



OpenLab Генные и клеточные технологии

Альберт Анатольевич Ризванов, д.б.н., Ph.D.,
член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан,
заместитель руководителя САЕ Трансляционная 7П медицина,
г.н.с., профессор кафедры генетики

Института фундаментальной медицины и биологии,
заведующий отделом поисковых исследований НОЦ фармацевтики
Казанского (Приволжского) федерального университета

<http://kpfu.ru/biology-medicine/struktura-instituta/openlab/gennye-i-kletochnye-tehnologii>
rizvanov@gmail.com

Создание нового поколения плазмидных (невирусных) генотерапевтических препаратов для лечения социально-значимых заболеваний человека



Препарат 1: Комбинация нейротрофических и проангиогенных факторов роста.

Назначение: травмы периферических нервов, травма спинного мозга, инсульты, нейродегенеративные заболевания.

Препарат 2: Комбинация проангиогенных факторов роста.

Назначение: ишемические заболевания различного генеза (ишемия нижних конечностей, инфаркт миокарда/ишемическая болезнь сердца).

Препарат 3: Комбинация остеогенных и проангиогенных факторов роста.

Назначение: пациенты с последствиями травм и дегенеративно-дистрофическими поражениями костей и крупных суставов нижних конечностей.

Основная идея проекта: За счет комбинаций (*трех и более*) применяемых терапевтических генов с различной биологической активностью создается линейка генно-терапевтических препаратов, направленных на стимуляцию ангиогенеза, нейрогенеза, остеогенеза, нейротрофики/нейрорегенерации. За счет активации и стимулирования естественных процессов регенерации

Предварительные результаты: Созданы генно-терапевтические препараты на основе комбинаций двух терапевтических генов. Проведен анализ эффективности и безопасности на моделях лабораторных животных. Проведены пилотные клинические исследования, показавшие высокую эффективность и безопасность различных генно-терапевтических препаратов для лечения травм периферических нервов, ишемии нижних конечностей и асептического некроза костей.



Разработка новых дуальных ингибиторов убиквитин-лигаз MDM2 и MDM4 для активации p53 в опухолевых клетках

Мы разрабатываем новый тип низкомолекулярных соединений на основе химического каркаса замещенных тиазолов для двойного ингибирования убиквитинлигаз MDM2 и MDM4 в опухолевых клетках, что в свою очередь приводит к активации транскрипционного фактора p53 и инициации программируемой гибели данных клеток. Ожидается, что результатом проекта станут оптимизированные химические соединения с параметром $IC_{50} = 100 \text{ нм} - 1 \text{ мкм}$ против MDM2 и MDM4. Соединения с активностью этого порядка по отношению к белковым мишеням пригодны для доклинических испытаний в качестве лекарственных кандидатов.



Медный комплекс оснований Шиффа изатина: новые химиотерапевтические агенты против p53-положительных опухолевых линий

Мы разрабатываем новый тип соединений на основе каркаса оснований Шиффа изатина и его медного комплекса, которые проявляют значительный цитотоксический эффект по отношению p53-положительным опухолям. Мы приводим доказательства p53-опосредованного механизма действия соединений путем количественного анализа экспрессии p53-зависимых генов, анализа пролиферативной активности клеток в режиме реального времени и цитофлуориметрического анализа апоптоза.



Новые подходы на основе CAR-T терапии для воздействия на солидные опухоли

Применение CAR-T клеточной терапии продемонстрировало значительный успех в лечении гематологических злокачественных новообразований, однако эта новая клеточная технология значительно менее эффективна против солидных опухолей. Низкая клиническая эффективность CAR-T терапии против солидных опухолей в первую очередь объясняется биологическими различиями между солидными опухолями и гематологического новообразования. Чрезвычайно важной является разработка моделей, имитирующих *in vivo* условия, для проверки эффективности CAR-T терапии против солидных опухолей. Мы разрабатываем подход, пригодный для скрининга и оценки эффективности CAR-T клеточной терапии против 3D моделей солидных опухолей.

