

Тьерри Вандендрише: Меня зовут Тьерри Вандендрише. Я профессор Брюссельского свободного университета, Бельгия. Я возглавляю кафедру генной терапии и восстановительной медицины. Последние 30 лет я работаю в области генной терапии, в частности, генной терапии при гемофилии. И сегодня мне хотелось бы поговорить о том, как обстоят дела в этой сфере в данный момент, какие еще предстоит изучить ключевые проблемы и факторы, связанные с будущим генной терапии при гемофилии.

Общие проблемы генной терапии заключаются в следующем. Эффективна ли генная терапия при гемофилии? Дает ли она результат? И какие существуют методы сопоставления результатов различных клинических испытаний генной терапии? Как долго длится эффект генной терапии? Будет ли он длиться на протяжении всей жизни или только какое-то время? Существуют ли какие-либо базовые вопросы безопасности, которые нам следует принимать во внимание?

После того как пациент уже получал генную терапию, возможно ли его повторное лечение, если уровень фактора VIII или фактора IX снизился? Можем ли мы рассматривать лечение пациентов при наличии ингибиторов фактора VIII или фактора IX? И каков на самом деле риск проявления ингибиторов после генной терапии? Будет ли он выше, чем при обычной заместительной терапии белковыми препаратами, или таким же или даже более низким? И, в конечном итоге, можем ли мы рассмотреть возможность лечения гемофилии у детей методом генной терапии в идеале до появления симптомов поражения суставов?

Таким образом, существует ряд ключевых вопросов, на которые у нас пока действительно нет ответа, но благодаря уровню развития современной техники мы уже имеем некоторые представления о перспективах данного направления. Как видно на примере клинических испытаний генной терапии при гемофилии, действительно в большинстве всех испытаний используется такой способ доставки гена, как вектор на основе аденоассоциированных вирусов.

Такие векторы могут несколько отличаться содержанием капсидов (капсул вируса, используемых для упаковки терапевтического гена), а также самим терапевтическим геном. Что касается различных испытаний, мы видим, что все они имеют одну общую черту: в них используется фактор VIII с делецией В-домена, который называют оптимизированным, но характер кода при оптимизации в разных векторах может быть разным.



Также и характер трансгена может иметь едва уловимые различия. Например, в конструкции Freeline существует домен V3, который предположительно усиливает экспрессию гена. Все эти векторы также зависят от использования гепатоцит-специфического промотора, HSP, который управляет терапевтическим геном. Что касается капсидов, которые используются в качестве внешней оболочки терапевтических генов: они действительно несколько различаются и служат молекулярным ключом,

который открывает доступ к клеткам и доставляет в них терапевтический ген. Что же касается гемофилии А, если не вдаваться в подробности, вспоминается одно особенное исследование. Это исследование было опубликовано Rangarajan et al в Медицинском журнале Новой Англии. В этом исследовании вектор AAV5 использовался для активации фактора VIII. И вы сразу можете оценить то, как однократная внутривенная инъекция

этого вектора AAV5 фактора VIII приводит к устойчивому и значительному увеличению активности фактора VIII даже в супрафизиологическом диапазоне. И это согласуется со значительным снижением количества кровотечений и инфузий белка фактора VIII у этих пациентов. То есть это выдающийся прогресс, который фактически демонстрирует перспективы генной терапии гемофилии типа А.

Ну а если наблюдать за состоянием экспрессии с течением времени, мы заметим, что она имеет тенденцию к некоторому снижению. Давайте вернемся к этому вопросу позже. Что касается гемофилии В, то существует множество проводимых параллельно исследований, и все они опираются на аденоассоциированный вирусный вектор и используют различные типы терапевтических трансгенов. Как и в случае использования фактора VIII,

оптимизация трансгена фактора IX происходит за счет кодона. Целью такой оптимизации за счет кодонов является получение максимального количества продуцируемого вектором белка. И в большинстве испытаний использовался гиперактивный трансген фактора IX, трансген фактора IX Падуа, сопряженный с усилением функциональной мутации, повышающей активность фактора VIII в 5–10 раз. Таким образом, это означает, что с одного объема вектора можно получить в 5–10 раз более высокую активность фактора IX.

