

Медицина – не чистая математика, а ремесло, основанное на знаниях, технологиях, опыте и клиническом предвидении.

Когда перед тобой сложный пациент, одна голова – хорошо, а две – лучше. Полезно советоваться со специалистами, которые сталкивались с подобными случаями. Мы регулярно взаимодействуем с МОНИИАГ, институтом Герцена, Кулаковским центром, институтом трансплантологии и искусственных органов, московскими больницами и многими другими. Второе мнение зачастую помогает принять верное решение.

– **Расскажите о работе с молодыми специалистами и подготовке кадров.**

– У нас функционирует факультет усовершенствования врачей, есть большой аккредитационный центр. Мы учим ординаторов практически по всем специальностям. В этом году я трижды приветствовала молодых докторов, потому что зал, рассчитанный на 450 мест, не вмещал наших коллег.

Подготовка молодых специалистов важна и как кадровый ресурс для института, и для Подмосковья в целом. Многие ординаторы – целевики от Московской области, и они понимают, куда пойдут работать.

Выбираем молодёжь и для института. Недавно коллеги приво-дили ординаторов, которых хотят оставить работать в реанимации. Конечно, мы идём навстречу и учитываем пожелания руководителей отделений. Каждое направление у нас – это маленький институт, и без преемственности поколений здесь не обойтись.

Всегда поддерживаю решения детей наших сотрудников продолжить врачебную династию. Они как никто знают трудности профессии и делают этот выбор осознанно. Я сама пошла по стопам папы. Владимир Викторович был известным хирургом в Алтайском крае, удостоен ордена Трудового Красного Знамени и звания «Заслуженный врач Российской Федерации». Я им очень горжусь и именно поэтому выбрала такую специальность. Надеюсь, что нашу династию продолжит моя дочь.

– **В завершение: как в современном мире с множеством регламентов и пациентов, которые ставят себе диагноз с помощью нейросетей, остаться верным профессии и выстроить диалог?**

– Что касается пациентов, входящих с диагнозами из интернета: задача врача – не конфликтовать, а аргументированно и уважительно объяснить клиническую картину. Никакой гаджет не заменит профессионального мнения врача.

Большинство возможных конфликтных моментов на приёме можно нивелировать чёткой коммуникацией, вежливостью и эмпатией. Например, если в кабинете оказался пациент, который требует больше времени, достаточно выйти и предупредить остальных. Зачастую этого достаточно, никто не будет против. Иногда оказание помощи требует и дополнительно-го времени, и привлечения других специалистов, а иногда и экстренной госпитализации пациента.

В завершении я хотела бы сказать, что системные ориентиры, кадровый потенциал и высокие технологии – не просто слова, а инструменты, которые позволяют институту и сегодня оставаться надёжной опорой для каждого пациента. Новый этап развития – это продолжение той же 250-летней миссии: быть центром передовой медицинской мысли, местом, где берегут жизнь, возвращают здоровье и думают о будущем. Сохраняя прошлое, создавая настоящее, институт уверенно идёт вперёд – ради жизни, здоровья и благополучия жителей Подмосковья.

Новые подходы

Современная антиретровирусная терапия позволяет эффективно подавлять репликацию ВИЧ и поддерживать вирусную нагрузку на неопределяемом уровне. Однако после отмены лечения инфекция в большинстве случаев возобновляется. Основной причиной этого является сохранение вирусных резервуаров в организме.

Одним из перспективных направлений исследований является изменение клеток иммунной системы таким образом, чтобы снизить их восприимчивость к заражению ВИЧ. На этом принципе основана разработка клеточного продукта AGCT-001 – аутологичного препарата на основе гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пациента с генетически инaktivированным геном CCR5. Решением этого вопроса занимается Фонд генетических инноваций.

CCR5 в качестве терапевтической мишени

CCR5 является рецептором на поверхности ряда клеток иммунной системы и используется некоторыми вариантами ВИЧ для проникновения в клетку. Нарушение функции гена снижает восприимчивость клеток к заражению CCR5-тропными вариантами вируса.

Важным основанием для разработки этого подхода стали случаи длительной ремиссии ВИЧ после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от доноров с мутацией CCR5-Δ32. Наиболее известен случай так называемого «берлинского пациента», у которого после трансплантации и последующей отмены антиретровирусной терапии вирус длительное время не определялся.