Создание нового терапевтического препарата для улучшения реологических свойств мокроты на основе фермента нуклеазы *Serratia marcescens*



Проект направлен на решение проблемы улучшения реологических свойств вязкой мокроты, что используется для улучшения выведения мокроты из дыхательной системы, уменьшения ее накопления в дыхательных путях, улучшения функции органов дыхания больных.

Основная идея проекта: за счет комбинации известных фармацевтических средств и фермента нуклеолитического действия - нуклеазы *Serratia marcescens*, создается новый терапевтический препарат, отличающийся от муколитического коммерческого препарата «Пульмозим» - Дорназа альфа - повышенной эффективностью в существенно более низких дозах при равных условиях действия и повышенной устойчивостью in vivo.

Назначение создаваемого препарата: болезни дыхательной системы, такие как муковисцидоз, хронический бронхит, трахеобронхит, ларингит, синдром Картагенера, эмфизема легочных тканей, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхоэктазная болезнь, бронхиальная астма, синусит, гайморит.

Предварительные результаты: разработаны условия биосинтеза и выделения очищенной нуклеазы *Serratia marcescens*. Установлено разрушение внутримолекулярных связей молекул ДНК в составе мокроты в условиях действия препарата «Пульмозим». Получены функционально активные конъюгаты нуклеазы и полиэтиленгликоля.

Создание нового поколения невирусных препаратов для лечения вирусных геморрагических лихорадок



Препарат : Комбинация основных иммуногенных детерминант – структурных белков хантавирусов – возбудителей ВГЛ. Для создания препарата применен бесклеточный подход, направленный на снижение риска онкотрансформации. Препарат предназначен для вакцинации индивидуумов, населяющих зоонозный ареал.

Основная идея проекта: За счет применения комбинаций нескольких структурных генов хантавирусов с различной биологической активностью с использованием первичных культур клеток создается линейка генно-терапевтических препаратов, направленных на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа со стороны реципиента.

Предварительные результаты: Созданы генетические конструкции, кодирующих структурные компоненты генома хантавируса Пуумала. Проведена генетическая модификация первичных культур клеток полученными конструкциями. Получены препараты искусственных микровезикул (ИМВ), заключающие в своем составе структурные белки хантавирусов.

Циркулирующие опухолевые клетки в диагностике онкологических заболеваний

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК)

- Обнаруживаются в кровотоке на ранних стадиях развития опухоли;
- Отражают гетерогенность первичной опухоли и профиль метастазов;
- Представляют собой наиболее агрессивный фенотип клеток;

[1] CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial) Instructions for Use. Janssen Diagnostics, LLC.

Основная идея проекта:

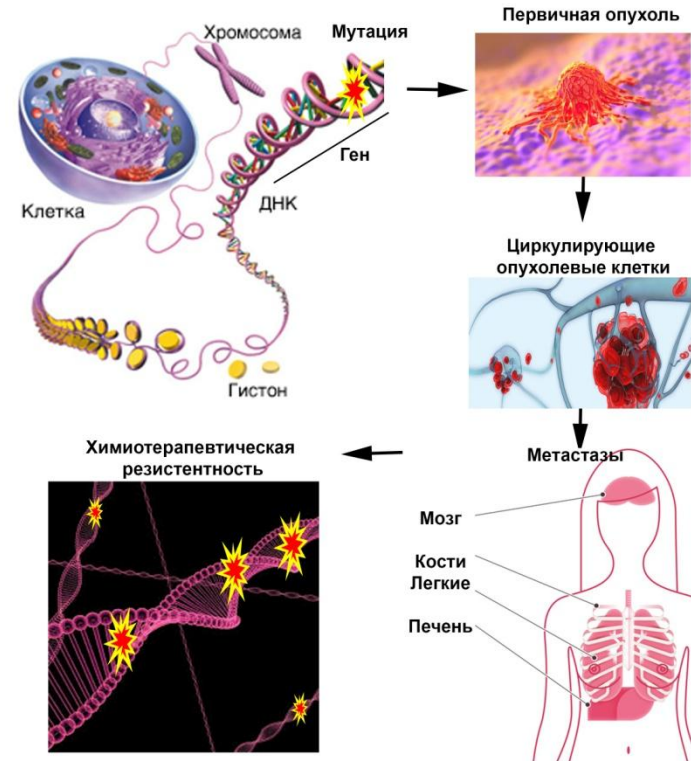
разработка системы ранней диагностики и прогноза онкологических заболеваний

