

Генно-клеточная терапия стимулирования нейрорегенерации при травме спинного мозга

Актуальность

Проблема терапии нейродегенеративных заболеваний и нейротравм остаётся одной из актуальных в фундаментальной и практической медицине. Эти состояния сопровождаются гибелью нейронов, дегенерацией аксонов и нарушением функции иннервируемой ткани-мишени. Больные получают симптоматическое лечение, которое существенно не повышает качество жизни и не продлевает ее продолжительность. Результаты преодоления последствий нейродегенерации и стимулирование нейрорегенерации в ходе лечения больных с проявлениями нейродегенерации крайне неудовлетворительны и требуют разработки и внедрения новых терапевтических протоколов. Повышение эффективности сдерживания дегенерации, нейропротекции, поддержания роста нервных волокон и восстановления нервных связей связывают с применением современных молекулярно-генетических подходов. Необходимость разработки технологии получения генно-инженерных лекарственных препаратов подкрепляется соображениями общего характера. Во-первых, исследования в области генно-клеточных технологий для практической медицины за рубежом в большинстве случаев не доведены до промышленного производства. Во-вторых, законченные разработкой в этой области технологии и ноухау будут стоить чрезвычайно дорого. Представляется очевидным, что в долгосрочной перспективе их стоимость будет значительно превышать те затраты, которые необходимы для формирования и развития данного инновационного направления в России

Стадия развития проекта

Настоящее исследование является научным поиском новых генных, клеточных и генно-клеточных лекарственных средств для регенеративной медицины в рамках Федеральной Целевой Программы Министерства образования и науки РФ по приоритетному направлению «Живые системы» (№ 02.442.11.7319 (2006 г.), № 02.512.11.2052 (2007 г.), № 02.740.11.0302 (2009 г.), № 16.512.11.2101 (2011 г.)). В 2003 году в Казанском государственном медицинском университете (КГМУ) был создан банк стволовых клеток, а в 2005 году КГМУ получил лицензию Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию № 99-01-001961 на «применение новых клеточных технологий в здравоохранении». В рамках выполнения этих проектов на основе плазмидного вектора pcDNA3.1 нами получены генетические конструкции, экспрессирующие различные гены человека: эритропоэтина (pcDNAEPO), антиапоптозного белка (pcDNA-Bcl2), нейрональной молекулы адгезии L1 (pcDNA-hL1CAM), сосудистого

эндотелиального фактора роста (pcDNA-VEGF121, pcDNA-VEGF165, pcDNA-VEGF189), фактора роста фибробластов (pcDNA-FGF2), глиального нейротрофического фактора (pcDNA-GDNF), нейроглобина (pcDNA-NG). Для повышения эффективности доставки комбинаций терапевтических генов в клетки-мишени на основе двухкассетной экспрессионной плазмиды pBudCE4.1 были впервые получены плазмиды pBud-VEGF-L1CAM, FGF2-L1CAM, VEGF-FGF2, VEGF-GDNF, GDNF-FGF2, которые позволяют одновременно и независимо продуцировать две разные терапевтические молекулы. Для генных конструкций pBud-VEGF-FGF2 и pBud-VEGF-GDNF получены два патента РФ на изобретение. Коллектив имеет опыт работы по генно-клеточной терапии травматического повреждения спинного мозга крыс и бокового амиотрофического склероза на модели трансгенных мышей G93A. На модели дозированной контузионной травмы спинного мозга грызунов в нижнем грудном отделе исследовано влияние на нейрорегенерацию прямой и клеточно-опосредованной доставки генов нейротрофических и ангиогенных факторов: сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), фактора роста фибробластов 2 (FGF2) и глиального нейротрофического фактора (GDNF).

Доставку трансгенов в область травмы спинного мозга крыс осуществляли в нескольких вариантах: прямая инъекция плазмидных векторов, кодирующих гены VEGF и FGF2 (pBud-VEGF-FGF2) либо аденовирусных векторов с геном GDNF (AdV-GDNF), опосредованная мононуклеарными клетками крови пуповины человека доставка pBud-VEGF-FGF2 либо AdV-GDNF.