Существует также другой вектор, разработанный Сангамо, основанный на парадигме редактирования генов и позволяющий управлять



экспрессией фактора IX за счет эндогенного промотора альбумина. Возьмем промоторы, используемые для стимулирования фактора IX Падуи или даже фактора другой версии: это специфичные для гепатоцитов промоторы, или HSP. В случае нуклеаз «цинковый палец» Сангамо

снова использовался специфический для гепатоцитов промотор. Таким образом, в каждом из этих различных клинических испытаний вы можете заметить некоторые общие черты. Когда мы сосредоточиваемся на самих векторных капсидах, то видим едва уловимые различия — используются различные серотипы, а последствия каждого из этих молекулярных изменений на уровне капсидов на данный момент изучены не полностью.

Клиническое исследование AAV-фактора IX, которое привело к повышению активности фактора IX, было впервые описано George et al в Медицинском журнале Новой Англии в 2017 году. И сразу же стало очевидно, что при инъекции относительно низкой дозы вектор вырос до 5×10^{11} векторных геномов на килограмм. Такая относительно устойчивая активность фактора IX была очевидна в диапазоне, скажем, от 30 до 50 %.

Также это соотносилось со значительным снижением среднегодовой частоты кровотечений и среднего числа инфузий фактора IX. Так что это в большой степени отражает то, что мы наблюдали в исследовании гемофилии типа A, о котором я только что говорил. Я просто хотел обратить ваше внимание на значительные различия показателей у разных пациентов, что стало очевидным именно в данном исследовании. Мы также наблюдали это и в других исследованиях, и в этом нам еще необходимо лучше разобраться.

Почему же после проведения генной терапии у некоторых пациентов уровень фактора IX или фактора VIII выше, чем у других? У нас пока нет ответа на этот вопрос. Итак, если мы посмотрим на разные исследования, не тратя время на то, чтобы вдаваться в подробное описание их всех, хорошая новость заключается в том, что в этих клинических испытаниях были достигнуты уровни терапевтического фактора VIII и фактора IX. Они оставались относительно стабильными как минимум в течение 1 года.

Все еще обсуждается вопрос о возможном снижении фактора, скажем, через 2 или 3 года; но давайте вернемся к этому вопросу позже. Такой рост уровней терапевтического фактора VIII и фактора IX связан со



значительным снижением годовой частоты кровотечений и сокращением использования фактора. Они считаются относительно безопасными, серьезных побочных явлений нет. Существует некоторая обеспокоенность по поводу гепатотоксичности, но к данной теме я вернусь позже.

Усиление функции мутации Падуи также способствует гораздо более высокой активности, чем в другой версии, что особенно интересно, так как теоретически это позволяет нам использовать более низкие и более безопасные дозы векторов. О каких-либо ингибиторах фактора VIII или фактора IX не сообщалось. Возможно, такие результаты не удивительны, поскольку пациенты, участвовавшие в этих исследованиях, разумеется, отбирались с учетом отсутствия ингибитора в их анамнезе.

Последующие длительные исследования в доклинических моделях фактически выходят за рамки того, что мы в настоящее время смогли продемонстрировать на людях. Но радует, что на примере гемофилии у собак экспрессия в диапазоне от 5 до 10 % проявляется уже более 12 лет. В исследованиях на нечеловекообразных приматах последующие длительные исследования еще не так продолжительны, но и здесь экспрессия также проявляется в течение более 6 лет.

Сегодня существует реальная проблема в сравнении эффективности и безопасности в этих различных исследованиях генной терапии. В исследовании BioMarin и UniQure очевидно использовались более высокие векторные дозы, 10^{13} векторных геномов на килограмм, в отличие от испытаний Freeline и Spark,

которые проводились на основе векторных доз 2×10^{12} векторных геномов на килограмм или даже этого. Однако на практике невозможно сравнить эти дозы из-за отсутствия стандартов для векторных доз. Существуют также разные методы производства, различия в функциональности вектора, что означает, что на практике соотношение между пустыми и полными частицами в разных пробах может отличаться.

