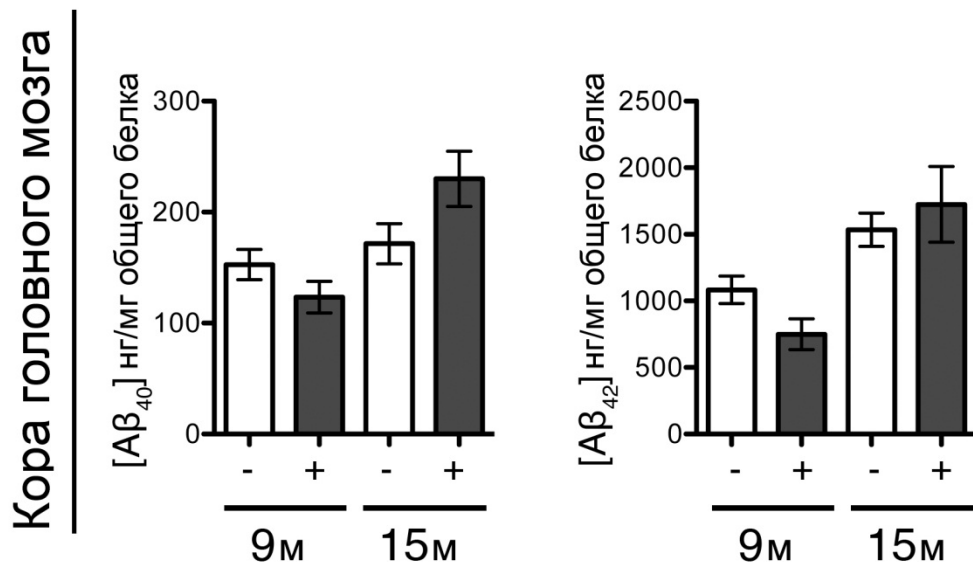
Манифестация клинических симптомов у трансгенных животных, получавших Димебон с **возраста 63 дня** (n=27) и контрольной группы (n=40)

Эффективность препарата напрямую зависит от возраста начала терапии:
чем раньше начало ведения, тем сильнее эффект

Линия 5xFAD: многократное введение Димебона не оказывает влияния на концентрацию А β -пептидов

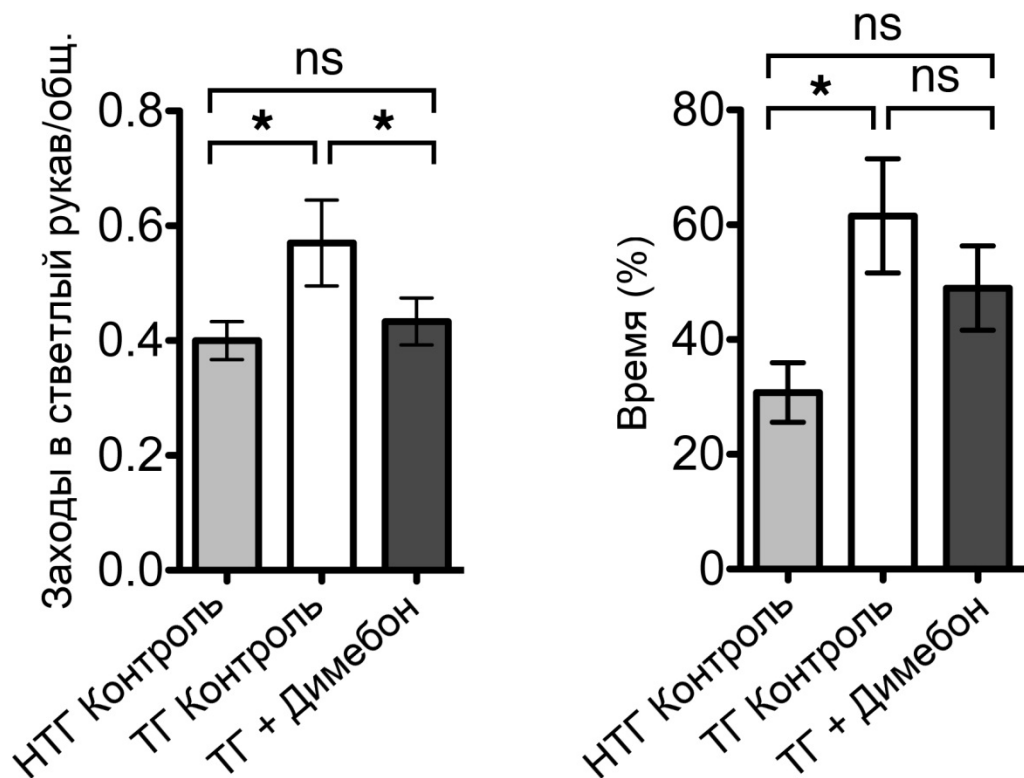


Димебон не оказывал существенного влияния на концентрацию амилоидных пептидов (A β 42, A β 40) в гиппокампе мышей линии 5xFAD