Полученные результаты указывают на целесообразность комбинированного применения терапевтических генов для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга (Шаймарданова и др., 2011; Мухамедшина и др., 2013). В наших исследованиях впервые показано, что мононуклеарная фракция МКПК, трансфецированная геном сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF из генома человека и геном мышинной молекулы адгезии L1 (L1CAM), введённая ретроорбитально 22–25-недельным трансгенным мышам SOD1 (мутация G93A), т.е. ещё до развития признаков заболевания, успешно мигрировали в паренхиму спинного мозга мышей, выживали более 3 месяцев и дифференцировались в эндотелиальные клетки и клетки микроглии. В следующей работе мы показали, что МКПК, трансфецированные двухкассетными плазмидными векторами pBud-EGFL1CAM были обнаружены в спинном мозге мышей G93A и, как было показано при помощи иммуофлуоресцентного анализа, также экспрессировали маркёры эндотелиальных клеток и клеток микроглии. Ещё более поздние эксперименты, проведённые в нашей лаборатории, указывают на возможную дифференцировку генетически модифицированных МКПК, трансфецированных двухкассетными плазмидными векторами pBud-VEGF-FGF2, в S100+-клетки. Полученные нами результаты по трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных клеток из крови пуповины мышам SOD1-G93A свидетельствуют о том, что трансплантированные клетки (в зависимости от типа экспрессионного

вектора в спинном мозге мышей) могут дифференцироваться в макрофаги, эндотелиальные клетки или астроциты. В последнее время терапевтический эффект генно-клеточного препарата исследуется на модели контузионной травмы спинного мозга и ишемического инсульта на мини-свиньях. Коллектив имеет богатый опыт работы с различными моделями *in vitro*, необходимыми для реализации проекта: модификации различных клеточных популяций, для исследования ангиогенного эффекта генетической конструкции, для исследования нейропротекторного действия. По результатам наших исследований можно сделать следующие выводы. Мононуклеарные клетки крови пуповины способны проникать через гематоэнцефалический барьер. Терапевтические молекулы, транзиторно сверхэкспрессируемые генетически модифицированными клетками, могут влиять на клетки-мишени по аутокринному, паракринному или эндокринному механизму. Целесообразность генетической модификации мононуклеарных клеток крови пуповины обусловлена: (1) повышением жизнеспособности трансплантированных клеток в тканях реципиента; (2) адресной доставкой специфических ростовых и трофических факторов в область дегенерации; (3) направленной дифференцировкой трансплантированных клеток в разные паренхиматозные клетки (макрофаги, эндотелиальные клетки, астроциты и др.).

По результатам исследований коллектив имеет следующие патенты РФ на изобретение: №2431669 «Способ получения лекарственного препарата генетически модифицированных клеток» и №2459630 «Способ стимулирования нейрорегенерации с помощью генетических конструкций», а также заявку на патент №2013100684/15 «Способ стимулирования регенерации спинного мозга с помощью генетически модифицированных клеток крови пуповины человека».

Научный коллектив

Число ученых – основных исполнителей (включая руководителя) - 10

В состав научной группы будет входить не менее:

2 кандидата наук в возрасте до 35 лет,

6 аспирантов и(или) студентов очной формы обучения.

План работы на 2015-2017 гг выполнения проекта

2015 г.

1. Получение в препаративных количествах рекомбинантных аденовирусных векторов с генами VEGF, GDNF и NCAM с использованием аттестованной линии клеток HEK293. Очистка и формулирование вируса будет проводиться с использованием методов, валидированных для получения препаратов на

основе рекомбинантных аденовирусных векторов для проведения доклинических и клинических исследований.

2. Получение генетически модифицированных клеток на основе моноклеарной фракции крови пуповины и аденовирусных векторов, кодирующих VEGF, GDNF и NCAM.
3. Клеточный, протеомный и транскриптомный анализ генно-клеточного препарата.

2016 г.

1. Ксенотрансплантация генетически модифицированных клеток крысам с дозированной контузионной травмой спинного мозга.
2. Ксенотрансплантация генетически модифицированных клеток мини-свиньям с дозированной контузионной травмой спинного мозга.
3. Анализ терапевтической эффективности: клинические наблюдения, поведенческие тесты, оценивающие двигательную функции у экспериментальных животных.

2017 г.