Кроме того, в разных испытаниях могут различаться и стратегии, используемые для титрования этих векторов. И не следует также игнорировать возможность различий в самих объектах исследования, связанных, например, с возникновением предсуществующих анти-AAV антител. Также на этом этапе были разработаны анализы для определения титра таких анти-AAV антител,



но эти анализы не стандартизированы и показывают различную чувствительность и различные пороговые значения. Итак, в двух словах, в контексте отсутствия каких-либо стандартов мы на самом деле сравниваем здесь яблоки и апельсины. Поэтому нам нужно разобраться с этим и в дальнейшем стремиться создавать такие стандарты, которые можно было бы использовать для решения этих вопросов. И один из ключевых вопросов генной терапии связан

с тем, что результатом генной терапии станет пожизненная экспрессия терапевтического гена или, возможно, лишь его экспрессия в течение ряда лет, по истечении которых она будет снижаться. Так что, без каких-либо преувеличений и образно говоря, в данной сфере этот вопрос действительно чрезвычайно важен. Обнадуживает то, что у собак экспрессия составляет по меньшей мере 12 лет, а у нечеловекообразных приматов по меньшей мере 6 лет; у мышей, как известно, она длится всю жизнь.

Существует уже как минимум 8ми летний опыт с фактором IX в клинических условиях при исследованиях печени, и при этом была продемонстрирована устойчивая экспрессия фактора IX, что действительно обнадуживает. Интересно то, что в одном из более ранних испытаний на мышцах есть даже примеры, свидетельствующие о 10-летней экспрессии. Если критически оценивать уровни экспрессии фактора VIII в исследовании BioMarin фактора VIII AAV, мы увидим, что уровни сами по себе не стабильны,

потому что, если проследить уровень экспрессии фактора VIII, скажем, в течение более длительного периода времени, можно заметить, что уровни медианного фактора VIII снизились с первоначального показателя более 150 % до показателя ниже 50 %. Нам не до конца понятны причины такой кинетики, и в этом еще предстоит разобраться. Вопрос, который волнует нас сегодня, заключается в том, будет ли сохраняться экспрессия за пределами этого двухлетнего интервала, и этот вопрос необходимо тщательно контролировать.

Гепатоциты у взрослых делятся медленно, и это может сказаться на стабильности экспрессии. Почему так происходит? Потому что когда клетки делятся, векторные геномы AAV, отражающие экспрессию фактора VIII или фактора IX, слабеют и даже разрушаются. Вследствие этого экспрессия фактора IX или фактора VIII соответственно снижается.



Однако если клетка не должна была делиться, то можно предположить, что уровни фактора VIII или фактора IX останутся относительно стабильными. Тем не менее у детей наблюдается увеличение пролиферирующих гепатоцитов, а в отсутствии стабильной интеграции терапевтических генов фактора VIII или фактора IX в геном клетки-мишени гепатоцитов

гены ослабеют, и следует ожидать, что экспрессия будет временной. Существует несколько доклинических примеров животных моделей, подтверждающих эту гипотезу, поскольку дети еще не проходили генную терапию по поводу гемофилии. Однако если вектор должен был стабильно интегрироваться в геном клетки-мишени, тогда можно ожидать, что экспрессия будет стабильной, поскольку в данном конкретном контексте эффекта ослабления терапевтического гена не будет.

В настоящее время долгосрочные риски, связанные с генной терапией, изучены не полностью. Такие риски относятся к неизвестным неизвестным и даже к известным неизвестным. Ко всему, что мы знаем и чего мы не знаем о них. Каков риск возникновения рака печени? Сегодня геномная интеграция терапевтического гена в геном клетки-мишени напоминает палку о двух концах.