Задачи:

- Разработка методов и подходов выделения и культивирования ЦОК
- Оценка диагностического и прогностического значения генетических и фенотипических параметров ЦОК

Предварительные результаты:

- Разработана методика выделения ЦОК и ЦОК-обогащенной популяции клеток крови, культивирования клеток
- Проведена оценка диагностической значимости количества клеток при культивировании на селективной среде, экспрессии маркеров эпителиальных клеток



Циркулирующие опухолевые клетки для персонализированного подбора лекарственных препаратов



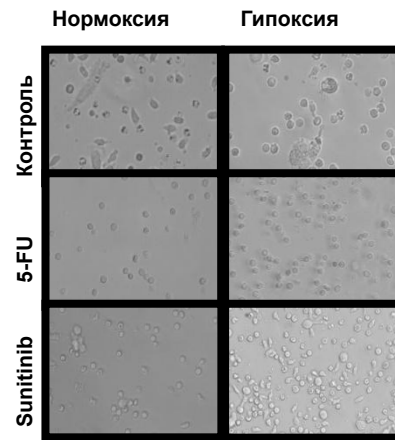
Основная идея проекта: разработка методов и подходов для создания персонализированной системы скрининга эффективности противоопухолевых лекарственных препаратов

Задачи:

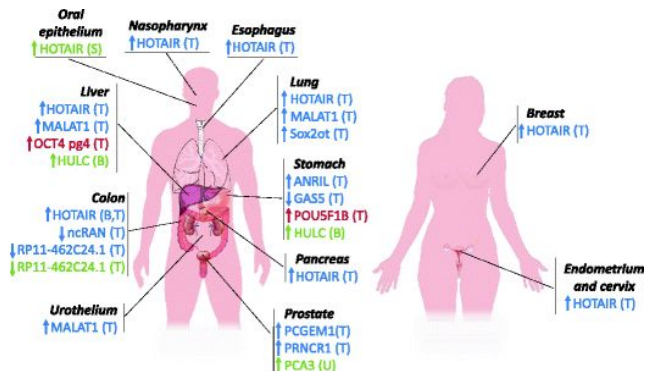
- Подбор терапии на основе генетического анализа ЦОК
- Тестирование чувствительности к препаратам на клетках пациента
- Подбор и оценка действия комбинированных препаратов

Предварительные результаты:

- Проведена оценка эффективности моно- и комбинированной химиотерапии на культуре клеток больных раком молочной железы, поджелудочной железы, яичников, почки.
- Проводится анализ корреляции клинических данных
- эффективности терапии с данными *in vitro* анализа



Циркулирующие РНК: диагностическое и прогностическое значение



- Средняя концентрация ДНК и РНК в плазме у больных онкологическими заболеваниями достоверно выше, чем у условно здоровых доноров [1].
- Уровень проонкогенных нкРНК коррелирует с размером первичной опухоли, гистопатологической и клинической стадиями заболевания, опухолевым поражением лимфатических узлов [2].
- нкРНК регулируют различные клеточные процессы, их экспрессия специфична для различных тканей и опухолей, циркулирующие нкРНК стабильны и могут быть выделены из различных биологических жидкостей [3]

[1] Breitbach S., Tug S., Simon P. Circulating cell-free DNA: An up-coming molecular marker in exercise physiology. Sports Med. 2012;42:565-586.

