

Прорыв в клеточный космос

Благодаря таланту белорусских ученых у онкопациентов с лимфомой появился реальный шанс на выздоровление



Ученые всего мира сейчас сосредоточены на поиске способов применения CAR-T-клеточной терапии в лечении разных видов рака. Создатели технологии зарабатывают огромные деньги, предлагая биоматериал, из которого получают антигены, так называемые клетки-киллеры, используемые при такой терапии. Наши исследователи применили свой способ их выращивания. Пациенты с тяжелой формой заболевания, которым стандартные методы лечения не помогли, обрели надежду на полноценную жизнь.

Человеческий организм – это без преувеличения целая вселенная со своими законами и правилами существования. Все в нем сложно взаимосвязано и слаженно работает, и нет ничего лишнего: даже у микроскопической клетки – своя миссия. Например, антигены активируют иммунную систему для эффективной борьбы с болезнями. В этом главная функция органов и клеток иммунной системы – защищать целостность и биологическую индивидуальность нашего организма. Как бдительные дозорные, они всегда на страже, чтобы вовремя распознать все вредоносное, что в него попадает.

Так же действует наша иммунная система и в отношении раковых клеток – обнаружив их в организме, дает команду уничтожить. Т-лимфоциты – разно-

видность белых кровяных клеток, их еще называют «клетки-киллеры», помогают иммунной системе распознать, какие антигены чужие и представляют угрозу для организма. Но когда иммунитет теряет механизмы контроля, он словно заторможен, не может распознать «чужаков» или не так эффективно на них реагирует. Опухоль в свою очередь делает все возможное, чтобы ее не заметили до поры до времени, и пытается блокировать активность иммунной системы: включает механизмы защиты, которые не позволяют Т-лимфоцитам осуществить свою миссию. И тогда, даже распознав раковую клетку, Т-лимфоцит может не получить сигнал на ее уничтожение, впасть в состояние апатии, безразличия. И в какой-то неблагоприятный момент

раковая опухоль берет реванш, болезнь начинает прогрессировать.

Ученые всего мира ищут новые способы борьбы с онкологическими заболеваниями и не оставляют надежды когда-нибудь победить рак, продолжают изучать возможности и способности организма человека к самоисцелению. После того как мировые научные исследования вышли на молекулярный уровень, был совершен ряд прорывных открытий, удостоенных Нобелевских премий, в медицине начали развиваться новые направления. В том числе и в лечении злокачественных опухолей с помощью собственного биоматериала человека. Один из таких перспективных методов – CAR-T-терапия (аббревиатура английских слов chimeric antigen receptor – химерный антигенный рецептор).

В основе терапии – использование лимфоцитов человека для перепрограммирования их против опухолевых клеток. Химерный антигенный рецептор создается молекулярно-биологическими методами. В лабораторных условиях Т-лимфоциты, выделенные из крови пациента, помещаются в клеточную культуру, чтобы стимулировать деление. Затем их генетически модифицируют: вводят в геном клетки генетическую конструкцию, которая кодирует искусственно собранный рецептор (CAR). Этот рецептор распознает белок CD 19, который есть на мембране всех В-лимфоцитов. Ученые называют белок мишенью, он помогает киллерам распознать клетки, которые нужно уничтожить. Что они и делают, когда их вводят больному.



Заместитель директора по лечебной работе РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова Сергей Мавричев убежден: современная медицина – в преддверии колоссальных изменений в лечении онкозаболеваний

CAR-T-лимфоциты (клетки-киллеры) уничтожают все В-лимфоциты – и опухолевые, и здоровые. Киллеры, выполнив свою миссию, тоже погибают и выводятся из организма.

Такой способ изготовления индивидуального для каждого пациента лекарства достаточно сложный и финансово затратный, и применяется пока только в лечении В-клеточных лейкозов и лимфом. К несомненным преимуществам клеточной терапии относится ее эффективность, минимальные побочные эффекты и совместимость с традиционной химиотерапией.

Скульптурная композиция на территории РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова символизирует уважение к нелегкому труду медиков и надежду на спасение для тех, кто проходит здесь лечение



– CAR-T-клеточная терапия разработана на Западе и применяется относительно недавно. Очень перспективное направление, но само лечение слишком дорогостоящее. В компании, одной из первых предложивших такой вид терапии, это стоит порядка 500 тысяч долларов, – говорит заместитель директора по лечебной работе Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, доктор медицинских наук, онколог-хирург Сергей Мавричев.