1. Иммуногистохимический анализ влияния микроокружения на выживание, миграцию, пролиферацию и дифференцировку трансплантированных клеток.
2. Морфологический, протеомный и транскриптомный анализ спинного мозга.
3. Подготовка манускрипта в зарубежные журналы с IF не менее 3-4.

Финансовая модель

Сумма расходов: ВСЕГО 21 000 000 руб

Планируемый объем финансирования проекта по годам

2015 г. – 9 млн. руб.

2016 г. – 7 млн. руб.

2017 г. – 5 млн. руб.

1 Вознаграждение исполнителям проекта 40%

2 Оплата услуг сторонних организаций 10%

3 Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (включая монтаж, пусконаладочные работы, обучение сотрудников и ремонт)
30%

4 Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования
20%

Конкурентные преимущества проекта

Конкурентами на данном этапе создания генно-клеточного препарата являются иностранные научные коллективы, завершившие доклинические исследования и приступившие к клиническим испытаниям введения терапевтических генов и трансплантации генетически модифицированных стволовых клеток для терапии травмы спинного мозга и нейродегенеративных заболеваний (Dimitrios Karussis et al., 2010; Martinez et al., 2009; Silani et al., 2009). Способ интратекальной инъекции аутологичных мезенхимных стволовых клеток из красного костного мозга при боковом амиотрофическом склерозе проходит 2 фазу клинических испытаний (Connick et al., 2012). Целесообразность применения генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины обусловлена: (1) повышением жизнеспособности трансплантированных клеток в тканях реципиента; (2) адресной доставкой специфических ростовых и трофических факторов в область дегенерации; (3) направленной дифференцировкой трансплантированных клеток в разные паренхиматозные клетки (макрофаги, эндотелиальные клетки, астроциты и др.).

Инновационность

Ожидается, что при использовании рекомбинантных аденовирусов с генами VEGF, GDNF и NCAM и генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины, сверхэкспрессирующих VEGF, GDNF и NCAM, можно будет рассчитывать на более выраженный регенераторный ответ у животных после контузионной травмы спинного мозга. Не исключено, что сверхэкспрессия трансгенов молекул стимуляторов нейрорегенерации в моноклеарных клетках крови пуповины увеличит продолжительность действия продуцируемых молекул на клетки-мишени. Полученные данные могут служить основой для разработки нового класса лекарственных средств, содержащих терапевтические гены, для лечения ряда социально-значимых заболеваний человека, к которым относятся нейродегенеративные заболевания, ишемические инсульты и травма спинного мозга. На основании экспериментов с доставкой терапевтических генов разными способами (прямая генная терапия, клеточно-опосредованная терапия и комбинированная: прямая + клеточно-опосредованная) будет выявлен наиболее эффективный способ введения в организм терапевтических генов.

Информация о профильных публикациях, грантах

Гранты

1. Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере ГК № 7858/10398 по теме: «Новый лекарственный препарат на основе стволовых клеток крови пуповины человека для лечения бокового амиотрофического склероза», 2010 г.
2. ФЦНТП ГК № 16.512.11.2101 по теме: «Генные и клеточные технологии для стимулирования регенерации в ЦНС», 2011-2012 гг.
3. Грант ОПТЭК 2012 г. «Выживание и дифференцировка мигрирующих в спинной мозг эндогенных шванновских клеток под влиянием нейротрофических факторов»
4. Грант Президента РФ для молодых ученых МК-760.2011.4 "Клеточно-молекулярные механизмы дисфункции периферических возбудимых структур при нейродегенеративных заболеваниях" (2011-2012).
5. Грант Минобрнауки России (соглашение №8791) «Разработка генно-клеточных подходов для лечения болезни Альцгеймера» в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», (2012-2013).
6. Грант Минобрнауки России (соглашение № 8070) «Молекулярные механизмы регуляции синаптических функций в норме и при патологии нервной системы» в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», (2012-2013).
7. Грант РФФИ «Стимулирование нейрорегенерации при болезни Альцгеймера» (2013-2014).
8. Грант РФФИ № 13-04-02057 «Синаптическая дисфункция при нейродегенеративных заболеваниях» (2013-2015)
9. Грант РФФИ по поддержке ведущих молодежных коллективов № 12-04-33195 "Молекулярные механизмы дисфункции возбудимых структур при патологии нервной системы" (2013-2014).
10. Грант РФФИ №14-04-31246 мол_а (2014-2015 г.) "Фенотипическая характеристика и поведение эндогенных шванновских клеток в области травмы спинного мозга в условиях прямой и клеточно-опосредованной генной терапии."

