

Персонализированные лекарственные препараты на основе синтетических РНК

Улитин Андрей Борисович (рук. отдела разработки антител ЗАО “Биокад”)

20.04.2018



Выбор терапии.

Универсальная



Выбор очевиден?

Персонализированная





Универсальная (Standart)

Химиотерапия

Таргетная

Радионуклидная

Иммуноонкология

Онколитические вирусы



Персонализированная

Клеточная терапия (CAR)

Дендритные вакцины

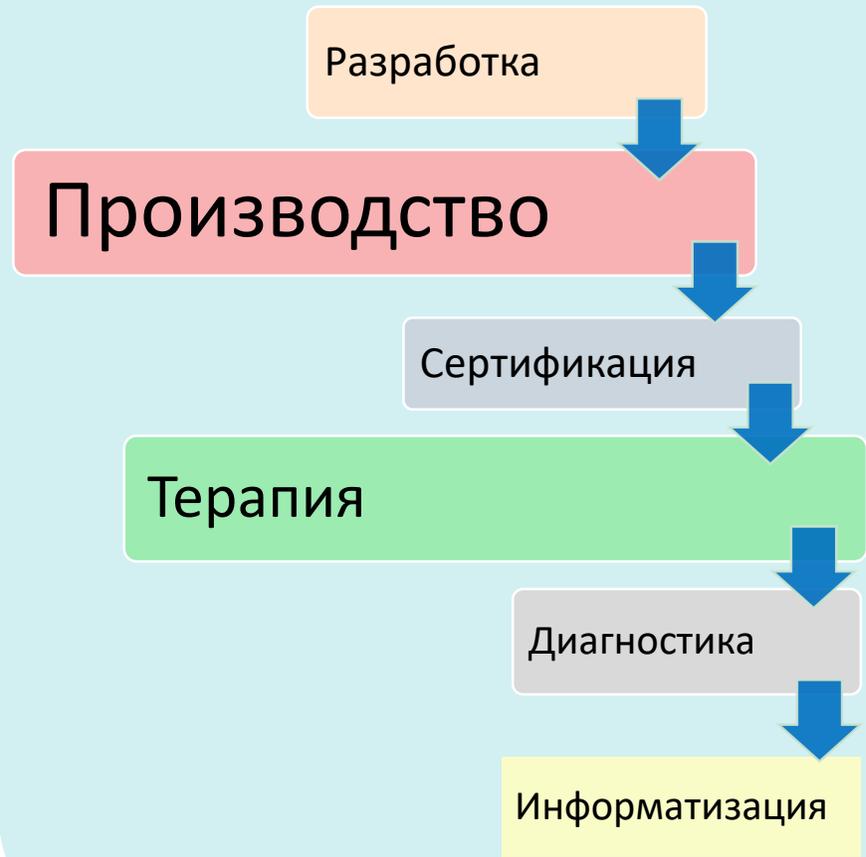
мРНК/ДНК вакцины

Пептидные вакцины

Геномное редактирование



Стандартная



Персонализированная

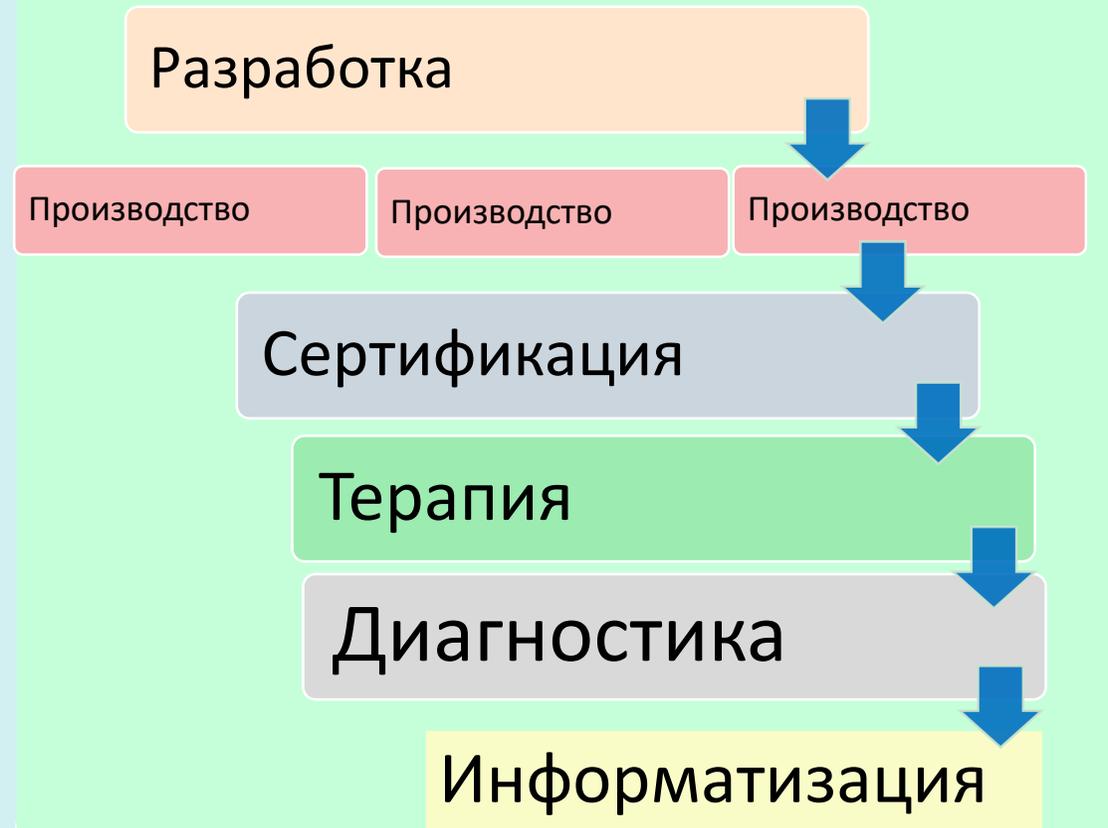
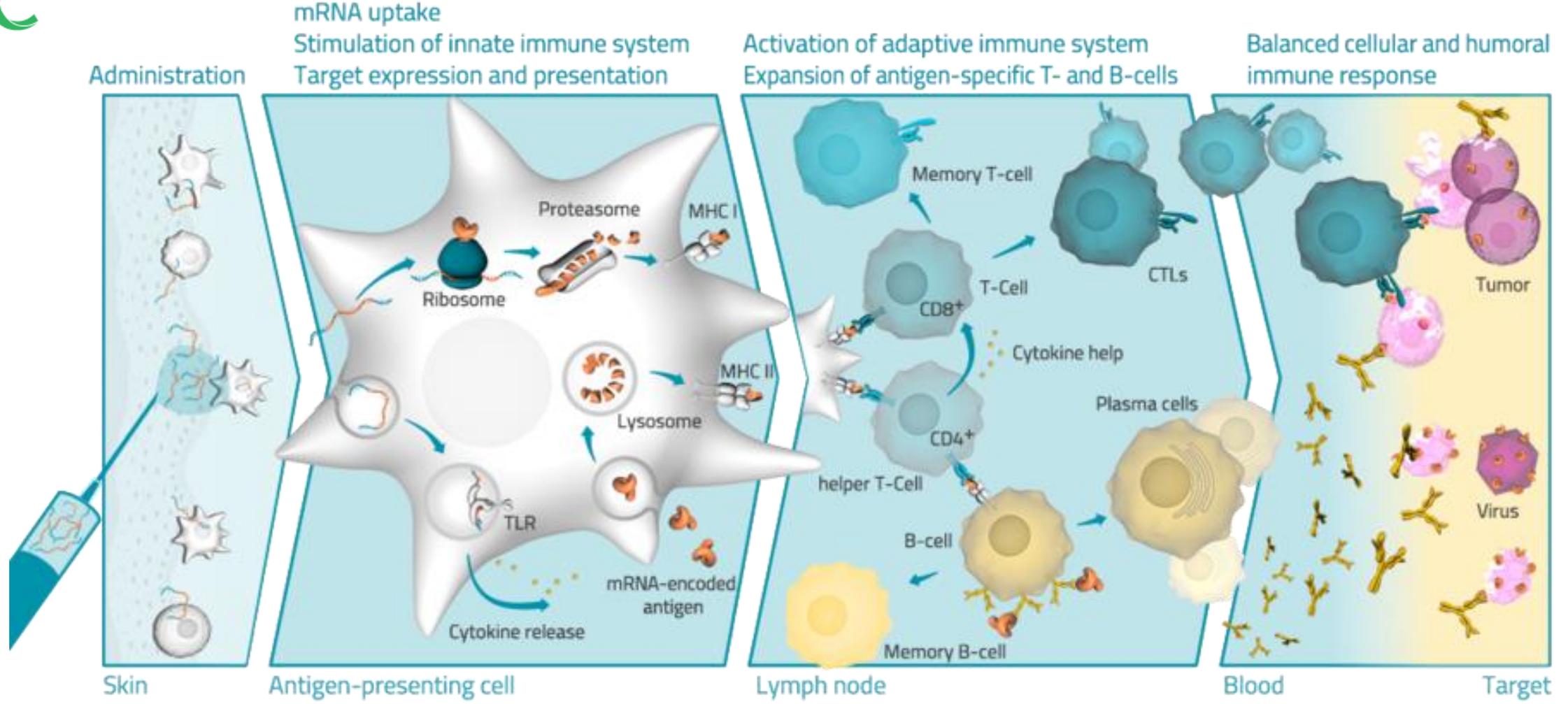


Схема действия препаратов мРНК вакцин.