Аллогенная трансплантация ГСК, однако, является сложным медицинским вмешательством и сопровождается риском серьёзных осложнений. Кроме того, доноры с соответствующим генетическим вариантом встречаются редко.

Подход AGCT-001 предусматривает использование собственных клеток пациента с их последующей генетической модификацией *ex vivo*.

Исходным материалом для получения продукта являются CD34+ гемопоэтические стволовые клетки. После выделения и обогащения клеточной популяции проводится генетическое редактирование гена CCR5.

Для этого используется специфичная нуклеаза CCR5-Uco-TALEN, относящаяся к системе TALEN. Она распознает определённый участок ДНК в гене CCR5 и вызывает двунитевой разрыв. При последующем восстановлении ДНК возникают изменения последовательности, способные привести к утрате функциональности гена. В условиях оптимального протокола эффективность редактирования CCR5 в исследуемых образцах клеточного продукта превышала 90%.

После проведения генетической модификации клетки подвергаются последующей обработке и криоконсервации. Таким образом, генетическое редактирование осуществляется вне организма пациента, после чего ему трансплантируется уже подготовленный клеточный продукт.

Предполагаемый механизм действия

После введения клеточного продукта модифицированные ГСК должны прижиться в костном мозге и участвовать в восстановлении кроветворения. Принципиальной особенностью данного подхода является то, что непосредственной мишенью терапии являются не зрелые иммунные клетки, а их стволовые предшественники. Если

Нокаут CCR5

Генная терапия ВИЧ с использованием аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

генетически модифицированные ГСК сохраняют способность к длительному кроветворению, из них впоследствии должны формироваться различные клетки крови, включая клетки иммунной системы с инактивированным CCR5. Такие клетки потенциально должны обладать сниженной восприимчивостью к заражению ВИЧ.

Следовательно, предполагаемый терапевтический эффект должен формироваться постепенно: после трансплантации необходимо приживание модифицированных ГСК, восстановление кроветворения и формирование достаточно устойчивой популяции иммунных клеток с инактивированным CCR5.

При этом AGCT-001 не предполагает непосредственного уничтожения вирусных резервуаров. Поэтому ключевым клиническим вопросом является способность сформированной популяции модифицированных иммунных клеток обеспечить контроль инфекции при снижении или отмене антиретровирусной терапии.

Дизайн доклинического исследования

Для оценки безопасности клеточного продукта было проведено исследование на иммунодефицитных мышах линии NBSGW.

Основными задачами исследования являлись оценка токсичности, биораспределения, опухоленности и онкогенности генетически модифицированных ГСК, а также оценка их способности к приживлению и участию в кроветворении.

В исследовании использовали три группы животных. В экспериментальную группу входили особи, которым вводили модифицированные CD34+ ГСК. В первую контрольную группу включали тех, кто получал немодифицированные CD34+ ГСК. Второй контрольной группе вводили только инфузионный раствор. Всего модифицированный клеточный продукт был проверен на 45 мышах, немодифицированные ГСК – 17, инфузионный раствор – 10.

Клетки вводили внутривенно. Наблюдение продолжалось 20 недель. В течение этого периода проводились клинические осмотры, оценка массы тела и забор периферической крови. После завершения периода наблюдения выполнялись эвтаназия животных и исследование органов и тканей.

Для оценки биораспределения использовали иммуногистохимическое определение CD45+ клеток. Дополнительно проводились гистологические исследования органов и тканей.

По результатам исследования генетически модифицированные ГСК успешно приживались и хорошо переносились животными. При оценке динамики массы тела средние показатели во всех трёх группах соответствовали видовой норме. Статистически значимых различий между группами выявлено не было. Отдельные признаки неблагополучия регистрировались у животных разных экспериментальных групп, однако их характер и распределение не позволяли связать выявленные изменения с системным токсическим действием исследуемого клеточного продукта.

Таким образом в рамках использованной экспериментальной модели признаков системной токсичности, обусловленной вве-

дением модифицированных ГСК, выявлено не было.

Морфологическая оценка органов и тканей

Гистологическое исследование большинства органов показало сохранение нормальной гистоархитектоники. Опухолевых очагов в исследованных тканях не обнаружено. Выявленные отдельные морфологические изменения, включая дистрофические и воспалительные изменения, преимущественно имели слабую выраженность и встречались в различных экспериментальных группах. При сравнении экспериментальной и контрольных групп не было установлено признаков, указывающих на специфическое системное повреждающее действие генетически модифицированных ГСК.

