

Гленн Пирс: Здравствуйте, меня зовут Гленн Пирс. Я вице-президент по медицинским вопросам Всемирной федерации гемофилии. Я долгое время изучаю генную терапию гемофилии и участвую в ее разработке. Сегодня мы с вами поговорим об альтернативных стратегиях и целях генной терапии в лечении гемофилии. Наши задачи во время сегодняшней беседы — проанализировать преимущества и недостатки применения аденоассоциированных вирусов и рассмотреть альтернативы этому подходу.

Концепция генной терапии появилась почти 50 лет назад, когда Тед Фридман опубликовал статью в журнале «Science», в которой описал возможности генной терапии болезней у людей. Это произошло немногим позже открытия ДНК и РНК и их функций. В своей статье он поднял сложные научные и этические вопросы, и сегодня мы по его примеру рассмотрим некоторые из них при обсуждении редактирования генов.

А сейчас мы перенесемся почти на 50 лет вперед и зададим себе вопрос: с чем же связано применение AAV-векторов для генной терапии гемофилии. Ответ заключается в том, что они работают. Но путь этот занял 25–30 лет и сопровождался многочисленными неудачами. На сегодняшнем этапе развития науки AAV-векторы представляют собой наиболее целесообразный подход к лечению пациентов с гемофилией как с фактором VIII, так и с фактором IX.

В целом эта методика имеет хорошие показатели безопасности, использовалась при различных состояниях больных и была опробована в многочисленных клинических испытаниях. Мы обсудим многие вопросы, включая вариативность и долговечность реакции, а также тот факт, что, возможно, почти половина пациентов имеет предсуществующий иммунитет к различным серотипам AAV. Серотипы — это частицы AAV, которые тесно связаны друг с другом, но ушли так далеко от первоначального AAV,

что стали способны заражать различные ткани в организме. Итак, мы использовали целый ряд этих серотипов AAV для генной терапии, и все они имеют некоторые признаки предшествующего воздействия, вызывающего реакцию антител, что препятствует их применению у пациентов, имеющих положительные реакции. Такой иммунный ответ, который мы наблюдаем перед введением AAV, значительно усиливается после введения AAV, что исключает введение повторной дозировки.

Очень высокие титры антител являются результатом применения генной терапии AAV. AAV представляет собой один из самых мелких вирусов, способных инфицировать человека, и поэтому даже после удаления генов AAV остается не так много места. Например, ген фактора VIII с делецией домена В практически не вписывается в AAV. Так что имеются ограничения и по размеру. AAV может вызвать некоторую случайную



интеграцию, которая не слишком четко определена и недостаточно изучена,

что заставляет нас поставить под вопрос долгосрочную безопасность. И наконец, последняя проблема, связанная с AAV, заключается в том, что мы вводим пациентам триллионы вирусных геномов, но очень малая часть из них приводит к выработке полезных для терапии белков. Все это говорит о том, что AAV является рабочим вирусным вектором, способным дать нам терапевтический эффект при гемофилии.

Но что можно сделать для улучшения векторов AAV? Мы только что рассмотрели все эти вопросы, связанные с использованием AAV, и было предложено много решений, хотя большинство из них на самом деле еще не опробованы. Это важный вопрос не только потому, что клинические испытания уже приближаются к фазе 3, а также и потому, что организуются новые испытания, которые могут показать улучшение векторов AAV, эффективность трансдукции и тому подобное. Итак, все эти потенциальные

решения изучаются, но не в том темпе, который позволил бы им войти в первое поколение генной терапии AAV, которое может получить одобрение уже в 2020 или 2021 году. Если мы посмотрим на векторную трансдукцию гепатоцитов AAV, то на первой схеме видно, что наличие антител к AAV от уже существующей естественной инфекции

препятствует попаданию AAV в целевую клетку. И поэтому генная терапия не принесет результата. В отсутствие антител (схема 2) AAV может связываться со специфическими рецепторами клеточной поверхности и подвергаться эндоцитозу через обычные механизмы рецепторного трансцитоза. Оказавшись в клетке, AAV может столкнуться с врожденным иммунитетом, потому что в конце концов наши клетки предназначены именно для защиты от вирусной инфекции.