©BIOCAD 2017

Накопление спонтанных мутаций в твердых опухолях



REVIEW

Disease Models & Mechanisms (2014) doi:10.1242/dmm.015974

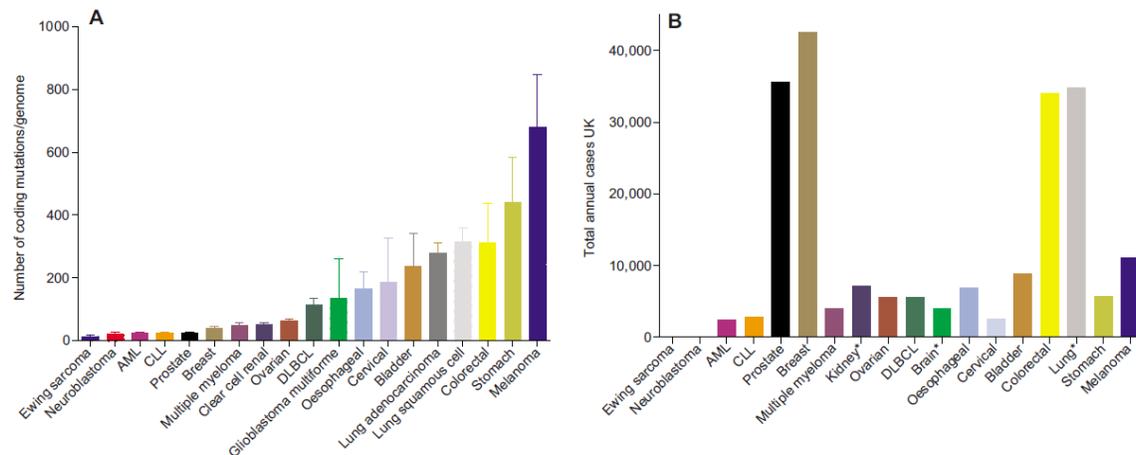


Fig. 1. Mutation burden and cancer incidence. (A) Comparison of the mean number of non-coding mutations per genome in tumours of different tissues (raw data from Lawrence et al., 2013). Error bars show the standard error of the mean. (B) UK annual incidence of various malignancies [Cancer Registry Statistics, 2011; (www.ons.gov.uk) and the Cancer Research UK website (www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/)]. An asterisk (*) signifies that the incidence data refer to the tissue of origin, rather than the specific cancer subtype shown in A (e.g. lung cancer rather than lung squamous cell or adenocarcinoma). CLL, chronic lymphocytic leukaemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma.

[Dis Model Mech. 2014 Aug;7\(8\):941-51. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? Grove CS¹, Vassiliou GS](http://Dis Model Mech. 2014 Aug;7(8):941-51. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? Grove CS¹, Vassiliou GS)

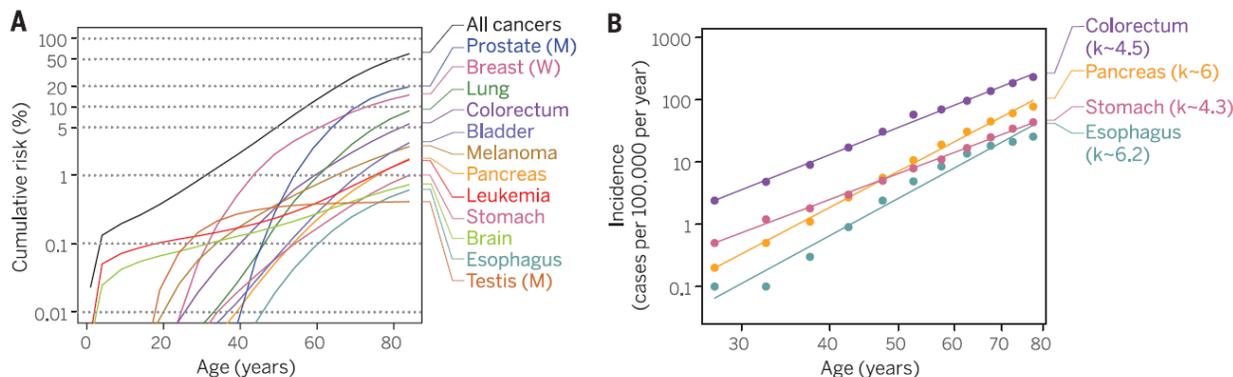


Fig. 4. Age incidence of cancer. (A) Cumulative risk of cancer versus age. This plot shows the risk of suffering a given cancer before a particular age. (B) Log-log representation of the incidence of different cancers (cases per year per 100,000 people) versus age. The regression lines highlight the approximately geometrical increase of cancer incidence with age, although the association is imperfect and only correlative for some cancer types (54). k denotes line slope. U.S. cancer-incidence data are from the SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) Cancer Statistics Review (data are from 2008 to 2012 and include any race and both genders, unless otherwise specified; M, men; W, women).

