

ПРИНЦИПАЛЬНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКОВЫХ БОЛЬНЫХ ПУТЕМ ГЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Борис Фукс

Каждый четвертый - пятый человек умирает от рака. Прогресс молекулярной биологии, генетики и иммунологии в течение последних лет позволил создать фантастическую технологию лечения целой группы раковых заболеваний - острых и хронических лейкозов, лимфом и, отчасти, множественной миеломы [9]. Молекулярные биологи и иммунологи только приступили к созданию аналогичной технологии лечения раков других локализаций.

К сегодняшнему достижению эти науки шли долго - с середины XX века.

Хочу назвать имена моих коллег из Москвы, чей вклад в развитие иммунологии являлся абсолютно необходимым для успеха сегодня.

Это А. Гурвич и Р. Незлин, которые рассказали на международном конгрессе в Москве в 1964 году, что молекулы антител закодированы в генах. Я был на конгрессе. Многие американские и европейские учёные уехали до окончания конгресса и принялись за работу. Многие нобелевские премии по иммунологии после этого были результатом развития этого открытия. Это и Георгий Свет-Молдавский. Он открыл лимфоциты - естественные киллеры, которые постоянно в течение всей жизни защищают нас от рака. Работа была опубликована в журнале «Nature» и открытие получило международное признание.

Профессор А. Гурвич был уволен за то, что подписал одно из тогдашних писем и затем умер от рака кишечника. Профессор Р. Незлин как отказник в течение 10 лет оказался изолированным и работал с одним лаборантом, а затем эмигрировал в Израиль. Доктор наук Свет-Молдавский заболел миелолейкозом, был отпущен на лечение в США, где и умер. Сегодня его могли бы вылечить.

Российские учёные не смогли внести вклад в молекулярную биологию и генетику, сравнимый с вкладом в иммунологию. Причины известны. Сегодня там чиновники также руководят наукой.

Итак, что сделано к сегодняшнему дню в США [1,2]?

Если говорить предельно кратко: на поверхности опухолевых клеток разных лейкозов нашли белок, который назвали CD19. Получили моноклональное антитело к этому белку.

Сконструировали новый ген из отрезка ДНК, кодирующего это антитело, и ДНК, кодирующей сигнальные белки Т-лимфоцита человека. Далее пересадили этот ген в ядра Т-лимфоцитов, взятые у больного лейкозом. Размножили эти лимфоциты в культуре и ввели этому больному. Т-лимфоциты атаковали опухолевые клетки и уничтожили их. Больной выздоровел. Иногда это был терминальный, т.е. умирающий больной.

Таким образом, человек без помощи высшего разума из природных материалов сконструировал новый активный механизм внутри живой клетки и затем внутри организма человека. Это спасло его жизнь. В США от таких болезней ежегодно умирает 24 тысячи человек.

Добавим, что сконструировали ген, который кодирует молекулу высокоаффинного антитела и Т-лимфоцит-киллер, снабжённый таким геном и его продуктом антителом-рецептором. В этой работе был элемент везения: только на поверхности клеток всех вариантов лейкозов, лимфом и множественной миеломы была обнаружена молекула-мишень CD19. Поэтому сегодня мы имеем группы пациентов, в которых большинство больных достигли полного излечения. Пока срок наблюдения 3-4 года.

Теперь ещё о деталях: белком CD19 иммунизировали мышей и использовали их клетки-продуценты высоко аффинных антител, т.е. таких, которые способны прочно связываться с белком CD19. Небольшое отступление. Прочная связь достигается, когда

рельеф поверхности активного центра антитела соответствует (конгруэнтен) рельефу участка молекулы CD19. Поверхности сближаются на расстояние, которое меньше 0.1 нанометра. Начинают действовать силы Ван-дер-Ваальса и связь молекул становится прочной. Прочной становится и связь Т-клетки с опухолевой клеткой. Это необходимо, но недостаточно, чтобы Т-клетка стала Т-киллером. Однако начинают действовать присоединённые гены сигнальных белков. Они активируют киллерную активность Т-лимфоцита. И замысел и его реализация говорят о высочайшем уровне, которого достигла биология.