[2] Catarino R., Ferreira M., Rodrigues H. et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer DNA Cell Biol. 27 (2008), pp. 415–421

[3] Vitiello, M., Tuccoli, A. & Poliseo, L. Cell Oncol. (2015) 38: 17. <https://doi.org/10.1007/s13402-014-0180-x>

Основная идея проекта: создание тест-системы для диагностики и прогноза онкологических заболеваний на основе профилирования некодирующих РНК

Задачи:

- Определение профиля экспрессии некодирующих РНК, характерного для различных типов опухолей (биоинформатический анализ)
- Исследование диагностической и прогностической значимости уровня нкРНК-маркеров в сыворотке крови и других биологических жидкостях

Предварительные результаты:

- Определены потенциальные маркеры развития рака шейки матки (РШМ)
- Проведен анализ экспрессии циркулирующих РНК в сыворотке крови больных РШМ и раком яичников, цервикальных смывах больных РШМ и ЦИН
- Выявлены различия в экспрессионном профиле нкРНК в цервикальных смывах больных РШМ по сравнению с ЦИН и контрольной группой

Омиксные технологии в персонализированной терапии

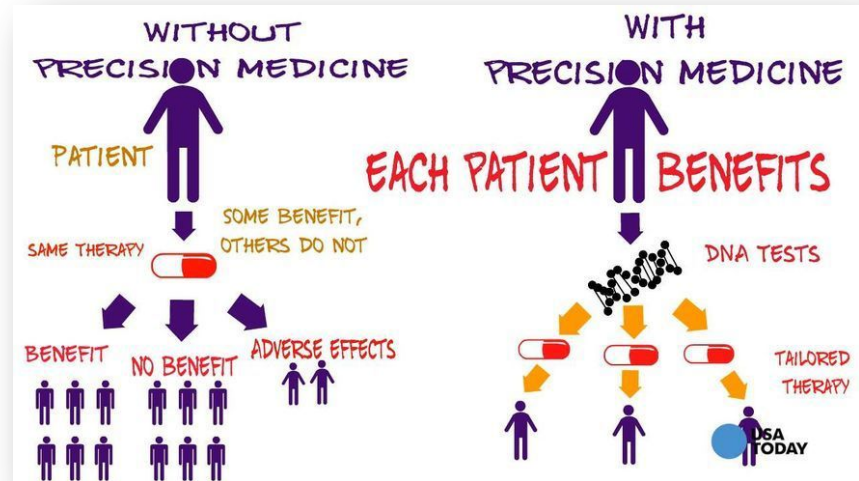
Основная идея проекта: разработка системы ранней диагностики, прогноза онкологических заболеваний и подбора персонализированная терапии с применением омиксных технологий

Задачи:

Выявление генетических и эпигенетических маркеров развития онкологических заболеваний, терапевтической устойчивости, возникновения рецидивов

Предварительные результаты:

- Проведен биоинформатический анализ экзома и транскриптома опухолей различной этиологии
- Выявлены потенциальные маркеры развития терапевтической устойчивости



[1] "Obama's claim the Affordable Care Act was a 'major reason' in preventing 50,000 patient deaths". *Washington Post*. Retrieved November 10, 2016.



Способ стимулирования нейрорегенерации с помощью стволовых и прогениторных клеток

Препарат 1: Мезенхимные стволовые клетки (МСК), заключенные в фибриновый матрикс. Патент РФ на изобретение №2650638, дата регистрации 16.04.2018 г.

Препарат 2: Стромально-вазкулярная фракция жировой ткани (СВФ), заключенная в фибриновый матрикс. **Преимущества препарата 2:** клетки не требуют культивирования, не попадают под ФЗ N 180 "О биомедицинских клеточных продуктах" от 23.06.2016.

