

Научная новизна

Настоящий проект направлен на решение научной проблемы по разработке и внедрению в практическую медицину персонализированной прецизионной генной терапии при угрозе ишемического инсульта головного мозга и его лечения с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантным генетическим материалом.

На модели ишемического инсульта головного мозга у мини-свиньи был испытан аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный генами *vegfl65*, *gdnf* и *pcam1*, для сдерживания гибели нейронов в перинфарктной области мозга при внутривенном введении препарата в острую фазу инсульта, или до моделирования инсульта (превентивная генная терапия).

На основании полученных результатов нами было выдвинуто положение, что использование лейкоцитов периферической крови пациента в качестве клеточных носителей искусственных генов для временной продукции терапевтических молекул с целью коррекции патологического процесса в ЦНС может быть одним из прорывных направлений в генной терапии.

Основные характеристики новых технологий

Был разработан и оптимизирован протокол приготовления аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантным генетическим материалом.

Важно отметить, что трансдукцию лейкоконцентрата проводят с помощью химерных аденовирусных векторов (Ad5/35F), в контейнере для крови, сразу после ее забора, что исключает технологию культивирования клеток *in vitro* с использованием препаратов животного происхождения, антибиотиков и рекомбинантных факторов роста.

Естественная способность лейкоцитов мигрировать в очаги воспаления усилена за счет продукции нейрональной молекулы адгезии (NCAM), что обуславливает таргетную миграцию клеток к очагам повреждения и создание большей концентрации биологически активных веществ в зоне ишемии.

Использование лейкоцитов периферической крови пациента в качестве клеточных носителей рекомбинантных генов человека, время существования которых не превышает несколько дней, обуславливает временную продукцию терапевтических молекул с целью коррекции патологического процесса в ЦНС.

Сравнение с существующими отечественными и зарубежными аналогами

На сегодняшний день не существует готовых, апробированных и эффективных препаратов, содержащих генетический материал, для терапии ишемического инсульта головного мозга. Способ доставки терапевтических генов, временно продуцирующих нейротрофические факторы, с помощью аутологичного лейкоконцентрат для генной терапии ишемического инсульта является оригинальным и ни в одном из медицинских центров мира экспериментально не проверяется.

Патентно-лицензионная ценность разработок

Успешное завершение проекта позволило запатентовать инновационные технологии получения генно-клеточных препаратов и способы их применения, что в дальнейшем позволит начать клинические испытания аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, для персонафицированной прецизионной генной терапии ишемического инсульта в Российской Федерации.

Практическая ценность разработок

Полученные данные могут служить основой для разработки нового класса лекарственных средств на основе препаратов крови, содержащих генетический материал, для лечения ряда социально-значимых заболеваний человека, к которым относится ишемический инсульт.

Проект направлен на решение проблемы по разработке способа персонафицированной прецизионной генной терапии ишемического инсульта головного мозга с помощью аутологичного лейкоконцентрата, содержащего рекомбинантный генетический материал, для сдерживания гибели нейронов в первые часы возникновения ишемического инсульта и превентивной генной

терапии для повышения жизнеспособности нейронов при угрозе инсульта головного мозга. Впервые в заявленном проекте решились задачи биобезопасности лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантным генетическим материалом в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Содержание работы.

Для прямой и клеточно-опосредованной превентивной генной терапии ишемического инсульта на основе аденовируса человека пятого серотипа (Ad5) наработаны рекомбинантные репликативно-дефектные аденовирусные вектора, несущие по отдельности кДНК генов: сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5-VEGF165); глиального нейротрофического фактора (Ad5-GDNF); нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad5-NCAM1); репортерного зеленого флуоресцирующего белка (Ad5-GFP).