Как получали ген для конструирования нового рецептора? Использовали клетки, которые продуцировали такие высокоаффинные антитела. Получали гибриды этих клеток со специальной опухолевой клеткой, т.е. получали т.н. гибридому - целую фабрику по производству одинаковых молекул антител. Из мышиной гибридомы выделяли ген, кодирующий это антитело, и соединяли его с сигнальными генами Т-лимфоцитов человека. Таким образом, создавали необычный новый ген. Его продукт - белок рецептор - chimeric antigen receptor (CAR). И, наконец, новый ген соединяли с геном ретровируса. Так чтобы ретровирус пронёс новый ген в ядра Т-клеток. Сейчас для этой цели используют также lentavirus или клеточный фермент транспозоназу.

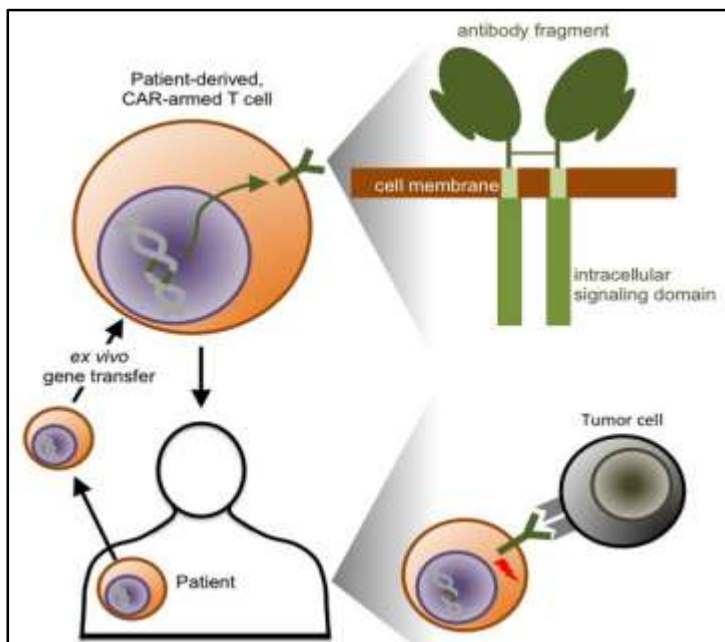


Рис. 1.

На рис 1:

- вверху справа: схема CAR - рецептора, сконструированного на генном уровне из гена активного фрагмента антитела мыши (над клеточной мембраной) и генов сигнальных белков Т-лимфоцита человека (под клеточной мембраной);
- слева внизу: у больного берут Т-лимфоциты, снабжают их CAR-рецептором (вверху слева) и затем вводят тому же больному: стрелка направленная вниз.
- справа внизу: Т-лимфоциты, снабженные CAR-рецептором, атакуют опухолевые клетки в организме больного.

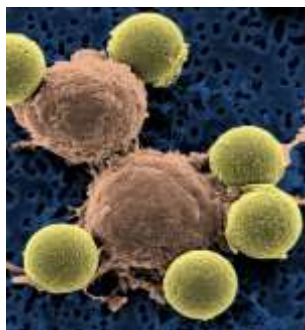


Рис.2.

На рис 2: микрофото - CAR - Т-лимфоциты атакуют опухолевые клетки множественной миеломы.

О результатах лечения. 8 декабря 2013 было опубликовано сообщение об этой работе (HealthDay Новости) [3]. На заседании общества выступил д-р Abkowitz, главный специалист по заболеваниям крови в университете Вашингтона в Сиэтле и президент Американского общества гематологов. Он сообщил, что на данный момент, более 120 пациентов с различными типами рака крови и костного мозга получили лечение генно-модифицированными Т-лимфоцитами, и что многие ушли в ремиссию и оставались в стадии ремиссии до трёх лет.

