

Дэвид Лилликрэйп    Здравствуйте, меня зовут Дэвид Лилликрэйп. Я профессор кафедры патологии и молекулярной медицины в Королевском университете Канады. Я хочу представить вам серию слайдов, посвященных генной терапии при гемофилии. Обучающая цель этой презентации — рассказать о генной терапии, а также представить ее основные термины и понятия.

Эта история началась более 65 лет назад, на этом слайде изображены Френсис Крик (справа) и Джеймс Уотсон (слева) рядом с прекрасной моделью двойной спирали ДНК, которую они описали в Кембридже в 1953 году.

Перенесемся в начало 1980-х годов, когда был описан первый из генов факторов свертывания крови. Это статья из раздела «Новости и обзоры», опубликованная в журнале Nature моим наставником Артуром Блумом, о преимуществах экспериментов по клонированию с углубленным пониманием патогенеза нарушений свертывания крови, методов диагностики и, в конечном счете, связанная с настоящей презентацией о генной терапии.

Принцип действия генной терапии относительно прост. Эта терапия подразумевает доставку в клетки терапевтического трансгена, где ДНК включается в ядро. Затем ядро экспрессирует мРНК, которая транслируется в белок, и этот терапевтический белок либо остается внутри клетки, либо выделяется из клетки и циркулирует в организме в крови с соответствующим терапевтическим эффектом.

Прежде чем я продолжу подробное описание методик генной терапии, важно отметить, что в настоящее время ее применение ограничено генной терапией соматических клеток. То есть мы либо доставляем здоровый ген, либо восстанавливаем гены в клетках того или иного человека, и это не приносит пользы следующим поколениям. Генная терапия соматических клеток ограничена отдельным человеком, и мы не намерены модифицировать или изменять ДНК половых клеток.

На этом слайде вы видите список заболеваний, которые всегда были подходящими потенциальными объектами для генной терапии. Это моногенные заболевания, то есть клинический фенотип обусловлен преимущественно дефектами одного гена, и вы видите, что в этом списке присутствует и гемофилия. Она здесь именно потому, что нам известно о том, что даже небольшое увеличение количества белка фактора свертывания крови дают значительные клинические преимущества. Белок секретируется из клетки, поэтому он просто должен попасть в кровоток. Четкая экспрессия белка не является необходимой, и у нас есть очень хорошие доклинические модели, на



которых мы можем проверить эти стратегии генной терапии, — мыши и крупные животные.

На этом слайде показано, что существует четыре возможных варианта генной терапии соматических клеток. Первый из них — это исправление мутаций. На этом я подробнее остановлюсь на следующем слайде. Далее у нас есть возможность доставки трансгенов посредством невирусного переноса генов. Это теоретически возможно, но еще далеко от клинического применения. Затем — генная терапия на основе клеток, и об этом я также подробнее расскажу на следующем слайде, и наконец, — перенос генов на основе вирусного вектора, то есть именно та стратегия, которая использовалась во всех текущих исследованиях генной терапии человека при гемофилии.

Данный слайд описывает проблему возможного изменения генов или восстановления генов с помощью стратегий редактирования генов. В левой части слайда вы видите возможность гомологичной рекомбинации как способа восстановления генов. Это теоретически возможно, но данный процесс не слишком эффективен. В правой части слайда вы видите ряд различных подходов, основанных на редактировании нуклеаз. Итак, слева направо, это цинк-пальцевые нуклеазы, медиаторные стратегии, основанные на TALEN (эффекторных нуклеазах, подобных активаторам транскрипции) или CRISPR (коротких палиндромных повторах, регулярно расположенных группами), подразумевающие основанные на белках или нуклеиновых кислотах способы доставки нуклеазы в область генома, где происходит двухцепочечный разрыв. Теперь посмотрите на нижнюю часть слайда — этот двухцепочечный разрыв изменяется или восстанавливается по-разному. Эти исследования в настоящее время потенциально пригодны для использования — они как раз переходят в стадию клинических испытаний. Но я считаю, что в отношении гемофилии это может быть реализовано *in vitro* и на животных, ведь все-таки этот метод еще далек от клинического применения.