[Science. 2015 Sep 25;349\(6255\):1483-9. Somatic mutation in cancer and normal cells. Martincorena¹, Campbell PJ](http://Science. 2015 Sep 25;349(6255):1483-9. Somatic mutation in cancer and normal cells. Martincorena¹, Campbell PJ)

✓ Спонтанные мутации накапливаются по мере старения. И могут приводить к раку.

✓ Полно геномное секвенирование позволяет отследить и увидеть в деталях этот процесс

✓ Наиболее мутабельными являются эпителиальные типы опухолей тк меланома, рак кишечника, желудка и легких.

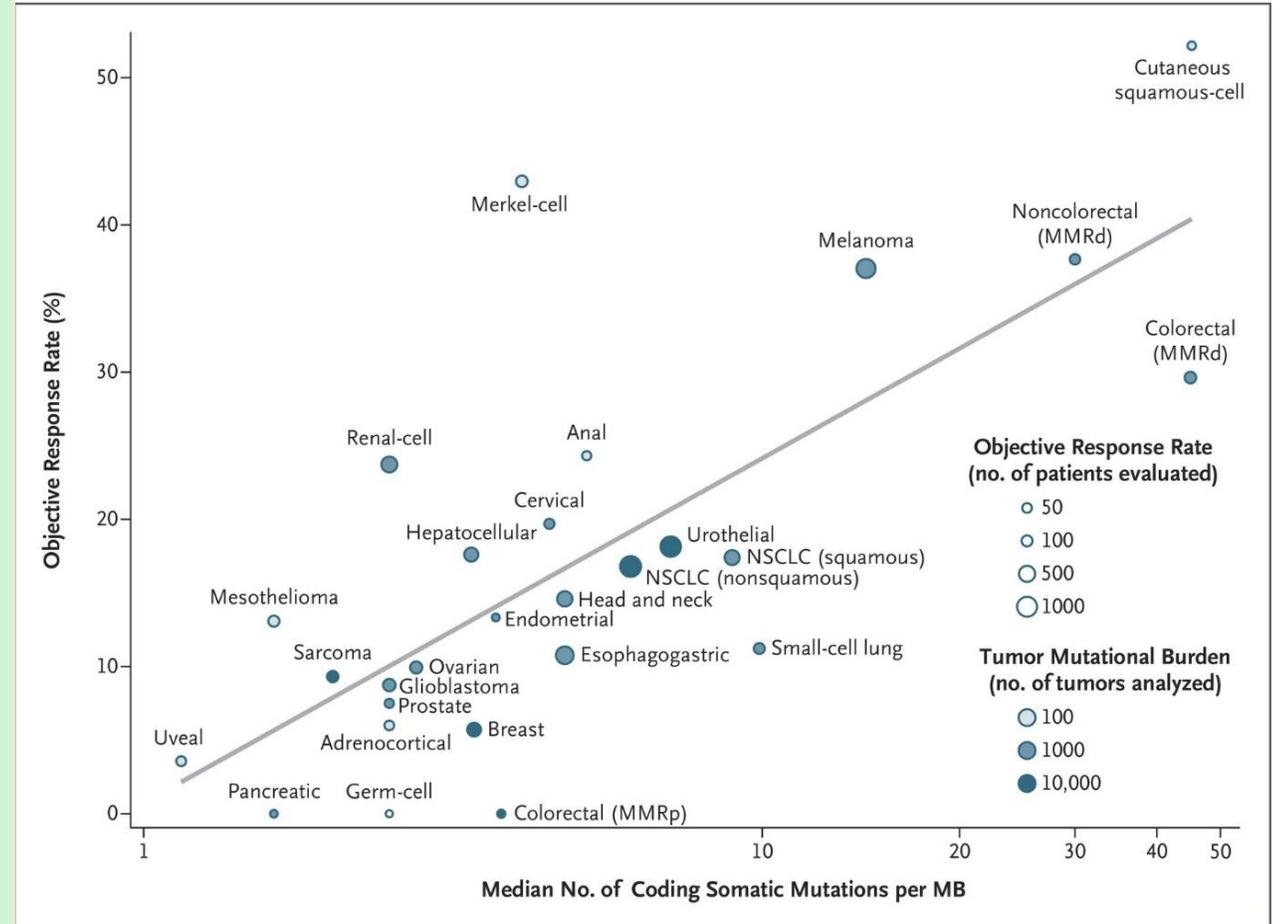
✓ Данные типы опухолей могут содержать значительное количество неоантигенных эпитопов, что является оптимальным показанием для персонафицированной вакцинной терапии