О побочных эффектах. При лечении Т-клетки освобождают цитокины, которые помогают Т-клеткам выполнять их функции. Синдром освобождения цитокинов может привести к опасно высокой температуре и падению давления крови. Но для большинства пациентов, побочные эффекты достаточно мягкие, они поддаются стероидной терапии.

Замечено, что у пациентов, испытывающих серьезные реакции, были особенно высокие уровни IL-6. Обратились к двум препаратам, которые одобрены для лечения воспалительных заболеваний, как например, ювенильный артрит: этанерцепт (ENBREL®) и тоцилизумаб (Actemra®). Последний блокирует IL-6.

19 февраля 2014 из Нью-Йорка сообщили и опубликовали в издании «Science Translational Medicine», что при таком лечении больных с advanced leukemia полная ремиссия достигается в 88% случаев [4].

Показана способность модифицированных Т-клеток к самовоспроизведению в организме реципиента. Примером служит реакция одного пациента, 64-летнего мужчины. До лечения Т-клетками его кровь и костный мозг были пропитаны опухолевыми клетками. В течение первых двух недель после лечения, казалось, ничего не изменится. Но на 14-й день пациент начал испытывать озноб, тошноту, лихорадку. Тесты в это время показали выраженное увеличение количества Т-клеток в крови, что связали с синдромом лизиса опухоли - смерти большого количества раковых клеток- и выбросом Т-клетками лимфокинов. К 28 дню, пациент выздоровел и его кровь и костный мозг не показали никаких признаков лейкоза.

Другой случай. Нику Уилкинсу диагноз лейкемия был поставлен, когда ему было 4 года. Ни химиотерапия, ни пересадка костного мозга не помогли. К 14 годам стало ясно, что все существующие способы лечения не помогают, а значит, Ник скорее всего умрет. К счастью, мальчика включили в программу лечения, разработанную в Университете Пенсильвании. Вместе с 20-ю другими молодыми пациентами Ник Уилкинс прошёл курс экспериментального лечения в Детской больнице Филадельфии. На ежегодном собрании Американского гематологического общества врачи представили доклад об успешном завершении лечения. Удивительно, но уже через 2 месяца после лечения Ник полностью избавился от рака. Из 21 пациента в этой группе у 18 наблюдалось полное излечение всего лишь после одного курса лечения.

Наконец, в 2015 году была опубликована статья группы соавторов С. Розенберга [5]. 9 пациентов имели диффузную крупноклеточную лимфому, 2 – вялую лимфому и 4 – хронический лимфолейкоз. Пациенты получали химиотерапию циклофосфамидом и флударабином с последующей однократной инфузией анти-CD19 CAR – Т-клеток. Из 15 пациентов восемь достигли полной ремиссии, четыре – частичной ремиссии, один имел стабильную лимфому, а два не поддавались оценке. CAR – Т-клетки были найдены в крови пациентов в количестве от 9 до 777 в одном μL . Авторы заключают, что это первое сообщение об успешном лечении таких лимфом анти-CD19 CAR – Т-клетками. Оно демонстрирует целесообразность и эффективность лечения злокачественных В-клеток, резистентных к химиотерапии, анти-CD19 CAR-Т-клетками.

Итак, клеточная терапия CAR-лимфоцитами показывает замечательную способность уничтожать рак в клинических исследованиях.

В марте поступило сообщение из Калифорнии о том, что фармбизнес включился в работу по этому направлению, причём программа обозначена очень широко:

SANTA MONICA, Calif., March 17, 2015 (GLOBE NEWSWIRE) – Kite Pharma, Inc., (Nasdaq: KITE), a clinical-stage biopharmaceutical company focused on developing engineered autologous T- cell therapy (eACT™) products based on CAR and TCR gene therapy platforms for the treatment of cancer.