Создатели технологии зарабатывают огромные деньги, предлагая свой коммерческий продукт – «строительный» биоматериал, на основе которого в лабораторных условиях можно формировать химерные антигены для CAR-T-клеточной терапии. Стоимость предлагаемого лечения с применением такой терапии в клиниках Европы и США – от 200 до 500 тысяч долларов.

– Но наши талантливые ученые применили свой способ выращивания клеток-киллеров. Скажу откровенно, еще лет пять назад, читая о CAR-T-клеточной терапии, думал: космос какой-то, когда это еще станет возможным! Даже у наших коллег в России, несмотря на их опыт и успехи в науке, этого

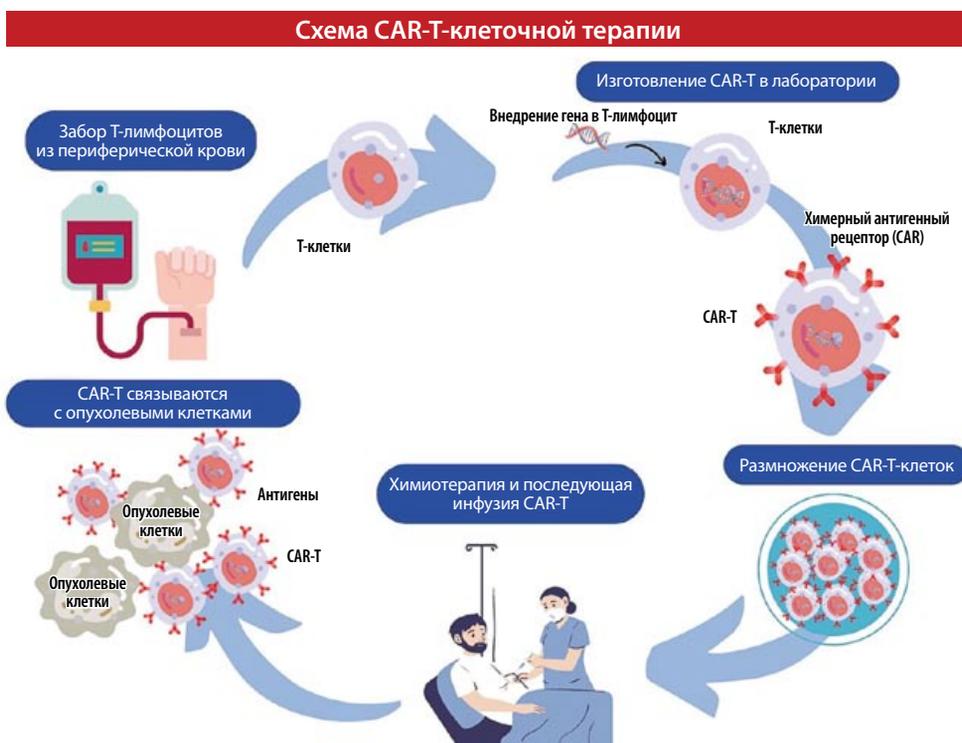
нет, а у нас есть! – с гордостью за своих констатирует Сергей Анатольевич.

Когда российские онкологи узнали, что в Беларуси можно пройти CAR-T-терапию, стали рекомендовать своим пациентам.

«Первый успех открыли и болеющих, и врачующих».

– Сегодня буквально каждую неделю кто-нибудь из российских граждан приезжает к нам в центр на терапию. Конечно, еще есть сложности и свои нюансы, мы только в начале пути, но для нашей медицины это большой прорыв, – подчеркивает Сергей Анатольевич и сравнивает первые шаги наших ученых в этом направлении с открытием электричества в свое время: когда тускло горящая первая лампочка была для людей сродни чуду, а позже стала для всех обыденностью.

– Думаю, что и мы также станем свидетелями исторических событий в сфере лечения онкологических заболеваний. Пока эта терапия применима в лечении однородных опухолей, лейкозов и лимфом. А опухоли, как известно, генетически очень разнообразны.