✓ Зависимость числа соматических мутаций per megabase (MB) ДНК в 27 типах опухолей или субтипов для пациентов которые имели объективный ответ на anti-PD-1 /PD-L1 терапию. (MMRd denotes mismatch repair-deficient, MMRp mismatch repair-proficient, and NSCLC non-small-cell lung cancer).

✓ Anti-PD1/anti-PDL1 терапия опосредована активностью CTL, поэтому применение персонифицированной онковакцины на основе неоантигенных пептидов совместно с чекпойн ингибиторами будет эффективным и более специфическим агентом для терапии твердых опухолей с высокой мутантной нагрузкой

Терапевтическое поле для персонифицированных вакцин и чекпойнт ингибиторов



[N Engl J Med.](#) 2017 Dec 21;377(25):2500-2501. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. [Yarchoan M¹](#), [Hopkins A¹](#), [Jaffee EM](#)



Персонализированные вакцины в клинике – “наступление”! > 50% Ответ!

[Nature](#). 2017 Jul 13;547(7662):222-226. **Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer.**

[Sahin U](#)^{1,2,3}, [et al](#)

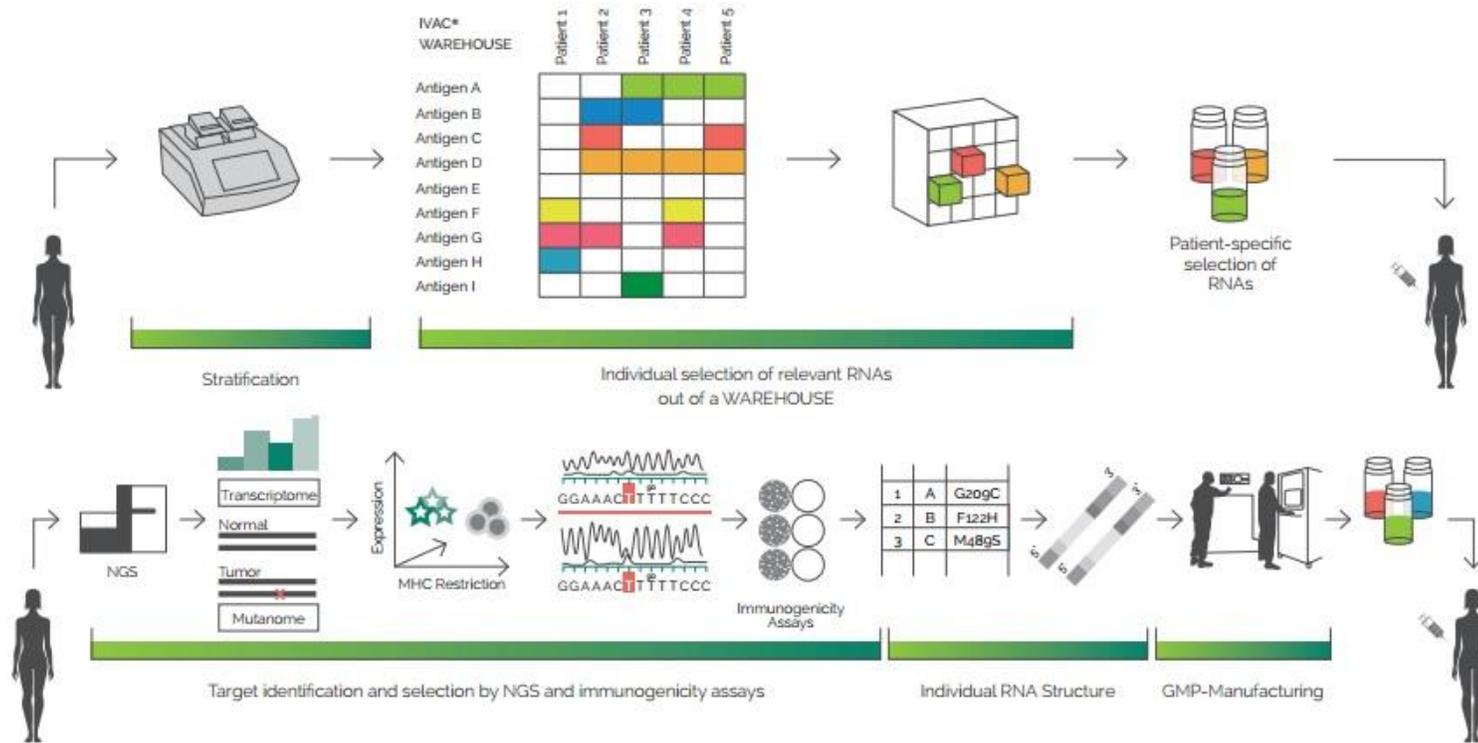
All patients developed T cell responses against multiple vaccine neo-epitopes at up to high single-digit percentages. Vaccine-induced T cell infiltration and neo-epitope-specific killing of autologous tumour cells were shown in post-vaccination resected metastases from two patients. The cumulative rate of metastatic events was highly significantly reduced after the start of vaccination, resulting in a sustained progression-free survival. Two of the five patients with metastatic disease experienced vaccine-related objective responses. One of these patients had a late relapse owing to outgrowth of β 2-microglobulin-deficient melanoma cells as an acquired resistance mechanism. A third patient developed a complete response to vaccination in combination with PD-1 blockade therapy. Our study demonstrates that individual mutations can be exploited, thereby opening a path to personalized immunotherapy for patients with cancer.