Сейчас можно сделать следующие выводы.

1. Врач и индивидуальный организм располагают достаточным количеством Т-клеток для полного уничтожения массивной злокачественной опухоли весом до 2 фунтов.
2. Метод генной модификации Т-клеток уже позволил выйти на уровень полного излечения В-клеточных опухолей (все лейкозы, лимфомы и, отчасти, множественная миелома).

Сегодня главный вопрос, почему у меньшей части пациентов с CD19 опухолями результат лечения все же негативный и почему у пациентов с не CD19 опухолями результат лечения как правило отрицательный [6] (эти данные в настоящей статье не рассматривались). Обширные исследования с checkpoint drugs позволяют заключить, что важным фактором является подавляющее действие продуктов опухолевой клетки на поверхность Т-лимфоцита. Речь идет о проблеме опухолевой иммуносупрессии.

Моя группа в Москве смогла работать над проблемой опухолевой иммуносупрессии, к сожалению, только до 1992 года (тогда была опубликована наша статья, обобщающая результаты нескольких работ). Эта обобщающая статья, как оказалось, была переведена организацией Plenum Publishing Corporation на английский [7]. Я чисто случайно нашёл её в интернете. Из статьи следует, что несколько звеньев метаболизма лимфоцита страдают под влиянием растворимых опухолевых факторов супрессии. Факторы супрессии (СФ) прочно фиксируются на поверхности лимфоцита даже при низкой температуре. При этом мембрана лимфоцита становится проницаемой для относительно крупных молекул (до 30 kDa). Опухолевая иммуносупрессия может быть одной из важных причин неудач терапии CAR-T –лимфоцитами.

В наших экспериментах иммуносупрессию удавалось отменить (8) с помощью ТРА-активатора протеинкиназы С (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate) и ионофора Са-иономицина в низких концентрациях - 10-7М–10-9М и особенно с помощью комбинации этих препаратов также в низких концентрациях. Однако такой подход в клинической терапии вряд ли применим, имея в виду то, что факторы супрессии прочно фиксируются на поверхности лимфоцита даже на холоде. Известна также сложность проблемы использования новых лекарственных препаратов в организме. Приходится, очевидно, ориентироваться на поиск методов связывания и инактивации СФ до того, как они достигли поверхности CAR-T-лимфоцита. Например, можно использовать коктейли моноклональных гуманизированных антител против охарактеризованных факторов супрессии. Это большая и сложная работа. Однако уже сейчас широко используется для терапии опухолей группа моноклональных антител, деблокирующих Т-лимфоциты (checkpoint drugs). При этом также происходит связывание каких-то факторов супрессии. Поэтому целесообразно уже сегодня использовать комбинацию CAR-T-лимфоцитов и checkpoint drugs.

Мы могли также видеть, что от количественного соотношения лимфоцитов естественных киллеров и изолированных опухолевых клеток *in vitro* зависело выживание тех или других. Действительно, когда лимфоцит естественный киллер оказывался в окружении нескольких опухолевых клеток, его мембрана становилась проницаемой для относительно крупных молекул и наблюдался гидролиз части его цитоплазматической РНК. Аналогичные опыты, в которых CAR-T-лимфоциты и соответствующие изолированные опухолевые клетки взаимодействовали бы *in vitro*, могут помочь не только решению проблемы факторов опухолевой супрессии, но и помогут косвенно оценить роль такого препятствия для терапии, как стенка капилляров, и прямо оценить негативную роль компактного расположения клеток и наличия СФ в солидных опухолях. В солидных не CD19 опухолях присутствует барьер-стенка капилляров. Кроме того, между стенкой капилляра и опухолевой клеткой и в самой ткани опухоли накапливаются опухолевые иммуносупрессорные факторы. Сказанное выше, в частности, заставляет предположить, что CAR-T-лимфоциты, разобщенно проникшие в компактный узел опухоли, могут быть инактивированы опухолевыми супрессорными факторами. Возможно, что максимальный терапевтический успех в отношении CD19 опухолей может объясняться тем, что опухолевые клетки свободно циркулируют в крови и лимфе и не единичные CAR-T-лимфоциты легко вступают с ними в контакт. Т.е. важная особенность терапии В-клеточных опухолей костного мозга (лейкозы и др.) – это доступность их клеток для прямого контакта с генно-модифицированными Т-лимфоцитами. При работе с опухолями