Поэтому ученые всего мира сейчас сосредоточены на поиске способов применения CAR-T-терапии в лечении разных видов рака. И у нас уже ведутся научные исследования по разработке, например, CAR-T-клеток, нацеленных на антиген CD 30, – поясняет Сергей Мавричев. – И если ученые смогут разработать всю гамму опухолевых рецепторов, то в будущем мы получим мульти-CAR-T-клеточную терапию, которую можно применять при различных видах раковых опухолей. Уверен также, что мы находимся на пороге эволюционного скачка в лечении онкологических заболеваний за счет собственного иммунитета, ученые уже пытаются совместить иммунотерапию с CAR-T-терапией.

Модификация вирусами

Разработкой CAR-T-клеточного продукта в Беларуси первыми занялись сотрудники лаборатории генетических биотехнологий РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (ДОГИ) совместно с коллегами из Института биоорганической химии НАН. Вместе они создавали банк научного проекта по получению химерного антигенного рецептора, в котором РНПЦ ДОГИ были соисполнителями, а головной организацией – Институт биоорганической химии. В лаборатории генетических биотехнологий активно занимались антивирусной трансдукцией – модификацией клеток с помощью вирусов. Но получить необходимый рецептор – белок как генетическую конструкцию, из которого потом производится вирус, было для сотрудников лаборатории сложной задачей, с ней успешно справились коллеги из института, которые занимаются белковой биохимией.

У детских онкологов сегодня уже есть опыт эффективного лечения тяжелобольных маленьких пациентов. Клиническая апробация нового метода лечения острого лимфобластного лейкоза (злокачественное заболевание крови и костного мозга у детей) началась в центре детской онкологии осенью 2020 года. Терапия хорошо зарекомендовала себя в лечении лейкозов. CAR-T- терапия с использованием рецептора CD 19, которая применялась для лечения лейкозов у детей, подошла и для лечения



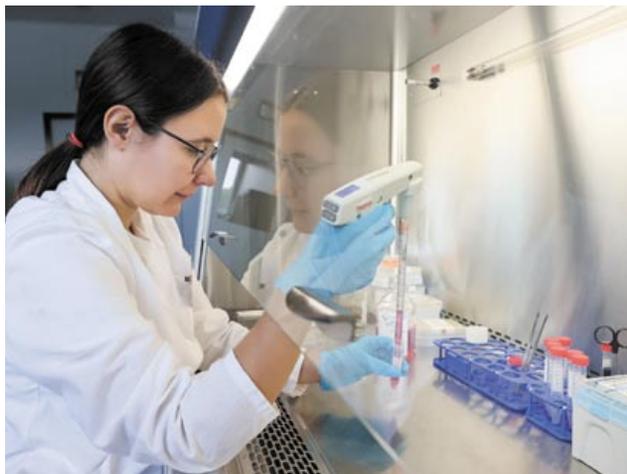
Заведующая отделением, где размещаются иностранные граждане, которые проходят CAR-T-клеточную терапию, Татьяна Иваницкая (справа) и врач-химиотерапевт отдела противоопухолевой и лекарственной терапии Ольга Каленик

некоторых видов лимфом у взрослых. В 2021 году начались клинические испытания CAR-T-терапии в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова. Первый успех окрылил и болеющих, и лечащих: у 12 пациентов опухоль ушла полностью. А это 80 % тех, кто ее проходил в центре, среди них и белорусы, и граждане России. И у всех без исключения, получивших терапию, был достигнут, как выражаются медики, положительнотерапевтический эффект.

«Килограммы опухоли у пациентки ушли полностью».

– Мы применили CAR-T-терапию для лечения лимфом, которые не чувствительны к химиотерапии первой, второй и третьей линий, то есть когда испробовано все возможное. Раньше на этом этапе заболевания мы не могли предложить таким пациентам никакого лечения, но сегодня ситуация меняется, – рассказывает врач-химиотерапевт отдела противоопухолевой и лекарственной терапии, ведущий научный сотрудник РНПЦ, кандидат медицинских наук Ольга Каленик.

Пациенты, которым предложили в центре пройти терапию, на тот момент были уходящие, с



Клеточный биолог Надежда Боброва в бактериально-вирусной кухне лаборатории, где выращивают клеточный продукт для CAR-T-терапии



Биолог Игорь Северин: лаборатория оснащена специальным криоборудованием для длительного хранения и консервации биоматериала

последней стадией заболевания. При этом, подчеркивает врач, в основном молодые люди от 20 до 35 лет с химиорезистентной лимфомой: она встречается не так уж и часто, но именно у молодых ведет себя крайне агрессивно. Болезнь быстро прогрессирует, иммунитет не справляется, опухоль растет.