Создание генных конструкций

На предыдущем этапе наших исследований за счет средств гранта РФФИ в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи были созданы генетические вектора (Ad5/F35-VEGF165, Ad5/F35-GDNF, Ad5/F35-NCAM1 и Ad5/F35-GFP). Фактические работы в НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи включали:

1) наработку в препаративных количествах генных конструкций — рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусных векторов на базе аденовируса человека 5 серотипа с фибром аденовируса 35 серотипа (Ad5/F35), несущих по отдельности ген сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5/F35-VEGF165), ген глиального нейротрофического фактора (Ad5/F35-GDNF) и ген нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad5/F35-NCAM1) с использованием клеточной культуры. После наработки рекомбинантных репликативно-дефектных вирусных векторов в культуре клеток полученные препараты подвергали многостадийной хроматографической очистке. После стерилизующей фильтрации их разливали во флаконы;

2) определение подлинности рекомбинантных векторов в препаратах опытных образцов, несущих целевые трансгены, проводили методом ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле.

3) количественное определение рекомбинантных частиц проводили спектрофотометрическим методом.

4) определение активности рекомбинантных векторов в препаратах опытных образцов проводили с помощью реакции бляшкообразования на линии клеток НЕК 293, обеспечивающих репликацию рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц.

Наработанные в препаративных количествах химерные аденовирусные вектора, несущие по отдельности гены человека *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1* и ген репортерного зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*), были использованы для получения аутологичного обогащенного рекомбинантным генетическим материалом лейкоконцентрата.

Генетически модифицированный лейкоконцентрат получали на основе лейкоконцентрата, выделенного из периферической крови мини-свиней и химерных аденовирусных векторов (Ad5/F35-VEGF165, Ad5/F35-GDNF, Ad5/F35-NCAM1), согласно разработанному нами оригинальному методу в контейнере для крови без манипуляций *in vitro* и использования биопродуктов животного происхождения и антибиотиков.

Протокол получения обогащенного генетическим материалом аутологичного лейкоконцентрата включал следующие этапы:

(1) У мини-свиньи из подключичной вены под глубоким наркозом в асептических условиях забирали 50 мл крови в стерильные закрытые контейнеры (гемакон) объёмом 250 мл.

(2) Лейкоконцентрат получали путем удаления эритроцитов.

(3) Трансдукцию лейкоконцентрата проводили одновременно тремя аденовирусными векторами в равном соотношении каждого вектора Ad5/35F-VEGF165 (1/3) + Ad5/35F GDNF (1/3) + Ad5/35F-NCAM1 (1/3) в контейнере для компонентов крови в течение 12 часов при постоянном покачивании на шейкере при комнатной температуре.

Анализ лейкоконцентрата

Спектрофотометрическим методом установлено, что количество частиц рекомбинантных векторов в препаратах опытных образцов составляло: для опытного образца Ad5/F35-VEGF – 1,8 ОЕ, для опытного образца Ad5/F35-GDNF – 2,1 ОЕ, для опытного образца Ad5/F35- NCAM – 2,5 ОЕ. Специфическая активность опытного образца Ad5/F35-VEGF составляла $2,1 \times 10^9$ БОЕ/мл, для опытного образца Ad5/F35-GDNF составляла $3,0 \times 10^9$ БОЕ/мл, опытного образца Ad5-NCAM - $1,5 \times 10^{10}$ БОЕ/мл. Уровень содержания мРНК генов-мишеней при одновременной трансдукции тремя аденовирусными векторами (MOI=10) был в 1,4 [0,1-32,5] раз выше для *vegfl65*, в 8,6 [0,1-693,5] – для *gdnf* и в 3,6 [0,1-222,5] – для *ncam1*, по сравнению с уровнем мРНК генов-мишеней в нативных лейкоцитах.

Моделирование инсульта

На первом этапе для уменьшения кровотока в виллизиевом круге перевязывали правую сонную артерию. На втором этапе доступ к средней мозговой артерии осуществлялся через трепанационное отверстие в левой височной кости. После трепанации рассекали твердую мозговую оболочку и под операционным микроскопом путем электрокоагуляции прижигали дистальные ветви средней мозговой артерии.

Превентивное введение

Мини-свиньям из опытной группы за двое суток до моделирования ишемического инсульта головного мозга под глубоким наркозом в асептических условиях через ушную вену вводили 30 мл аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантным генетическим материалом.