И, когда AAV используется в качестве терапевтического средства, именно так и происходит. Но с достаточным количеством AAV можно избежать этого противодействия. В цитоплазме ДНК проникает в ядро, где в конечном итоге образует эписомы, которые являются устойчивыми замкнутыми петлями, способными использовать механизм хозяина для транскрипции и трансляции белка, который затем может секретироваться. Сам капсид

попадает в эндоплазматический ретикулум или сталкивается с основными антигенами класса I гистосовместимости. Некоторые из них могут быть способны направленно связываться с капсидными пептидами, и в этом случае они распределяются на поверхности клетки, где они могут стимулировать специфические антикапсидные цитотоксические Т-клетки CD8. Это может затем приводить к разрушению клетки, содержащей трансген. Итак, мы решаем вопросы

эффективности, изменчивости, долговечности как функции всех этих сложных процессов, происходящих внутри клетки. Что мы можем



сделать с предсуществующим иммунитетом? Некоторые ученые исследуют иммуноадсорбцию на животных. Это связано с использованием колонки, такой как колонка белка G или колонка белка A, способной адсорбировать иммуноглобулин IgG у пациента, у которого могут быть высокие титры

анти-AAV. Это временный эффект. Он продолжается не слишком долго, но и этого может оказаться достаточно для снижения титра, что позволит вводить AAV и доставлять трансген к генам-мишеням. Продолжается изучение эффективности удаления IgG, поскольку у ряда пациентов необходимо будет удалить значительные количества антител IgG, чтобы позволить

нацелиться на гепатоцит. Затем возникает вопрос о внутриклеточной токсичности после доставки AAV. Известно, что у ряда пациентов наблюдается повышение уровня трансаминаз в печени. Это кратковременный подъем, в большинстве случаев не очень значительный, возможно, в полтора-два раза выше нормы. Тем не менее это вызывает некоторое беспокойство, потому что повышение уровня трансаминаз в печени указывает на гибель гепатоцитов.

Каковы возможные причины повышения уровня ферментов печени? Существует три гипотезы и, возможно, одна или несколько из них влияют на гепатоциты отдельных пациентов. Во-первых, это негативное влияние очень высокой дозы капсида AAV. В клетки поступает очень много капсида, потому что много вводится внутривенно. А клетка должна переработать этот капсид. Ей приходится расщепить его до составляющих

аминокислот. И для этого клетке требуется значительное количество энергии. Кроме этого, существует проблема с цитотоксическими Т-клетками, которую я только что описал. И третья возможность — то, что известно как реакция несвернутых белков. И она в большей степени относится к фактору VIII. Уже несколько лет назад ученые выяснили, что клеткам очень сложно вырабатывать белок фактора VIII. Это сложный белок, один из самых крупных в организме.

И даже если мы используем фактор VIII с делецией домена В, на клеточных культурах было показано, что клеткам очень трудно его вырабатывать и это может вызвать токсичность в этих клетках. Эта токсичность может также привести к гибели клеток и, конечно, к потере экспрессии белка фактора VIII. Таким образом, мы перечислили все области, которые еще недостаточно изучены и которые необходимо исследовать, чтобы получить ответы на некоторые из поставленных выше вопросов и накопить потенциал

для решения имеющихся проблем. На графике в левом верхнем углу представлен пример повышения уровня трансаминаз в печени. Здесь же видно одновременное развитие цитотоксических Т-клеток CD8, которые специфичны для капсида AAV, что вызывает гибель и разрушение



клеток. Внизу мы наблюдаем различные иммунные реакции, которые могут возникать в ответ на

трансдукцию и трансгенную экспрессию. Мы видим Т-клетки CD8, которые могут атаковать гепатоцит, содержащий трансген. Мы также видим, что могут быть активированы Т-клетки CD4, клетки-помощники. Они важны для генерации мощного ответа антител на капсид AAV, исключая следующее повторное введение дозы. Таким образом, в настоящий момент не принимаются почти никакие меры, направленные на исследование этих трех критических проблем,

связанных с капсидами, цитотоксическими Т-клетками и реакцией несвернутых белков. В этих областях требуется провести гораздо больше работы, чтобы выявить проблему у отдельных пациентов и групп пациентов. Какие же существуют альтернативы использованию AAV? Была проделана большая работа с вирусными и невирусными альтернативами лечения. Наиболее распространенными вирусами, используемыми при гемофилии, — это лентивирусы.

Лентивирусы — это производные ВИЧ. В них отсутствует ряд генов ВИЧ, и ген фактора III или фактора IX может быть вставлен так же, как и в случае с AAV. Ведется работа как *ex vivo* с гемопоэтическими стволовыми клетками, так и *in vivo*, когда в фокусе исследования — гепатоциты, с использованием лентивирусной доставки как фактора IX, так и фактора VIII на ряде доклинических моделей, в том числе крупных животных.

Другой подход заключается в том, чтобы вообще не использовать вирусы, что было бы идеальным решением. В течение 30 с лишним лет на предмет доставки нуклеиновых кислот, таких как ДНК, исследуются липидные наночастицы. Я говорил о том, насколько неэффективен AAV. Эти частицы еще менее эффективны при доставке генов в клетки. Тем не менее эти липидные наночастицы не генерируют иммунный ответ, поэтому можно делать повторные инъекции.