[Nature](#). 2017 Jul 13;547(7662):217-221. **An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma.**

[Ott PA](#)^{1,2,3}, [et al](#)

Of six vaccinated patients, four had no recurrence at 25 months after vaccination, while two with recurrent disease were subsequently treated with anti-PD-1 (anti-programmed cell death-1) therapy and experienced complete tumour regression, with expansion of the repertoire of neoantigen-specific T cells. These data provide a strong rationale for further development of this approach, alone and in combination with checkpoint blockade or other immunotherapies

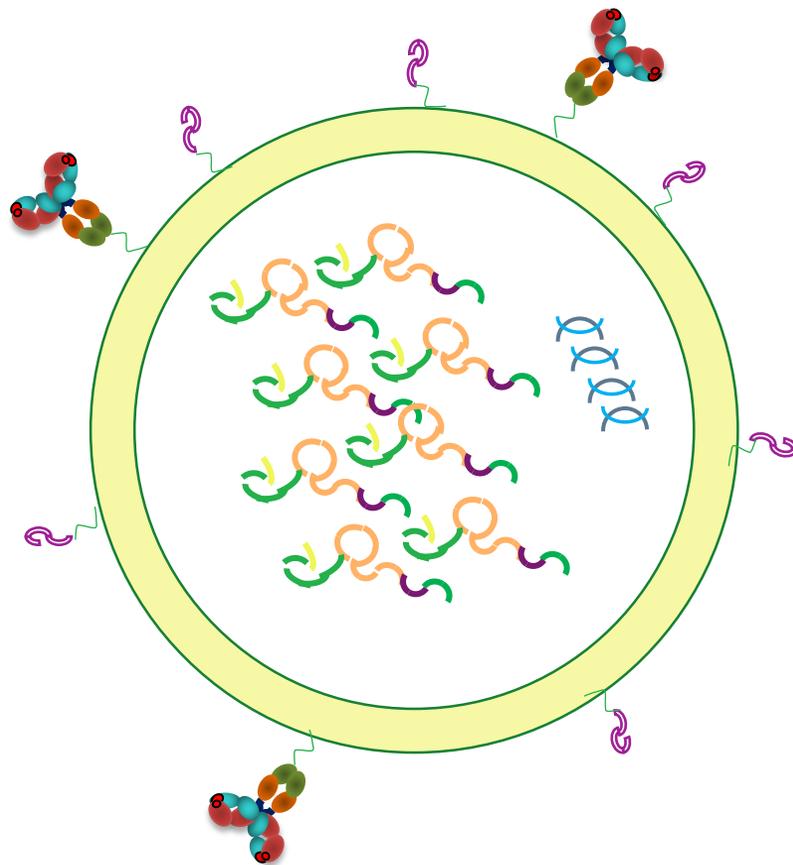
Новое поколение персонифицированных мРНК вакцин



Использование современных методов геномного -транскриптомного секвенирования и быстрой математической расшифровки, создание баз данных мутантных вариантов онкогенов опухолевых клеток - «неоантигенов» - создаст next-generation персонифицированных вакцин



Вакцинная частица - " Magic Bomb "