У одной из таких пациенток из Беларуси, молодой женщины 35 лет, изначально была диагностирована высокозлокачественная и крайне агрессивная форма лимфомы 4 стадии.

– Провели несколько курсов химиотерапии, первая – стандартная, которая сочетается с самым высоким процентом ответа, но в ее случае эффекта не было, – поясняет Ольга Александровна. – В течение шести месяцев произвели три смены курсов химиотерапии, а на контрольном обследовании мы получаем не то чтобы стабилизацию – прогрессирование заболевания, появление новых очагов поражения. Резко ухудшилось и общее состояние пациентки.

Тем не менее можно сказать, что ей повезло: женщине предложили пройти курс CAR-T-терапии.

– Перенесла она ее в целом удовлетворительно, с некоторыми нюансами, но самое главное: мы делаем контрольное обследование – КТ и получаем поразительный результат – злокачественной опухоли нет! И это при том, что у нее была очень большая опу-

холевая нагрузка. Чтобы вам проще представить – килограммы опухоли! Так вот вся эта нагрузка ушла полностью. Уже более шести месяцев пациентка у нас наблюдается, делаем периодические осмотры, компьютерную томографию – она здорова!

«Мы находимся на пороге эволюционного скачка в лечении онкологических заболеваний за счет собственного иммунитета».

В такой ситуации это действительно чудо, иначе не скажешь! Важно отметить и то, что для белорусских пациентов терапия проведена бесплатно (для иностранных граждан – на платной основе).

– Еще примеры: два пациента, у которых не было ответа на первые стандартные линии химиотерапии, – продолжает Ольга Александровна. – Им была проведена так называемая высокодозная химиотерапия с трансплантацией собственных клеток костного мозга. Но и после такого серьезного лечения болезнь прогрессировала. Мы тоже взяли их на CAR-T-терапию, после которой получили результаты с полным эффектом.

Отрадно и то, что тенденция в мире стремительно меняется, подчеркивает врач, CAR-T-терапию применяют уже не только в случаях рецидива

болезни и после того, как пациента пролечили и ничего не помогло:

– У нас тоже есть идеи пробовать передвигать ее на вторую линию химиотерапии, и даже на первую. В дальнейшем будем использовать CAR-T-терапию на более ранних сроках болезни, при таких патологиях лимфом, которые другим видам лечения не поддаются.

Уточняя у врача, как проходит CAR-T-терапия и сколько времени занимает:

– Процесс этот длительный. Первый его этап – аферез. Когда у пациента берут кровь для последующей модификации – это уже второй этап, он длится примерно 14 дней, в течение которых в нашей молекулярно-генетической лаборатории изготавливается клеточный продукт. А мы в это время готовим пациента к непосредственной процедуре – проводим специальную химиотерапию. Она направлена на то, чтобы количество лимфоцитов, которые есть у пациента в крови, уменьшить до минимального уровня, чтобы они модифицированным лимфоцитам, которые введем позже, не мешали выполнить свою работу, – поясняет Ольга Александровна. – Следующий этап – применение клеточного продукта, он вводится методом внутривенной инфузии (капельницы). Все это время пациент находится в стационаре, мы ежедневно контролируем целый ряд лабораторных показателей, его самочувствие. Проводим сопроводительную терапию. Все это занимает около месяца. Затем пациент может быть выписан домой, но мы продолжаем контроль за состоянием его здоровья: он приезжает на периодические осмотры, сдает анализы, КТ. У одного из первых пациентов, который прошел у нас в центре CAR-T-терапию, ремиссия полтора года. И это большая победа!

«Наивные» лимфоциты

Чтобы узнать, как готовят CAR-T-продукт, мы побывали в Республиканской молекулярно-генетической лаборатории канцерогенеза. Это одно из подразделений РНПЦ, но и сама лаборатория – большой многопрофильный центр, где выполняются самые современные исследования широкого спектра.