Если у пациента недостаточно высокий уровень фактора VIII или фактора IX, можно ввести его повторно, чтобы получить такой уровень, который бы оказывал лечебное действие. Другой подход, который действительно представляет собой будущее генной терапии, заключается в редактировании генов. Он подразумевает добавление гена непосредственно в хромосому с возможностью замены существующего гена. В случае гемофилии это не обязательно. Его можно просто добавить в хромосому.

В некоторых случаях гемофилии, если присутствует специфическая мутация, с помощью этой методики можно даже восстановить эндогенный ген. Как я уже сказал, редактирование генов представляет собой будущее генной терапии, поскольку позволяет исправить фенотип навсегда. Как только терапевтический ген попадает в хромосому, он будет продолжать экспрессировать белок в течение всей жизни клетки.



Если клетка делится, он перейдет в обе дочерние клетки. Так что это очень привлекательный подход, хоть и не вполне еще готовый

к клиническим испытаниям на людях, но изучаемый в доклинических моделях исследований гемофилии. И последний подход — это клеточная терапия. При клеточной терапии для доставки генов фактора VIII или фактора IX непосредственно пациентам с гемофилией использовался целый ряд различных типов клеток, как стволовых, так и гепатоцитов. На этом слайде показана диаграмма липидных наночастиц, доставляющих нуклеиновые кислоты.

Преобладающая часть работы проделана в этом отношении с небольшими молекулами РНК, такими как ингибирующие РНК. Но потенциально гены могут быть включены также и в эти липидные наночастицы. Была проделана большая работа, направленная на то, чтобы сделать их нетоксичными для клеток и позволить им воздействовать, например, на два гепатоцита. И поэтому мы с нетерпением ждем дальнейших исследований в этой области. Пока что мы не совсем готовы к клиническим испытаниям, но движемся в этом направлении.

Нам необходимо определить пути повышения эффективности экспрессии генов, используя этот подход. Он предлагает ряд преимуществ по сравнению с доставкой вирусным вектором. В чем заключается ключевое различие между лентивирусным и аденоассоциированным вирусом, вектором AAV? Ключевые различия между лентивирусными и AAV-векторами показаны на этой диаграмме. Они имеют различное происхождение. В одном случае они окружены липидной оболочкой — это лентивирусы.

В другом случае они не имеют оболочки и их белок может взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток. Емкость размещения лентивируса в два раза выше, чем для аденоассоциированных вирусов. И, как я уже говорил, лентивирус интегрируется в ДНК хозяина, а AAV в основном так не действует. Он по большей части остается вне хромосомы. Оба эти вируса могут трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки.

И как я уже упоминал, лентивирус дает постоянную коррекцию, тогда как AAV в форме эписом при делении клеток может быть утрачен. Если мы посмотрим на сравнение переноса генов лентивирусными и AAV-векторами, то эти процессы очень схожи. Это вирусы, которые в обоих случаях могут проникать в клетки через специфические рецепторы. В обоих случаях ДНК или, в случае лентивирусов, РНК должны попасть в ядро,

где оба эти вируса используют механизмы клетки-хозяина. Лентивирус использует механизм хозяина для превращения РНК в ДНК, а затем присоединяет эту ДНК к хромосоме. AAV использует механизм хозяина для получения одноцепочечной ДНК, превращения ее в двухцепочечную



ДНК, формирования эписомы или кольцевого фрагмента ДНК, где РНК может затем транскрибироваться для образования белка.

Таким образом, оба подхода могут быть эффективными и обеспечивать терапевтические уровни фактора VIII по крайней мере у животных, а в случае AAV — у людей. Редактирование генома при гемофилии включает подходы как *in vivo*, так и *ex vivo*. Давайте внимательнее рассмотрим редактирование генов. Благодаря редактированию генов, которое является относительно новой технологией, созданной в последние 5–8 лет, мы можем

включить новый ген непосредственно в хромосому, используя специфические бактериальные ферменты, которые могут открыть нашу ДНК и позволить новому гену внедриться в нее. Это обеспечивает постоянную коррекцию хромосомы. Если мы посмотрим на один из специальных методов редактирования генов, такой как CRISPR-Cas9, то увидим (в этом случае это выводы по презентации, представленной на собрании ISTH в июле 2019 года

Аланом Бруксом), что он способен разрезать ДНК хозяина, в данном случае ДНК гепатоцитов, и включать ген фактора с делецией домена В в хромосомы гепатоцитов и продуцировать мРНК, мессенджер РНК и секретлируемый фактор VIII. Это исследование было проведено на животных и показало, что уровни фактора VIII соответствуют терапевтическому диапазону.