С одной стороны, мы знаем, что интеграция, скорее всего, гарантирует долгосрочную, если не пожизненную экспрессию интересующего нас гена, поэтому можно ожидать постоянного терапевтического эффекта. С другой стороны, мы не имеем возможности контролировать то, в каком именно участке генома будет интегрироваться ген. И если это произойдет рядом с онкогеном,

возникает теоретический риск как минимум того, что это может вызвать образование опухолей, и в этом случае говорят об инсерционном онкогенезе. Таким образом, это довольно случайное явление, мы не контролируем место интеграции вектора, что теоретически может представлять угрозу безопасности. А биологическая причина этого заключается в том, что интересующий нас ген,

если он интегрируется рядом с онкогеном, способен придать пролиферативное преимущество модифицированным геном клеткам, что приводит к активации онкогена и индукции пролиферации гепатоцитов. В случае отсутствия выживаемости или пролиферативного преимущества ничего не произойдет, и это стоит иметь в виду. Тем не менее мы должны изучить приведенные здесь данные. Каковы данные в



доклинических моделях, имеющие отношение к такой долгосрочной безопасности?

Но обнадеживает тот факт, что ни в одном из доклинических исследований по генной терапии гемофилии А или В, в том числе у нормальных мышей, у мышей с дефицитом гемофильного фактора IX или фактора VIII, у собак с дефицитом гемофильного фактора IX или дефицитом фактора VIII или у нечеловекообразных приматов, признаки повышенной злокачественности отсутствовали. Так что, хотя мы не можем формально исключить,

что это может произойти или же не произойти, доклинические свидетельства и правда весьма убедительны. И нет никаких доказательств того, что векторы генной терапии, которые в настоящее время оцениваются в ходе клинических испытаний, приводят к росту злокачественности у этих моделей. Возвращаясь к проблемам безопасности: мы знаем, что введение векторов AAV фактора VIII или фактора IX может привести к острой гепатотоксичности.

Итак, это известное нам известное. Возьмем, к примеру, данные, представленные George et al, и мы увидим, что у этих пациентов уровни фактора IX повышаются, что показано здесь зеленым цветом, но одновременно у этих пациентов наблюдается повышение уровня ферментов печени в крови. Таким образом, здесь мы наблюдаем двоих пациентов, у которых было отмечено увеличение ферментов печени в крови.

И у второго пациента увеличение ферментов печени совпадает со снижением активности фактора IX. Поэтому, возможно, повышение активности трансаминазы, содержание которой в крови можно измерить, напоминает симптомы токсичного воздействия на печень и воспаления печени, что приводит к выведению генно-модифицированных клеток и сопутствующей потере экспрессии фактора IX. В некоторой степени эти побочные эффекты можно контролировать за счет введения преднизона,

т. е. при пероральном лечении кортикостероидами. И в большинстве испытаний мы видели такой ответ, хотя его механизм может быть не вполне понятным. Считается, что AAV-специфический Т-клеточный ответ имеет определенное значение по крайней мере у некоторых пациентов, но это может быть еще не все. Могут быть и другие иммунные механизмы, которые также могут являться причиной



снижения экспрессии и/или повышения активности ферментов печени, что и отражается в повышении активности трансаминаз.

Но одна из гипотез, которая была в некоторой степени подтверждена на доклинических моделях и связанное с которой явление может возникать по крайней мере у некоторых пациентов, заключается в том, что AAV-специфические Т-клетки и CD8-позитивные цитотоксические Т-клетки могут распознавать капсидные пептиды, полученные из AAV, которые представлены иммунной системе пациентов главным комплексом гистосовместимости класса 1.