Назначение препаратов: пациенты с повреждением периферических нервов и травматической болезнью спинного мозга. В перспективе пациенты с инсультом и нейродегенеративными заболеваниями.

Основная идея проекта: За счет создания эффективной панели, позволяющей оценить нейрорегенераторный потенциал МСК и СВФ, обладающих различной биологической активностью в зависимости от донора, разработка линейки клеточных препаратов, максимально стимулирующих восстановление нервной ткани и ее функций.

Предварительные результаты: Проведен анализ эффективности и безопасности на моделях мелких (крысы) и крупных (свиньи) лабораторных животных. Разработанные варианты терапии позволяют улучшить показатели восстановления функций периферических нервов и спинного мозга, а также эффективно поддерживать структуру ткани в области повреждения, способствуя успешному протеканию процессов нейрорегенерации.

Создание бесклеточных препаратов для лечения травматической болезни спинного мозга

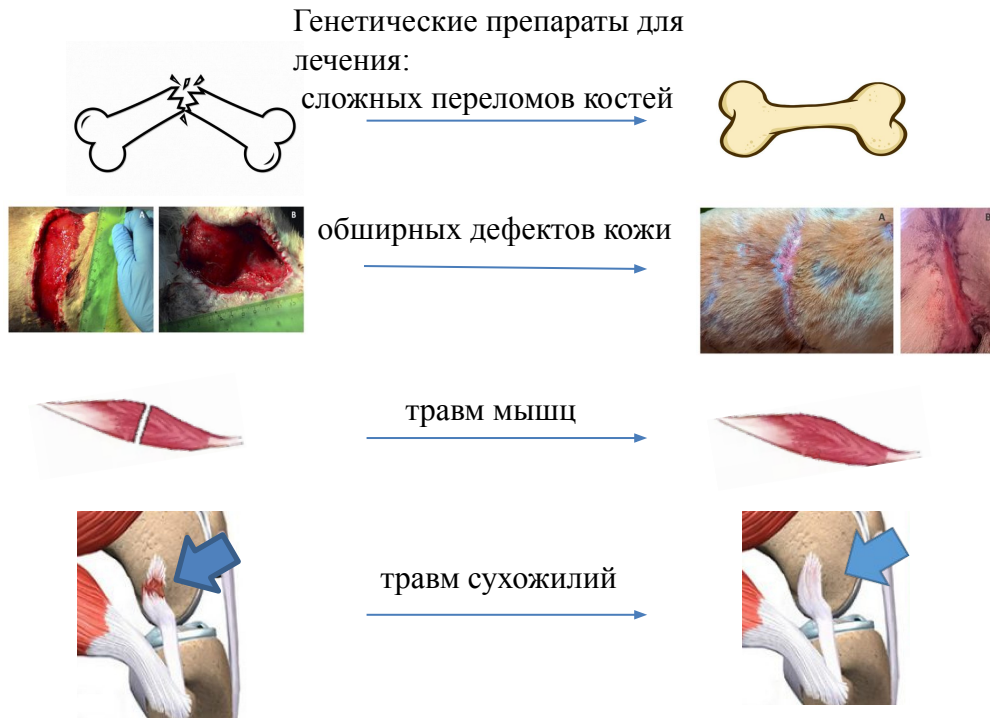


Препарат: Микровезикулы, полученные из мезенхимных стволовых клеток жировой ткани доноров.

Основная идея проекта: За счет поставки биоактивных белков и липидов, факторов транскрипции и микроРНК, микровезикулы могут способствовать нейропротекции/нейрорегенерации.

Предварительные результаты: Разработан протокол получения бесклеточных препаратов. Проведены пилотные доклинические исследования, показавшие эффективность и безопасность микровезикул, полученных из мезенхимных стволовых клеток, для лечения травматической болезни спинного мозга.