Если мы теперь обратимся к подходам клеточной терапии, то увидим, что некоторые группы ученых использовали как стволовые клетки, так и зрелые гепатоциты для доставки генов фактора VIII или фактора IX. В данном случае, показанном на слайде, ген фактора VIII помещается в лентивирусный вектор. Этот лентивирусный вектор способен трансдуцировать мезенхимальные стволовые клетки, которые могут быть получены от хозяина.

Эти мезенхимальные стволовые клетки могут впоследствии быть дифференцированы по различным типам клеток, включая клетки костного мозга, а также гепатоциты. И, таким образом, потенциально в эти дифференцированные типы клеток можно вносить фактор VIII. Это может быть сделано аутологичным способом, то есть стволовые клетки могут быть взяты у пациента и подвергнуты соответствующей манипуляции *ex vivo*, а затем возвращены с геном фактора VIII обратно пациенту, где они могут секретировать белок фактора VIII.

Этот опыт был проведен на животных и фактически на людях, хотя и не так успешно, но почти 20 лет назад вышла статья Рота и его коллег, в которой показано, что они отбирали фибробласты из биопсии кожи, выращивали их *in vitro*, добавляли ген фактора VIII, а затем повторно имплантировали их в полость брюшины. Они отмечали незначительное повышение активности фактора VIII



в кровотоке в течение короткого периода времени, но не довели это исследование до достижения терапевтической пользы для пациента. В этом следующем подходе эндотелиальные клетки могут экспрессировать фактор VIII. Это естественный тип клеток, который экспрессирует фактор VIII, синусоидальные эндотелиальные клетки печени. Здесь из кровотока пациента извлекаются аутологичные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Ген фактора VIII трансдуцируется с использованием лентивирусного вектора. Эти клетки затем могут быть дифференцированы в эндотелиальные клетки, доставлены обратно пациенту и способны скорректировать гемофильный фенотип. Концептуальные преимущества этого метода очень понятны, здесь все очень просто. Сложнее, когда мы начинаем применять данный метод на практике или даже пытаемся сделать это. Но тем не менее этот опыт был проведен на животных, и когда животные получали эти новые клетки, обеспечил достижение терапевтических уровней фактора VIII.

В последней серии экспериментов гепатоцитоподобные клетки могут быть получены из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Этот подход заключается в том, чтобы получить мононуклеарные клетки периферической крови у пациентов, перепрограммировать их с использованием факторов транскрипции, потенциально небольших молекул, в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, выполнить редактирование гена, чтобы включить ген фактора IX,

направить дифференцирование на гепатоцитоподобные клетки, а затем повторно имплантировать их пациенту, где они поселятся в печени или будут находиться в брюшной полости и продуцировать значительные количества терапевтического фактора IX. Этот опыт проводился на мышах. И так было со всеми этими подходами в клеточной терапии — на животных моделях нами были получены некоторые достоверные результаты, и теперь вопрос заключается лишь в том, сможем ли мы осуществить переход к клиническим исследованиям на людях.

На данный момент в ближайшей перспективе проведение клинических исследований на людях не планируется. Предстоит еще многое сделать. Был разработан один новый исследуемый препарат с гемопоэтическими стволовыми клетками, применяемый в лентивирусной терапии человека. Она подразумевает экспрессию гена фактора VIII конкретно в тромбоцитах. Таким образом, препарат поступает в стволовые клетки с лентивирусным фактором VIII, трансдуцирует их, позволяя им затем дифференцироваться

в разнообразные типы клеток, но с использованием промотора для гена фактора VIII, который позволяет продуцировать фактор VIII только в зрелых тромбоцитах. Этот подход был продемонстрирован на животных и в настоящее время имеет статус открытого IND. К сожалению, при таком подходе в костном мозге должно быть создано место, куда преобразованные генные клетки могли бы вернуться и создать свою нишу.

А это указывает на необходимость использовать цитотоксический агент, такой как бусульфан, для удаления части костного мозга. Это вызывает обеспокоенность с точки зрения соотношения риска и пользы, и поэтому этот метод следует предлагать и планировать его применение очень осторожно и медленно, чтобы убедиться в том, что в результате удаления части костного мозга пациенту не будет нанесен вред. Если мы вернемся к AAV и рассмотрим некоторые из недостатков, я описал необходимость улучшения векторов,

то есть необходимо учитывать эффективность, изменчивость, долговечность AAV-терапии. Я говорил об альтернативных способах доставки генов, без использования AAV-доставки, таких как липидные наночастицы и лентивирусы. И в ближайшее время следует провести клинические испытания хотя бы с использованием лентивирусов. А еще есть клеточная терапия в сочетании с генной терапией, в сочетании с редактированием генов, что также выглядит обнадеживающе и может стать

достаточно эффективным подходом к созданию новых клеточных фабрик для производства фактора VIII или фактора IX, однако переход от доклинических моделей к клиническим испытаниям еще не осуществлен. Благодарю за внимание!