Лечение в острую фазу

В пределах терапевтического окна, то есть через 4 часа после моделирования инсульта головного мозга под глубоким наркозом в асептических условиях через ушную вену вводили 30 мл аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантным генетическим материалом.

Подопытные животные были разделены на три экспериментальные группы животных:

1) опытные мини-свиньи после моделирования ишемического инсульта головного мозга получили внутривенную инфузии аутологичного лейкоконцентрата, трансдуцированного Ad5/F35-VEGF165 + Ad5/F35-GDNF + Ad5/F35-NCAM1;

2) контрольные мини-свиньи после моделирования ишемического инсульта головного мозга получили внутривенную инфузии физиологического раствора;

3) интактные мини-свиньи.

Этап II – установление эффективности терапии ишемического инсульта головного мозга

Оценка терапевтической эффективности

Анализ данных о восстановлении болевой чувствительности, силы и тонуса скелетных мышц конечностей, а также двигательной активности подопытных животных после моделирования ишемического инсульта головного мозга свидетельствует о более раннем восстановлении изученных параметров у мини-свиней на фоне превентивной генной терапии с помощью внутривенной инфузии аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами *vegfl65*, *gdnf* и *ncam1*, при сравнении с контрольными животными

Патоморфометрия

(1) Головной мозг. У мини-свиней, которым внутривенно вводили аутологичный лейкоконцентрат, обогащенный репортерным геном *gfp* за 2 суток до моделирования инсульта, в левом полушарии головного мозга в очаге инфаркта были обнаружены GFP-позитивные клетки (0,3 [0,2; 0,4]). В группе животных, с введением ГМЛ через 4 часа после моделирования инсульта, количество GFP-позитивных клеток составляло 1,4 [1,2; 1,7]. В правом полушарии в обеих экспериментальных группах GFP-позитивные клетки отсутствовали.

(2) Поднижнечелюстные лимфатические узлы. В группе моделирования условия превентивной генной терапии, количество клеток составляло 0,7 [0,3; 4], а в группе с моделированием условия генной терапии в острую фазу инсульта – 1,0 [1,0; 2,0].

(3) Селезенка. В группе моделирования условия превентивной генной терапии количество GFP-позитивных клеток составляло 3,0 [2,0; 4,0], а в группе с моделированием генной терапии в острую фазу – 1,5 [1,0; 2,5].

Очаг ишемии

У контрольных мини-свиней объем инфаркта составил $0,316 \pm 0,021$ куб.см, а у животных из опытной группы — $0,122 \pm 0,037$ куб.см. Таким образом, в три раза меньший объем инфаркта мозга у мини-свиней из опытной группы свидетельствует о положительном действии превентивной клеточно-опосредованной генной терапии с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного терапевтическими генами, на сохранность ткани мозга после моделирования ишемического инсульта головного.

Патоморфология

Объем инфаркта у мини-свиней на фоне терапии в острую фазу был меньше, чем в контрольной группе. При этом в группе на фоне превентивной терапии объем инфаркта был вдвое меньше, по сравнению с контрольными животными.

1. Окраска срезов коры больших головного мозга гематоксилином-эозином.

На срезах коры больших полушарий головного мозга в контрольной группе наблюдали очаги повреждения в форме кратера. В области кратера структура коры нарушена, отсутствовали нейроны, в ткани мозга были видны участки разрежения с микрокистозными изменениями, «пенистыми» клетками, микроциркуляторными расстройствами в виде сладжей, тромбов в капиллярах и экстравазаты. Также наблюдали постнекротические изменения с оголением сосудистого русла. В поверхностных слоях наблюдали очаги деструкции с небольшой мононуклеарной инфильтрацией. В периинфарктной зоне выявлены выраженные изменения нейронов.

В отличии от контрольной группы, у животных на фоне терапии в острую фазу в зоне повреждения выявлены менее выраженные очаги деструкции, нарушения микроциркуляторного русла и отсутствие инфильтрации.