и, следовательно, приводят к выведению этих клеток и утрате ими экспрессии. Однако, если применять временную иммуносупрессию, например, с помощью введения кортикостероидов, такая нежелательная иммунная реакция может быть подавлена и возможно достижение стабильной экспрессии. Сегодня нам известно, что это не единственное объяснение и что причиной повышения активности трансаминаз могут быть иные иммунные механизмы,

поскольку у некоторых пациентов нет никаких признаков AAV-специфического Т-клеточного ответа, и все же повышение активности трансаминаз все еще происходит. Так что в исследованиях гемофилии А это общий побочный эффект. Это было замечено во всех направлениях. Фактически это наблюдалось также в исследованиях других заболеваний, помимо гемофилии, особенно когда для лечения пациентов использовались большие векторные дозы. В исследованиях гемофилии В также присутствуют признаки повышения активности трансаминаз.

По сути, в этом и заключается причина введения стероидов пациентам во избежание этого явления. Тем не менее для купирования активности трансаминаз не всегда бывает достаточно перорального введения кортикостероидов. В одном из испытаний потеря экспрессии фактора VIII наблюдалась, невзирая на использование пероральных кортикостероидов. В некоторых исследованиях лечения гемофилии на основе AAV наблюдалась даже тяжелая токсичность для печени, и эти исследования были прекращены.

Ведется немало споров о применении профилактических кортикостероидов в целях исключения повышения активности трансаминаз. Наконец, существует еще проблема ингибиторов фактора VIII или фактора IX. И что интересно, во многих исследованиях



было доказано, что генная терапия фактором IX или фактором VIII приводит к наступлению иммунной толерантности.

В некоторых случаях антитела к фактору VIII или фактору IX после генной терапии могут даже быть уничтожены. И я хотел бы обратить ваше внимание на исследование, опубликованное группой д-ра Арруда и его коллегами, но имейте в виду, что существует множество других исследований, подтверждающих эту гипотезу. Например, в более ранних исследованиях было показано, что при введении мышам фактора VIII или фактора IX в одном случае это заканчивается выработкой антител к фактору VIII или к фактору IX. За исключением тех случаев, когда проводится лечение этих животных с помощью генной терапии,

при котором отсутствуют антитела к фактору IX или фактору VIII, возможно, обуславливающие появление регуляторных Т-клеток. Доктор Арруда и его коллеги доказали, что даже в случае фактора VIII и на крупных модельных животных антитела к фактору IX могут быть уничтожены. Что служит ярким примером того, как после генной терапии нейтрализующие антитела ингибиторы 2 фактора VIII могут быть уничтожены,

что представляет собой весьма интересный поворот в изучении данной проблемы. Существует ряд ключевых вопросов, ответы на которые были получены с помощью генной терапии, а также другие вопросы, мы все еще находимся в процессе поиска их решения. Эффективна ли генная терапия? Да, конечно, она эффективна в лечении не только гемофилии, но также и других генетических заболеваний и даже рака. Генная терапия позволила получить одобрения EMA и FDA для ряда продуктов, предназначенных для лечения, помимо гемофилии, также и ряда других заболеваний.

Увидим ли мы первый продукт генной терапии, разрешенный к использованию также для лечения гемофилии, это только вопрос времени. Как долго длится эффект генной терапии? Мы не можем с полной уверенностью утверждать, будет ли эффект длиться много лет или в течение всей жизни, но полученные на сегодняшний момент данные говорят о том, что этот эффект может длиться как минимум 8 лет. Каковы основные проблемы безопасности? Основные проблемы безопасности связаны с риском возникновения гепатита и воспаления.

Хотя это можно контролировать путем временного введения кортизона. Другой риск, относящийся к долгосрочной безопасности, связан со



случайной интеграцией вектора. Хотя доклинические исследования показали, что подобный риск инсерционного онкогенеза у гемофильных моделей и других доклинических моделей в лечении, основанном на использовании векторов генной терапии, которые впоследствии использовались в клинических испытаниях, весьма низок.