Публикации

1. Rizvanov A.A., Kiyasov A.P., Gaziziov I.M., Yilmaz T.S., Kaligin M.S., Andreeva D.I., Shafigullina A.K., Guseva D.S., Kiselev S.L., Matin K., Palotás A., Islamov R.R. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF and L(1)CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neurotrophic factors to support neurogenesis a novel approach in stem cell therapy. *Neurochem Int.* 2008. 53, № 6-8. 389-394.

2. Rizvanov AA, Muchamediarov MA., Palotás A., Islamov RR. Retrogradely transported siRNA silences human mutant SOD1 in spinal cord motor neurons // *Experimental Brain Research*. – 2009. - May; 195
3. Ризванов А.А., Гусева Д.С., Салафутдинов И.И., Кудряшова Н.В., Шафигуллина А.К., Баширов Ф.В., Газизов И.М., Калигин М.С., Киясов А.П., Исламов Р.Р. Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза мононуклеарными клетками пуповинной крови человека, трансфицированными генами нейронной молекулы адгезии L1CAM и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010. Т.5, №4. 55-65.
4. Rizvanov A.A., Gulluoglu S., Yalvaç M.E., Palotás A., Islamov R.R. RNA Interference and Amyotrophic Lateral Sclerosis // *Current Drug Metabolism*. – 2011. – Vol. 12. – №7. – P. 679-83.
5. Rizvanov A.A. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing VEGF and FGF2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis (ALS) transgenic mice /A.A. Rizvanov, D.S. Guseva, I. I. Salafutdinov, N.V. Kudryashova, F.V. Bashirov, A.P. Kiyasov, M.E.Yalvaç, I.M. Gazizov, M.S. Kaligin, M.A. Mukhamedyarov, A. Palotás, R.R. Islamov // *Experimental Biology and Medicine*. – 2011. – Vol. 236, № 1. – P. 91-98.
6. Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов, О.В. Тяпкина, Б.С. Шенкман, И.Б. Козловская, Е.Е. Никольский, А.И. Григорьев. Полногеномное исследование экспрессии генов в поясничном отделе спинного мозга мыши при моделировании эффектов невесомости // *Доклады Академии Наук*. – 2011. – Т.439, №3. – С. 416-420.
7. Способ получения лекарственного препарата генетически модифицированных клеток. Заявители: Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казанский государственный медицинский университет, Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Киясов А.П. Авторы: Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Блатт Н.Л., Газизов И.М., Йылмаз Т.С., Калигин М.С., Киселёв С.Л., Кудряшова Н.В., Ланник Н.И., Салафутдинов И.И., Шафигуллина А.К., Шахин Ф., Юнусов Д.Ш., Ялвач М.Э., Киясов А.П. Патент на изобретение РФ №2431669. Приоритет 23.07.09. Зарегистрирован 20.10.11. <http://www.freepatent.ru/patents/2431669>
8. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Архипова С.С., Салафутдинов И.И., Ризванов А.А., Чельшев Ю.А.

Посттравматические изменения спинного мозга крысы при трансплантации моноклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных генами VEGF и FGF2. Ж. Морфология. 2011. 140, № 6. 36-42.