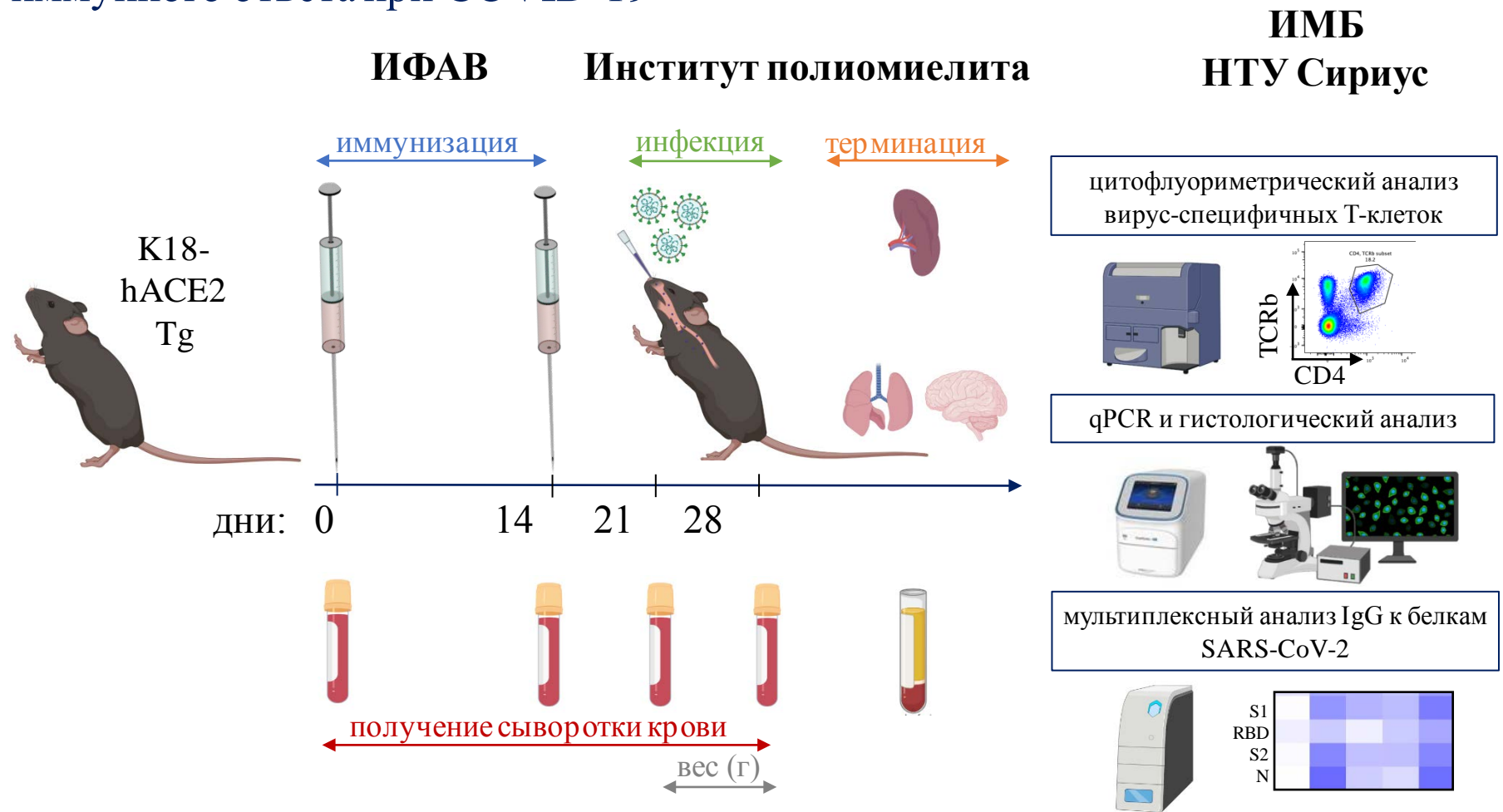
В коре наблюдалось снижение концентрации A β -пептидов на 9-ом месяце наблюдения и повышение концентрации 15-ом месяце

Линия 5xFAD: многократное введение Димебона приводит к коррекции когнитивных функций



Введение Димебона улучшает показатели памяти в крестообразном лабиринте, но не нормализует их до уровня нетрансгенных (контрольных) мышей.

Линия ACE2: мыши с гуманизацией гена ACE2 как модель для изучения иммунного ответа при COVID-19



- В **ИФАВ РАН** содержится в SPF-статусе линия трансгенных мышей, чувствительных к SARS-CoV-2
- Инфекционные опыты выполняются в сотрудничестве с **Институтом полиомиелита РАН**
- В **ИМБ РАН** проводится иммунизация животных и анализ Т-клеточного ответа
- Анализ антительного ответа – в **НТУ Сириус**

Заключение

1. Использование животных моделей нейродегенеративных болезней значительно оптимизирует поиск перспективных препаратов.
2. «Репозиционирование» известных ранее лекарств на новое применение позволяет сократить этап разработок и срок выведения на рынок.
3. Использование биоресурсных центров позволяет поддерживать высокую доступность и большое разнообразие животных моделей, а значит способствует эффективному поиску новых перспективных лекарств.

Наши коллеги и партнёры

Зарубежные партнёры



Cardiff University



National Tsing Hua University



Université Clermont Auvergne



Cuban Neuroscience Center

Отечественные компании



НИИ и ВУЗы

- Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
- Институт биологии гена РАН
- Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
- Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
- Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого
- НТУ «Сирius»
- Казанский государственный медицинский университет
- Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей
- Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
- Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
- Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина
- НИЦ «Курчатовский институт»
- Пермский государственный национальный исследовательский университет

Благодарности



Российский
научный
фонд



Алексей Устюгов

alexey@ipac.ac.ru

+7 910 465 1008

<http://cdi.ipac.ac.ru>

Бачурин С.О., Броновицкий Е.В.,
Бухман В.Л., Вихарева Е.А.,
Григорьев В.В., Дейкин А.В.,
Кухарский М.С., Лысикова Е.А.,
Мазин П.В., Малеев Г.В., Мальцев
А., Морозов А.В. Небогатиков В.О.,
Нинкина Н.Н., Овчинников Р.К.,
Перина С.А., Резвых А., Тетерина
Е.В., Фуников С.Ю., Хританкова
И.В., Чапров К.Д., Чичёва М.М.,
Шевцова Е.Ф.