Возможно ли повторное лечение пациентов? Думаю, на данный момент это невозможно. Причина в том, что у этих пациентов, которые получали генную терапию, будут вырабатываться антитела к вектору, поэтому повторное введение вектора исключается. Нельзя повторно вводить тот же вектор, который они уже получали ранее. Но в доклинических моделях имеются некоторые разработки, предлагающие способы обхода этой проблемы. Так что, возможно, это всего лишь вопрос времени,

пока мы не найдем способ повторного лечения пациентов в случаях, когда экспрессия после генной терапии снижается. Можем ли мы лечить пациентов с ингибиторами? Дело в том, что на данный момент пациенты с ингибиторами в исследованиях не участвуют. Даже пациенты, у которых на данный момент нет ингибиторов, но у которых они были в прошлом, еще не проходили лечение. Вполне вероятно, что те пациенты, у которых на данный момент нет ингибиторов, но у которых они были в прошлом,

могут в конечном итоге быть включены в некоторые из предстоящих исследований, посвященных лечению гемофилии. Однако обнадеживает то, что исследования на животных показали появление толерантности после генной терапии и даже исчезновение или уничтожение ранее существовавших ингибиторов фактора IX или фактора VIII. Поэтому, возможно, риск появления ингибиторов после генной терапии ниже, чем можно было бы ожидать в контексте заместительной белковой терапии.

Но нам еще предстоит это выяснить. Так каков же риск развития ингибиторов после генной терапии? Что ж, основываясь на текущих исследованиях, мы не можем решить эту проблему, поскольку все пациенты прошли предварительный скрининг на отсутствие ингибиторов. Но, как я упоминал ранее, доклинические исследования предполагают, что возможно снижение риска развития ингибиторов после генной терапии. Сможем ли мы в конечном итоге лечить детей с помощью генной терапии в идеале прежде начала поражения суставов?



На самом деле, если вы хотите это сделать, необходим какой-то интегрирующий фактор. Но это вызывает опасения, связанные с риском случайной геномной интеграции или, возможно, редактирования генов, когда мы можем специфически модифицировать геном в какой-то очень специфической области. Еще один вариант — это возможность повторного введения векторов AAV. Но для этого нам нужны дополнительные методики, чтобы избавиться от антител, которые

появляются после инъекции вектора AAV. Но, возможно, это вопрос времени, подождем, пока доклинические исследования покажут нам, как именно можно перенести эти результаты на клиническую практику. И в заключение хорошая новость: после генной терапии могут быть получены устойчивые уровни фактора IX и фактора VIII. Самый высокий уровень активности фактора IX на сегодняшний день составляет от 30 до 40 %.

Долгосрочная экспрессия означает как минимум 8 лет экспрессии в диапазоне от 2 до 5 % в одном из более ранних испытаний. И было бы, конечно, очень интересно увидеть, как этот уровень от 30 до 40 % будет со временем проявляться в этих более поздних группах пациентов. В случае фактора VIII сейчас, через два года после генной терапии, эти уровни колеблются на отметке около 50 %. Такое увеличение уровней фактора IX и фактора VIII согласуется со значительной коррекцией фенотипа кровотечения

и прекращением профилактики. Уменьшено использование фактора и нет ингибиторов для фактора IX или фактора VIII. Данные, полученные на доклинических моделях, свидетельствуют о том, что возможна даже иммунная толерантность к фактору VIII или фактору IX, что звучит весьма обнадеживающе. Сегодня генная терапия уже не кажется чудом. Есть некоторые малоизвестные факторы, которые нам следует учитывать, а также некоторые другие параметры.

Существуют проблемы с краткосрочной безопасностью, иммунный ответ на воздействие вектора и клетки-продукты генной инженерии, токсичность для печени, оправдывающая использование кортикостероидов, долгосрочные проблемы с безопасностью и различия в показателях у разных пациентов. Так что сейчас у нас еще есть надежда на счастливый исход. У некоторых пациентов могут быть нормальные уровни, у других уровни могут быть ниже 10 %. И нам пока не до конца понятно, с чем связано такое отклонение показателей у разных пациентов.



Мораль всей этой истории заключается в том, что нам следует проявлять осторожный оптимизм. И я хотел бы в этой связи перефразировать слова Уинстона Черчилля: «Это еще не конец. И даже не начало конца. Но это, пожалуй, конец начала». Благодарю за внимание.