– У нас шесть клиничко-диагностических онкологических отделений: генетики, клеточных технологий, вирусологии, иммунологии, иммуноморфологии и протеомики, есть также кабинет медико-генетического консультирования, куда могут обратиться люди с наследственными рисками, получить квалифицированную помощь, если надо – пройти обследование, – рассказывает заведующая лабораторией доктор медицинских наук Анна Портянко.



Заведующая
Республиканской
молекулярно-генетической
лабораторией канцерогенеза
Анна Портянко

В лаборатории, поскольку она республиканская, концентрируются все исследования, касающиеся молекулярной генетики в опухолях. Сегодня опухоли, которые раньше считались одними и теми же, подразделяются на разные молекулярные классы, поясняет Анна Сергеевна. Молекулярная генетика уже смещает патологическую анатомию с ключевых позиций в постановке диагноза. Квалифицированные специалисты лаборатории, используя современные технологии, выполняют на молекулярном уровне исследования с высокой долей чувствительности, специфичности и достоверности.

Здесь проводят клинические исследования для дифференциальной диагностики, назначения и мониторинга терапии злокачественных новообразований с учетом биологических особенностей опухоли. Сотрудники лаборатории создают биомедицинские продукты для иммунотерапии, а также диагностические наборы реагентов, стандартов и калибраторов для молекулярно-генетических исследований и др. И помимо этого, участвуют в научно-исследовательских разработках. Именно благодаря талантливым людям, подчеркивает руководитель лаборатории, которые работают в их центре и в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, а также в Институте биоорганической химии, Институте генетики и других научных учреждениях, с которыми у них много совместных проектов, создаются и клеточный продукт для CAR-T-терапии, и другие препараты.

– Нужны дорогостоящие оборудование и реагенты, но важнее наличие талантливых людей, мотивированных на результаты и желание помогать людям, – подчеркивает Анна Сергеевна. – Лечение В-клеточных опухолей – успех, который хотелось бы повторить в отношении солидных опухолей. Мы тоже участвуем в научном поиске: у нас есть несколько перспективных мишеней, которые будем апробировать, создавать вместе с сотрудниками Института биоорганической химии молекулярный конструктор и тестировать на разных клеточных линиях.

Сотрудники онкологического отделения клеточных технологий очень востребованные специалисты. Они занимаются не только диагностикой, но и непосредственно участвуют в лечебном процессе. В лаборатории проводят цитогенетический FISH-анализ, исследования для постановки и уточнения диагноза, для подбора таргетной терапии для лечения пациентов с раком легкого, молочной железы и других заболеваний. Специалисты отделения создают дендритные клетки для иммунотерапии. Их выращивают из моноцитов пациента (клетки – регуляторы противоопухолевого иммунитета). У людей с онкологическими заболеваниями они функционально неполноценны, поэтому их в лабораторных условиях выращивают до состояния зрелости и активности, чтобы они могли эффективно выполнять свою функцию в организме пациента.

В отделении изготавливают и клеточный продукт для CAR-T-терапии. Процесс начинается с афереза: на специальном аппарате кровь пациента пропускают через несколько фильтров, и обогащенная лимфоцитами она поступает в отделение клеточных технологий. Для производства CAR-T-клеточного продукта нужны юные, как их называют биологи, «наивные» лимфоциты.

– Мы получаем уже обогащенную фракцию. Клеточный продукт делим методом иммуно-магнитной сепарации – Т-лимфоциты двух рецепторов CD 4 и CD 8, обе эти популяции нам необходимы, – рассказывает заведующий онкологическим отделением клеточных технологий, кандидат биологических наук Татьяна Дорошенко. – Далее создаем им особые условия культивирования, где в ростовую среду

добавляются еще человеческие цитокины – факторы, чтобы клетки могли делиться. И потом вносим туда собственно генетический материал химерного антигенного рецептора. Делаем это путем вирусной трансдукции: генетический материал привносит в клетку вирус, точнее вирусный вектор, который несет генетическую конструкцию химерного антигенного рецептора.

Вирус нарабатывают в особой клеточной культуре, для этого в лаборатории есть специальная бактериально-вирусная кухня. Этот достаточно сложный процесс занимает несколько недель.

– Вирусы можно накапливать в замороженном состоянии, что позволяет нам сократить сроки изготовления клеточного продукта, – поясняет Татьяна Михайловна.

«Сотрудники онкологического отделения клеточных технологий очень востребованные специалисты».