Каковы элементы стратегии генной терапии? Они перечислены на этом слайде. Я расскажу о терапевтическом трансгене, о системе доставки и подходящей клетке-хозяине, а затем — об измерениях, метриках результатов для экспрессии трансгенного протеина.

Как выглядит трансгенная кассета? Обычно она содержит кодирующую последовательность ДНК или последовательность кДНК, в которой отсутствуют интроны. Большинство из этих кДНК имеют размер от 2 до 7 килобаз, и я расскажу о двух способах, которыми можно изменить кодирующую последовательность, во время показа следующего слайда.



Оптимизация кодонов, описанная на этом слайде, представляет собой изменение нуклеотидной последовательности, то есть триплетов нуклеотидов, которые кодируют аминокислоты, но в аминокислотной последовательности изменений не происходит. Целью этой конкретной стратегии является повышение скорости транскрипции мРНК, оптимизация процессинга мРНК и сплайсинга любых оставшихся интронов и, наконец, согласование трансляции мРНК с обилием транспортных РНК, которые присутствуют в целевой клетке-хозяине.

Две другие группы элементов, присутствие которых необходимо в трансгенной кассете, — это некоторые регуляторные элементы в 5 конце трансгена. Это промоторные элементы, которые могут регулироваться в зависимости от типа клетки, того или иного типа развития или даже индуцироваться лекарственным средством, а затем более отдаленные элементы, которые необходимы для усиления экспрессии генов, так называемые энхансеры, которые, опять же, как правило соответствуют определенному типу клеток-хозяев.

На другом конце трансгенной кассеты находится тройная последовательность, которая обычно используется для стабилизации информационной РНК, кодируемой последовательностью кДНК.

Следующие два слайда посвящены общим стратегиям доставки трансгенов. Первый из них описывает прямой перенос гена *in vivo*, при котором трансген доставляется часто либо методом внутривенной инфузии, либо, возможно, методом, подобным внутримышечной инъекции. Преимущества этого метода состоят в практичности и простоте, минимальных затратах времени как врача, так и пациента. Его недостатком является то, что *in vivo* векторная система доставки подвергается иммунному ответу хозяина, и это может создавать некоторые трудности, о чем мы поговорим позже. Во-вторых, имеется переменная эффективность целевого воздействия, при котором трансген доставляется в некоторые типы клеток, которые вы предпочли бы не затрагивать.

Вторая стратегия доставки трансгенов показана на этом слайде. Она называется непрямой переносом или переносом генов *ex-vivo*, когда трансген доставляется вне организма. В левой части слайда показано, что первое, что нужно сделать, — это собрать или изолировать аутологичные, долгоживущие клетки-предшественники или стволовые клетки от пациента. После того как эти клетки будут выделены, вы доставляете нормальную копию гена, который является мутантным в организме пациента, или вы можете редактировать мутантный ген, который присутствует в клетках пациента. Далее, эти генетически модифицированные клетки культивируют, а затем снова вводят в



организм пациента, где они находят себе место и производят нормальный фактор (в случае гемофилии — нормальный фактор свертывания крови), который отсутствует в клетках пациента.

У данной системы доставки имеется ряд преимуществ и недостатков. Плюсы в том, что нет векторного воздействия *in vivo* — это иммунологически важно и является преимуществом. Существует прямая нацеленность на соответствующие клетки, поэтому единственные клетки, которые видят вектор нового трансгена, — это клетки, которые были собраны и доступны вне организма. Недостатки этой системы заключаются в трудоемкости процедуры. Она требует использования специальных средств. Также важно и то, что она требует процесса подготовки хозяина, чтобы освободить место для генетически модифицированных клеток, которые затем могут быть успешно имплантированы.

Все современные исследования в области генной терапии гемофилии включают перенос генов на основе вирусных векторов, и всего использовалось три типа вирусов: аденовирусы, ретровирусы и аденоассоциированные вирусы.