В группе с превентивной терапией очаги повреждения были существенно меньше по размерам. В зоне ишемии выявлены небольшие разрежение ткани мозга,

минимальные микрокистозные изменения и наличие единичных пикнотичных нейронов с хорошо определяемыми нейритами. Инфильтративные изменения обнаружены в прилегающей мягкой оболочке.

2. Окраска срезов коры больших головного мозга по Ниссию (толуидиновым синим).

В перинфарктной зоне коры больших полушарий животных из контрольной группы были найдены нейроны с различными признаками дегенерации: вакуолизированные/сморщенные пикнотические ядра, кариолизис, вакуолизированная цитоплазма.

3. Импрегнация серебром срезов коры больших головного мозга.

В контрольной группе в перинфарктной зоне коры больших полушарий отростки нейронов были фрагментированы или отсутствовали. У подопытных животных из группы с терапией в острую фазу и группы на фоне превентивной терапией в перинфарктной зоне больших полушарий нейроны имели хорошо сохранившиеся отростки.

4. Трехцветная окраска по Массону срезов коры больших полушарий головного мозга.

В перинфарктной зоне стенки мелких сосудов были утолщены и слоисты. Вокруг сосудов были обнаружены периваскулярные соединительные волокна по типу фиброза. В группах с генной терапией в острую фазу и превентивной генной терапией были найдены схожие изменения.

Морфометрическое исследование сосудов в перинфарктной области. Статистический анализ подсчета сосудов диаметром 5-10 мкм выявил значимое увеличение количества капилляров в группе на фоне превентивной терапии, при сравнении с интактными животными и мини-свиньями из контрольной группы ($p = 0,0415$ и $p = 0,0127$ соответственно).

Иммунофлуоресцентное исследование головного мозга.

Экспрессия белка теплового шока Hsp70 значительно повышается в условиях ишемии головного мозга, как в нейронах, так и клетках нейроглии. Уровень иммуноэкспрессии Hsp70 у животных из опытной группы составил 5,6 (4,5–5,8) и

был выше, чем у интактных (3,9 (3,6–5,0)) и контрольных (3,2 (2,7–4,9)) мини-свиней. Появление в клетках активной формы про-апоптозного белка Caspase3 свидетельствует о необратимой гибели клетки. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Caspase3 в зоне ишемического инсульта головного мозга экспериментальных мини-свиней обнаружил, что в опытной группе количество Caspase3-позитивных клеток было меньше (55,0 (52,0–59,0)), чем в контрольной группе (65,0 (62,5–69,0)).

Полученные нами данные о восстановлении двигательной активности, объеме инфаркта мозга и иммуноэкспрессии маркеров клеточного стресса и апоптоза, синаптических белков и клеток нейроглии свидетельствуют о положительном влиянии клеточно-опосредованной генной терапии с помощью аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного рекомбинантным генетическим материалом, на морфо-функциональное восстановление головного мозга после ишемического инсульта у мини-свиней.

Воспалительные медиаторы, вырабатываемые активированными микроглией, астроцитами и эндотелиальными клетками, вносят важный вклад в прогрессирование ишемических повреждений мозга. Анализ цитокинов, хемокинов и факторов роста в крови у мини-свиней через 7 и 14 дней не выявил значимых отличий между опытными и интактной группами. Через три недели эксперимента мультиплексный анализ содержания GM-CSF, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-4, и IL-8 в крови и спинномозговой жидкости также не выявил существенных различий в показателях исследуемых медиаторов воспаления во всех образцах. Таким образом, содержание основных провоспалительных (IL-1, IL-6 и TNF- α) и противовоспалительных (IL-10, IL-12) цитокинов в крови на всех сроках эксперимента и спинномозговой жидкости через 3 недели после моделирования инсульта у контрольных и мини-свиней из терапевтических групп были одинаковыми по сравнению с интактными животными. Эти данные свидетельствуют о прекращении воспалительной реакции уже на первой неделе после моделирования инсульта. Важно, что аналогичные уровни исследуемых цитокинов, хемокинов и факторов роста у контрольных и

животных из терапевтических групп могут свидетельствовать об отсутствии иммуногенного эффекта генетически модифицированных лейкоцитов, как на местном, так и системном уровнях.