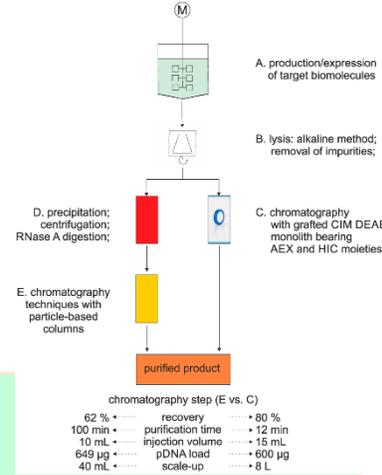
-  Липидная оболочка
-  мРНК, кодирующая онкоантигены
-  адъювант
-  антитела специфичные против уникальных DC рецепторов
-  PEG modification



Существующая технология приготовления универсальной мРНК вакцины



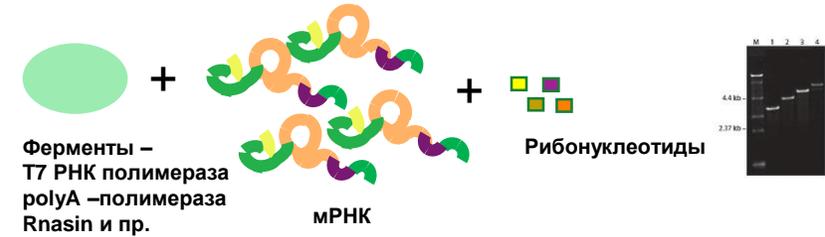
бактериальная ферментация
наработка плазмид



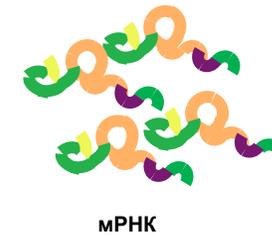
граммовая
очистка
плазмид



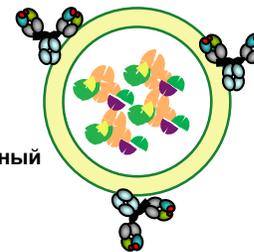
Мультиграммовая in vitro транскрипция



Мультиграммовая очистка мРНК



Приготовление
липоплексов,
декорированных
аффинными метками



Валидационный
анализ

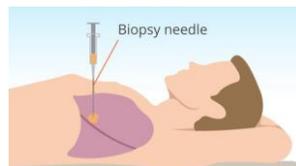


Готовая лекарственная форма

Выводы:

1. Масштабируемый процесс.
2. Достаточное наличие собственной ферментационной и биохимической базы
3. Наличие опыта у ряда сотрудников на каждой стадии процесса.
4. Отсутствие необходимости в дорогостоящем оборудовании

Локальное производство персонифицированных мРНК вакцин



NGS анализ



Обработка персональных данных в облачном data center



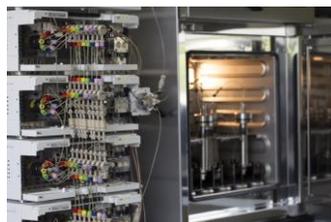
Автоматизированный синтез олигонуклеотидов