Аденовирусу в этой презентации посвящен всего лишь один слайд. Один пациент проходил лечение с использованием этой системы вирусных векторов. Она очень эффективна в трансдуцировании реплицирующихся и не реплицирующихся клеток, и получить достаточно большие количества этого вектора относительно легко. Существенными недостатками аденовирусного переноса генов является значительный врожденный иммунный ответ, связанный с этими векторами. Таким образом, мы получаем повышение уровня провоспалительных цитокинов, токсичность для печени, тромбоцитопению, в крайних случаях может развиваться синдром системного воспалительного ответа, который иногда может приводить к смертельным случаям. Эта система в ее нынешнем виде для доставки генов при лечении пациентов с гемофилией не используется.

Вторая система доставки на основе вирусов — это система передачи генов, опосредованная лентивирусами, и она исследуется рядом групп для последующего клинического использования при лечении гемофилии. Лентивирусные векторы трансдуцируют как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Емкость вектора, то есть размер трансгенной вставки, достаточно невелика и составляет максимум около 8 килобаз. Наблюдаются незначительные врожденные иммунные ответы. Преимущество лентивирусной системы заключается в наличии стабильной геномной интеграции, которая, по-видимому, является



случайной и не онкогенной по природе, по крайней мере, судя по многочисленным исследованиям, проведенным на животных.

Наконец, третья из вирусных векторных систем представляет собой аденоассоциированный вирус. На данном электронном микроснимке вы видите множество мелких частиц AAV (аденоассоциированного вируса). Ближе к центру слайда видна одна большая аденовирусная частица. Данная вирусная векторная система используется во всех современных исследованиях генной терапии гемофилии.

AAV, как я буду называть этот вирус далее, является непатогенным парвовирусом человека. Он имеет одноцепочечный геном ДНК, который показан в верхней части этого слайда. Его размер составляет 4,7 килобазы. В нем имеется две кодирующие области, гер-ген и сар-ген, а геном с обоих концов ограничен инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями. Данная система вирусных векторов индуцирует минимальную врожденную иммуногенность. Существует много различных серотипов, которые представлены вариациями капсидного белка. Весьма незначительная доля рекомбинантного вектора интегрируется в геном хозяина, и большая часть вектора существует в виде стабильных внехромосомных кольцевых конкатемеров.

Слайд посвящен тому, как осуществляется конвертация генома AAV дикого типа в геном терапевтического вектора AAV. Мы удаляем оба гена — гер и сар — и вы видите, что на второй диаграмме ниже показано, что векторный геном AAV имеет терапевтический ген с правой стороны и промотор или регуляторную последовательность, которая управляет экспрессией в определенном органе или типе клетки. На этом слайде показано, что это специфичный для печени промотор, который будет управлять экспрессией этого трансгена в гепатоцитах. В настоящее время в том, что касается гемофилии, это затрагивает все векторы. В нижней части слайда вы видите, что вставки трансгена варьируются в зависимости от фактора IX, где размер кДНК составляет около 1,3 килобазы, а для фактора VIII, удаленного из В-домена, около 4,7 килобазы, после удаления кодирующей последовательности В-домена.

Как получить векторную частицу AAV? Это показано на слайде. В верхней части слайда вы видите последовательность трансгенной нуклеиновой кислоты с последовательностями ITR, которые были сохранены на концах 5 и 3 трансгена. Промоторная последовательность и трансгенный ген расположены посередине, затем они вставляются в капсид вектора AAV с получением векторной частицы AAV, и именно эти



частицы в качестве терапевтического материала вводятся в печень пациента.

Здесь это проиллюстрировано более подробно. Итак, вы видите, что частица взаимодействует с мембраной клетки-хозяина. Для AAV взаимодействие с определенными формами рецепторов проработано достаточно хорошо, но в наших знаниях имеются и кое-какие пробелы. Частица попадает в эндосому внутри клетки. В конце концов частица высвобождается из эндосомы, капсидный белок расщепляется и экспрессируется на поверхности трансдуцированного типа клеток, а транскрипционная нуклеиновая кислота остается в ядре, где она либо существует в виде внехромосомных конкатемеров, либо в некоторых случаях — к AAV это относится в меньшей степени — интегрируется в ДНК клетки-хозяина.