Создание ветеринарных видоспецифичных плазмидных (невирусных) генетических препаратов для лечения травм опорно-двигательного аппарата и обширных дефектов кожи лошадей и собак.



Преимущества перед классическими методами лечения:

- видоспецифичность (специально разработаны препараты для лошадей, собак)
- низкая инвазивность
- локальность применения
- эффективность и безопасность
- сокращение сроков реабилитации
- низкая частота рецидивов при терапии тендитов и десмитов скаковых лошадей

Создание лекарственных препаратов на основе биоподобных искусственных микровезикул клеток человека



Препарат 1: Биоподобные искусственные микровезикулы стволовых клеток человека. Назначение: травмы периферических нервов, травма спинного мозга, инсульты, нейродегенеративные заболевания, ишемические заболевания различного генеза (ишемия нижних конечностей, инфаркт миокарда/ишемическая болезнь сердца).

Препарат 2: Биоподобные искусственные микровезикулы, содержащие терапевтические гены (плазмидная ДНК). Назначение: моногенные заболевания, травмы периферических нервов, травма спинного мозга, инсульты, нейродегенеративные заболевания, ишемические заболевания различного генеза (ишемия нижних конечностей, инфаркт миокарда/ишемическая болезнь сердца).

Препарат 3: Биоподобные искусственные микровезикулы, содержащие митохондрии. Назначение: митохондриальные заболевания, снижение активности митохондрий при старении.

Основная идея проекта: на основе биоподобных искусственных микровезикул стволовых клеток человека создается линейка лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию ангиогенеза, нейропротекции/нейрорегенерации, терапии митохондриальных заболеваний.

Предварительные результаты: Получены и охарактеризованы биоподобные искусственные микровезикулы стволовых клеток человека. Проведен анализ эффективности *in vitro* (препарат 2 и 3) эффективности и безопасности на моделях лабораторных животных (препарат 1 – применен для стимуляции ангиогенеза).

Создание линейки препаратов на основе мембранных везикул для терапии заболеваний кожи



Препарат 1: Мембранные везикулы фибробластоподобных клеток. Назначение: косметология, лечение и предотвращение преждевременного старения кожи.

Препарат 2: Мембранные везикулы мезенхимных стволовых клеток. Назначение: лечение длительно незаживающих повреждений кожи вызванных системными заболеваниями (ишемия нижних конечностей, диабет).

Основная идея проекта: Выделенные из стволовых клеток микровезикулы способны взаимодействовать с тканями и клетками микроокружения при трансплантации *in vivo* и стимулировать ангиогенез и ремоделирование. Благодаря выраженному терапевтическому эффекту и безопасности, препараты на основе мембранных везикул, могут быть успешно применены в лечение различных видов повреждений кожных покровов.

Предварительные результаты: Проведен анализ эффективности и безопасности на моделях лабораторных животных. Получен патент РФ «Способ получения лекарственного средств на основе везикул клеток человека», Готовится к подаче патент «Способ использования мембранных везикул фибробластоподобных клеток для стимуляции ангиогенеза»

Создание нового поколения невирусных генопрепаратов для лечения вирусных геморрагических лихорадок



Препарат 1: Комбинация основных иммуногенных детерминант – структурных компонентов генома хантавирусов – возбудителей ВГЛ. Препарат представляет собой плазмидную ДНК, отвечающую таким критериям как биобезопасность и отсутствию возможности инсерционного мутагенеза. Назначение: вакцинация пациентов, населяющих зоонозный ареал.

Основная идея проекта: За счет комбинаций нескольких структурных генов хантавирусов с различной биологической активностью создается линейка генно-терапевтических препаратов, направленных на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа со стороны реципиента.

Предварительные результаты: Созданы генопрепараты на основе комбинаций двух генов, кодирующих структурные компоненты генома хантавируса Пуумала. Проведен анализ эффективности экспрессии генов-мишеней в первичных и иммортализованных клеточных линий. Проведена апробация препарата на модели лабораторных животных.