Отдельно оценивались потенциальные опухоленности и онкогенные свойства клеточного продукта. В условиях проведённого исследования признаков неопластической трансформации клеток или формирования опухолевых очагов выявлено не было.

После трансплантации человеческие CD45+ клетки обнаружались преимущественно в костном мозге, что соответствует ожидаемому распределению. Помимо костного мозга, наиболее выраженное присутствие CD45+ клеток отмечалось в лёгких, печени, почках и селезёнке. В меньшей степени клетки выявлялись в желудке, кишечнике, коже и других исследованных тканях. В отдельных образцах CD45+ клетки обнаружались в головном мозге, сердце и яичниках. В семенниках CD45+ клетки не выявлялись.

При сравнении модифицированных и немодифицированных ГСК было обнаружено различие в количестве CD45+ клеток в некоторых органах. В частности, в лёгких, печени и почках количество CD45+ клеток в группе модифицированных ГСК было ниже, чем в группе немодифицированных клеток. При этом профиль распределения клеток в целом сохранялся. Одним из возможных объяснений такого различия является изменение функции хемокинового рецептора CCR5 после генетического редактирования.

Специфичность

Для клеточной генной терапии принципиальное значение имеет не только эффективность редактирования целевого гена, но и отсутствие значимой нецелевой активности нуклеазы. Потенциальным риском применения CCR5-Uco-TALEN является возникновение изменений в других участках генома. Такие изменения теоретически могут нарушить работу генов, регулирующих пролиферацию и выживание клеток, и тем самым создать условия для их патологической трансформации.

Для оценки специфичности редактирования проводился анализ целевого участка CCR5 и потенциальных локусов нецелевой активности. Полученные данные свидетельствуют о высокой специфичности редактирования целевого локуса. Частота изменений в потенциальных нецелевых участках существенно уступала частоте редактирования самого CCR5.

Таким образом, результаты проведённых исследований по-

зволяют рассматривать CCR5-Uco-TALEN как инструмент с высокой специфичностью в рамках исследованной системы.

Первые итоги

Совокупность полученных результатов позволила оценить несколько ключевых параметров безопасности клеточного продукта. Модифицированные ГСК сохраняли способность к приживлению после трансплантации и не демонстрировали признаков выраженной системной токсичности. При морфологическом исследовании не выявлено опухолевых очагов или признаков неопластической трансформации. Также не было выявлено опухоленности и онкогенных свойств клеточного продукта в использованной модели.

Вместе с тем результаты доклинического исследования необходимо интерпретировать с учётом ограничений экспериментальной модели. Отсутствие признаков токсичности или опухолевого роста у животных не может служить доказательством безопасности и эффективности терапии у человека. Эти параметры требуют дальнейшей оценки в клинических исследованиях.

Следующим этапом разработки является переход от оценки доклинической безопасности к клинической оценке клеточного продукта. На этом этапе принципиальное значение будут иметь несколько параметров: эффективность приживления модифицированных ГСК, продолжительность их участия в кроветворении, доля клеток с инактивированным CCR5 среди образующихся иммунных клеток и динамика этой популяции во времени.

Не менее важной задачей станет оценка влияния модификации CCR5 на течение ВИЧ-инфекции. Даже высокая эффективность генетического редактирования сама по себе не гарантирует терапевтического эффекта. Для достижения клинически значимого результата необходимо, чтобы модифицированные ГСК успешно прижились, сохраняли способность к длительному кроветворению и обеспечивали формирование достаточной и стабильной популяции клеток, устойчивых к заражению CCR5-тропными вариантами ВИЧ.

Результаты

AGCT-001 представляет собой подход к клеточной генной терапии ВИЧ-инфекции, основанный на *ex vivo* редактировании собственных гемопоэтических стволовых клеток пациента и инактивации гена CCR5. В проведённых доклинических исследованиях была продемонстрирована способность модифицированных ГСК к приживлению и отсутствие выявляемой системной токсичности, опухоленности и онкогенности в использованной модели.

Полученные результаты формируют доклиническую основу для дальнейшего изучения технологии. При этом основной вопрос – сможет ли генетическая модификация CCR5 привести к длительному формированию устойчивой к ВИЧ популяции иммунных клеток и обеспечить контроль инфекции при снижении зависимости от постоянной антиретровирусной терапии – может быть решён только в рамках клинического исследования.

Подготовил Иван ЗАЙЦЕВ.