9. Челышев Ю.А., Мухамедшина Я.О., Шаймарданова Г.Ф., Николаев С.И. Прямая доставка терапевтических генов для стимулирования посттравматической нейрорегенерации. Неврологический вестник. 2012. XLIV, №1. 76-83.
10. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И., Челышев Ю.А. Эффект трансплантации в область травматического повреждения спинного мозга крысы моноклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующих рекомбинантные гены VEGF и FGF2. Ж. Морфология. 2012. 142, № 4. 31-36.
11. Мухамедшина Я.О., Соловьева В.В., Салафутдинов И.И., Черенкова Е.Е., Федотова В.Ю., Сафиуллов З.З., Измайлов А.А., Шарифуллина Г.А., Абдулхаков С.Р., Калигин М.С., Баширов Ф.В., Мухамедьяров М.А., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Киясов А.П., Ризванов А.А., Исламов Р.Р. Анализ экспрессии рекомбинантного гена *veg* генетически модифицированными моноклеарными клетками пуповинной крови в эксперименте *in vivo*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. VII, № 3. 130-134.
12. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Салафутдинов И.И., Ризванов А.А., Челышев Ю.А. Применение плазмидного вектора с генами *veg* и *fgf2* при травматическом повреждении спинного мозга крысы. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 4. 200-204.
13. М.А. Мухамедьяров, А.А. Ризванов, З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлов, Г.А. Шарифуллина, В.В. Соловьёва, В.Ю. Федотова, И.И. Салафутдинов, Е.Е. Черенкова, Ф.В. Баширов, М.С. Калигин, С.Р. Абдулхаков, М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, Б.С. Народицкий, А.П. Киясов, А.Л. Зефилов, Р.Р. Исламов. Анализ эффективности генно-клеточной терапии у трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2012. - No.4. - С.215-219.
14. Способ стимулирования нейрорегенерации с помощью генетических конструкций. Правообладатели: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет, Челышев Ю.А., Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И. Авторы: Челышев Ю.А., Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Исламов Р.Р., Ризванов А.А.,

Салафутдинов И.И. Патент на изобретение РФ №2459630. Приоритет 27.04.11. Зарегистрирован 27.08.12.
<http://www.findpatent.ru/patent/245/2459630.html>

15. Д.С. Гусева, А.А. Ризванов, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов. Генетически модифицированные мононуклеары пуповинной крови – стимуляторы нейрорегенерации при дегенеративных заболеваниях центральной нервной системы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Том VIII, № 3, С. 106-112.
16. Rustem R. Islamov, Albert A. Rizvanov, Andrey P. Kiyasov, Andras Palotás. Transformation of human umbilical cord blood cells to support neuro-regeneration in the diseased brain // Chapter 3 in the book series entitled: Stem Cells and Cancer Stem Cells. - 2013. - Volume 9. - P. 25-33.
17. Челышев Ю.А., Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Нигметзянова М.В. Глиальные барьеры при травме спинного мозга как мишень генно-клеточной терапии. Неврологический вестник. 2013. Т. XIV, №1. 87-93.
18. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Салафутдинов И.И., Ризванов А.А., Челышев Ю.А. Корреляционный анализ параметров структуры в условиях генно-клеточной терапии при травме спинного мозга крысы. Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2013. Т. 155. Книга 1. 19-26.
19. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Челышев Ю.А. Оценка эффективности путей локальной доставки терапевтических генов при травме спинного мозга крысы: корреляции параметров структуры и функции. Современные технологии в медицине. 2013. Т. 5. № 3. 16-22.
20. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Челышев Ю.А. Состояние и количество миелиновых волокон в области травмы спинного мозга крысы при генно-клеточной терапии. Ж. Морфологические ведомости. 2013. №1. 74-80.
21. Мухамедшина Я.О., Шаймарданова Г.Ф., Салафутдинов И.И., Ризванов А.А., Повышева Т.В., Масгутова Г.А., Нигметзянова М.В., Челышев Ю.А. Доставка рекомбинантного аденовируса с клонированным геном GDNF в область травмы спинного мозга при помощи клеток крови пуповины человека стимулирует восстановление двигательной функции и поддерживает популяцию глиальных клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. VIII, № 3. 129-132.
22. Николаев С.И., Галлямов А.Р., Челышев Ю.А. Оптимальные сроки введения генетической конструкции для стимулирования посттравматической регенерации седалищного нерва крысы. Морфологические ведомости, 2013, №4, 44-48.

23. Николаев С.И., Галлямов А.Р., Мамин Г.В., Челышев Ю.А. Конduit нерва на основе поли(ε-капролактона) и локальная доставка генов *vegf* и *fgf2* стимулируют нейрорегенерацию. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2014, №1, 44-48.
24. Daria Guseva, Albert A. Rizvanov, Ilnur I. Salafutdinov, Nezhdana V. Kudryashova, Andras Palotos, Rustem R. Islamov. Over-expression of Oct4 and Sox2 transcription factors enhances differentiation of human umbilical cord blood cells in vivo // Biochemical and Biophysical Research Communications [V 451 \(4\)](#), 2014, 503–509.