Итак, если собрать все эти данные вместе для лечения гемофилии, компоненты стратегии переноса гена будут включать терапевтический трансген, который представляет собой последовательность кДНК дикого типа или модифицированного фактора IX, и последовательность фактора VIII, удаленного из домена В. Нам нужна стратегия доставки, которая в настоящее время связана с аденоассоциированным вирусом, хотя, как я уже говорил, есть исследования, касающиеся лентивирусных препаратов, которые все еще находятся на ранней стадии разработки. Нам необходимо доставить вирус в принимающую клетку-хозяина, и в настоящее время это клетка печени, затем нам необходимо выяснить, подтверждает ли статистика успешность проведенных нами исследований. Сюда входит измерение уровней факторов свертывания в плазме, учет ежегодных показателей кровотечений и потребления экзогенного фактора VIII пациентами. При этом, конечно, вам также нужно принимать в расчет соображения безопасности.

На этом слайде представлена версия цикла Гартнера («Цикла зрелости технологий») для генной терапии. Пройдемся слева направо по слайду. Итак, начало разработки этих технологий пришлось на 1970-е годы, и вот здесь, на вершине пика, вы видите, что к 1990–1995 годам мы поверили, что генная терапия может творить чудеса, и действительно, некоторые формы наследственных иммунодефицитных расстройств, такие как дефицит ADA, удалось вылечить с помощью генной терапии. Однако в 1999 году произошла катастрофа, когда пациент Джесси Гелсингер, получавший лечение аденовирусной генной терапией, скончался от системного воспалительного процесса, что стало причиной огромного разочарования в разработке стратегий генной терапии.

Тем не менее в течение следующего десятилетия, с 2000 по 2010 год, фундаментальная научная работа, посвященная разработке векторов и



более глубокому изучению иммунного ответа на генную терапию, привела к тому, что в настоящее время можно назвать плато продуктивности. Для гемофилии первые результаты появились примерно в 2010–2011 годах, когда впервые стал наблюдаться долгосрочный клинический успех генной терапии при лечении гемофилии и в стратегиях генной терапии было задействовано большое количество биофармацевтических препаратов. И вот уже в 2019 году мы являемся свидетелями начала ряда клинических исследований фазы 3 лечения как гемофилии А, так и гемофилии В.

Это последний слайд из серии, в нем описывается перспектива генной терапии гемофилии. На слайде вверху описано влияние на систему гемостаза замены фактора, замены фактора с длительным периодом полувыведения, нефакторной терапии, справа на слайде представлены будущие возможности развития генной терапии. В нижней части слайда вы видите уровни фактора свертывания, которые можно измерить в системе кровообращения. Итак, если вы обратите внимание на данные слева, вы увидите, что имеются периодические пики и падения уровней содержания факторов, которые соответствуют улучшениям и ухудшениям состояния гемостаза. Это происходит из-за периодов полувыведения белков в кровотоке.

Некоторых преимуществ удалось добиться после увеличения периода полувыведения факторов, с факторами EHL, и вы можете увидеть это из второго набора данных, результатов гемостаза и результатов с уровнями фактора. Затем, двигаясь дальше вправо, к нефакторной терапии, мы увидим, что эти факторы не улучшают уровни факторов свертывания, потому что не используют обычные факторы свертывания в кровотоке, но улучшают общие уровни гемостаза, и это проиллюстрировано в верхней части графика.

Затем, из правой части слайда, мы узнаем, чего можно достичь с помощью генной терапии. В общем и целом, генная терапия обещает поднять уровни отдельных факторов свертывания, фактора IX и фактора VIII, до терапевтически значимых уровней, и они будут сохраняться из-за продолжительной экспрессии фактора IX или фактора VIII в результате доставленных терапевтических трансгенов, которых должно быть более чем достаточно для обеспечения долгосрочной поддерживающей профилактики, потребность замены фактора свертывания крови возникает редко.