Для создания банка клеток и тканей, их консервации и хранения есть также современное криооборудование, где биоматериал в жидком азоте может находиться в течение многих лет.

Как говорит заведующая, отделение имеет возможность произвести в месяц 6 клеточных продуктов для CAR-T-терапии. Больше – не позволяя мощности, для массового производства нужны промышленные условия.

– После трансдукции «наивные» клетки около 10 дней, что называется, приходят в себя и начинают делиться, – продолжает Татьяна Михайловна. – То есть это уже те клетки, которые получили генетическую модификацию. Далее наработка биомассы. После того как клетки выросли, это ровно две недели после афереза, производим контроль качества продукта на жизнеспособность, стерильность и состав. Оцениваем по составу клеточных молекул поверхность клеток, убеждаемся, что это именно CAR-T-клетка. Часть лимфоцитов всегда остается немодифицированной, 100 % никогда не бывает, а, как правило, 20–30 % клеток, но на эффективность лечения это не влияет.



Сотрудники отделения активно занимаются и научными исследованиями, задействованы во многих научных разработках. Сейчас, например, участвуют в проекте по разработке CAR-T-лимфоцитов, нацеленных на антиген CD 30, для лечения лимфомы Ходжкина.

– Эти опухоли лучше поддаются лечению, но есть примерно 20 % пациентов, кто рефрактерен – им не помогает химиотерапия. Это связано скорее с индивидуальной биологией опухолевой клетки и для таких пациентов CAR-T-клеточный продукт может стать реальным спасением, – говорит Татьяна Михайловна. – Сейчас также на этапе прохождения всех необходимых процедур одобрения проект по созданию продукта для лечения солидных опухолей.

Еще нигде в мире CAR-T-клеточный продукт для лечения лимфомы Ходжкина не одобрен регуляторами здравоохранения, включая США и Европейский союз, не применяется пока такая терапия и в отношении солидных опухолей. С последними особенно сложно, слишком много подводных камней.

– Если гематологические опухоли и лимфомы генетически однородны, то солидные очень разнообразны. При солидных опухолях очень часто антигены, которые есть на опухоли, присутствуют и на здоровых тканях. Поэтому в разрабатываемом сейчас проекте мы выбрали антиген, присутствующий только на жировых клетках здоровых тканей и на очень многих опухолях, – поясняет Татьяна Михайловна. – Есть и другие препятствия, из-за которых CAR-T-терапия в отношении солидных опухолей не эффективна: снижена миграция клеток и проникнуть в солидную опухоль сложно, она ведь тоже защищается и перепрограммирует микроокружение так, чтобы выжить. Поэтому предусматриваем такие CAR-T-клетки, которые уже будут защищены от влияния опухолевого окружения. Если получится – это будет большой прорыв в лечении.

Лечение лимфомы Ходжкина с применением CAR-T-клеток, нацеленных на молекулу CD 30 и вооруженных против влияния опухолевого микроокружения, – новаторская идея клеточных биологов РНПЦ онкологии и медицинской радиологии име-



Заведующая онкологическим отделением клеточных технологий Татьяна Дорошенко вместе с коллегами активно участвует в научных разработках и проектах

ни Н.Н. Александрова с коллегами из РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии и Института биоорганической химии НАН Беларуси. Задача академических ученых-биохимиков – сделать кольцевую ДНК, которая может воспроизводиться в бактериях, а клеточные биологи в лаборатории онкологического центра потом смогут наращивать эту плазмиду и использовать в клеточной терапии. Институт биоорганической химии является ведущим научным учреждением по созданию молекулярных конструкторов. О направлениях его работы и научных достижениях мы недавно подробно рассказывали в рамках нашего проекта «Жизнь замечательных идей» («Только смелым покоряется геном», № 5, 2023 г.). Будем надеяться, что и с новой задачей они успешно справятся. Пожелаем нашим ученым удачи! И не только потому, что приятно и престижно быть первыми в науке, главное – опыт и талант биологов, химиков и онкологов послужит спасению жизни.

Анна МАСЛЯКОВА

**Фото Татьяны МАТУСЕВИЧ,
из архива РНПЦ онкологии и медицинской
радиологии имени Н.Н. Александрова**

■ Проект создан за счет средств целевого сбора на производство национального контента