разных локализаций приходится пользоваться другими белками-антигенами поверхности опухолевых клеток (вместо CD19), которые представлены и на поверхности нормальных клеток соответствующих органов. Генно-модифицированные Т- лимфоциты будут их также атаковать. Описаны случаи выраженного энтероколита при такой терапии опухоли кишечника и даже смертельные случаи [6]. Это наиболее серьезное препятствие на пути прогресса нового направления.

Если важным негативным посредником взаимодействия генно-модифицированных Т-лимфоцитов и опухолевых клеток являются СФ, то, только исследуя количественно соотношение взаимодействующих Т-модифицированных лимфоцитов и опухолевых клеток, можно подойти к ответу на вопрос о роли СФ и искать подходы к преодолению их действия. Итак, возникает задача создания смеси веществ, способной подавить супрессорную активность опухолевых клеток в организме больного, и только после этого ввести Т-модифицированные лимфоциты. Нужно чтобы эта смесь действовала достаточно долго на опухоль и не действовала негативно на Т-модифицированные лимфоциты.

От решения этих не простых задач зависит решение проблемы радикальной терапии раковых опухолей генно-модифицированными Т-лимфоцитами.

В интернете опубликованы два сообщения, представляющие интерес для широкой публики.

1. **If you are interested in chronic lymphocytic leukemia or acute lymphoblastic leukemia treatment at Penn, or to schedule an appointment with a cancer physician specializing in immunotherapy, call 800-789-PENN (7366) or request an appointment online.**
2. **The gene therapy must be made individually for each patient, and lab costs now are about \$25,000, without a profit margin. That's still less than many drugs to treat these diseases and far less than a transplant.**

Источники

1. Kochenderfer J. N., Rosenberg S. A., Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 May; 10(5): 267-76.
2. Kochenderfer J. N., Feldman S. A., Yangbing Zhao et al. Construction and Pre-clinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J. Immunother*. 2009 Sep; 32(7): 689–702.
3. HealthDay Новости. 8 декабря 2013.
4. Marco L. Davila I. et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science Translational Medicine* 19 Vol.6, Issue 224, pp. 224ra25, Feb 2014.
5. Kochenderfer J. N., Dudley M. E., Kassim S. H. et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T- cells expressing an anti-CD19. *J. Clin Oncol*. 2015 Feb 20; 33(6):540-9, 25.
6. Kershaw M.H., Westwood J. A, Slaney C. Y. and Darcy P. K , Clinical application of genetically modified T- cells in cancer therapy. Review. *Clinical & Translational Immunology* (2014) 3, e16; Published online 16 May 2014.
7. Medvedev A. E., Fuks B. B., Rakhmievich A. L., A Study of the action of tumor immunosuppressing factors on lymphocytes and macrophages in vitro and on graft-versus-host reaction in mice". *Biomed. Science, London*, 1990, v.1, pp.261-266, PubMed - indexed for MEDLINE.
8. Fuks B. B., Klaamas K. V., Rakhmievich A.L., Study of the possibility to abolish the action of immunosuppressive factors of tumor cells. *Biull. Eksp. Biol. Med*. 1992 Apr; 113 (4): 389-92. Translated by Plenum Publishing Corporation 1992.
9. The annual meeting of the American Society of Hematology (ASH) 2013. Multiple Myeloma T- Cell Treatment, Working in Trial.