Автоматизированный синтез конструкций



Автоматизированный синтез вакцинной мРНК



Автоматизированный очистка мРНК



Автоматизированный синтез липоплексов

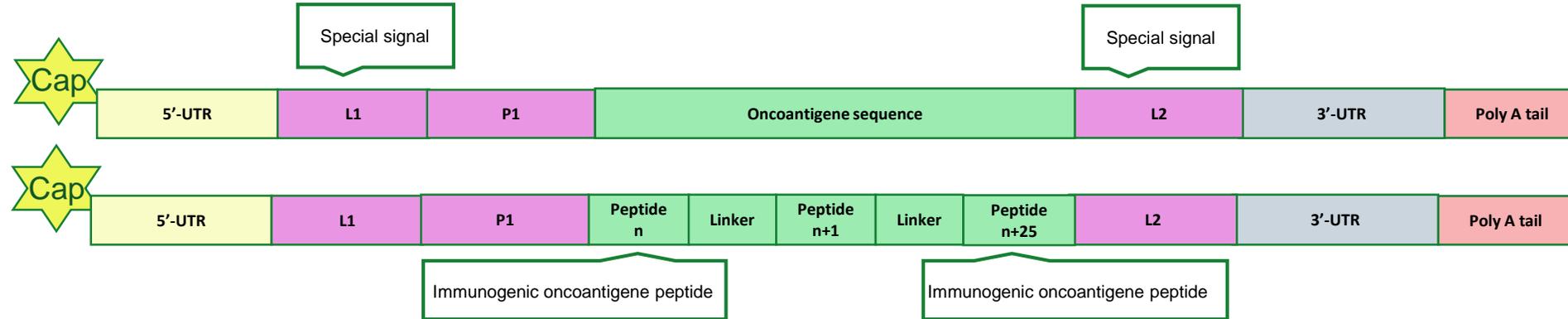


Анализ препарата липоплексов



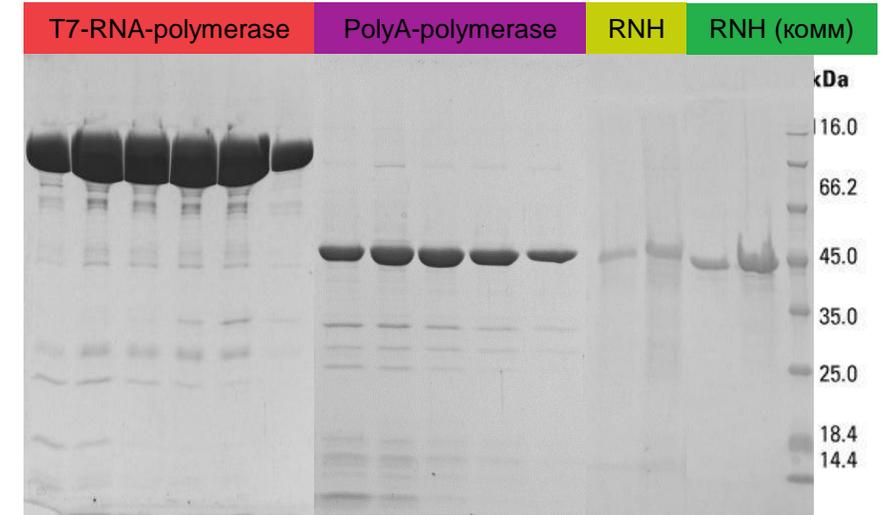
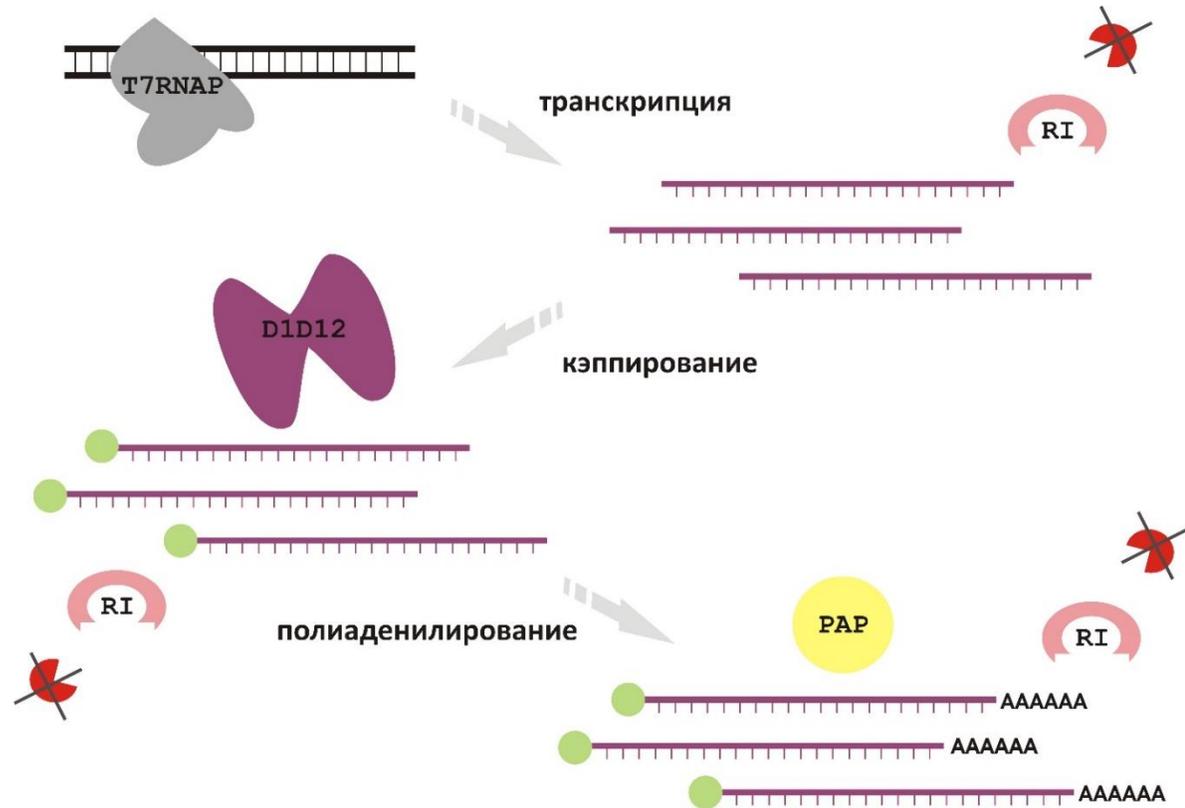


Структура мРНК и выбранные антигены для меланомной вакцины



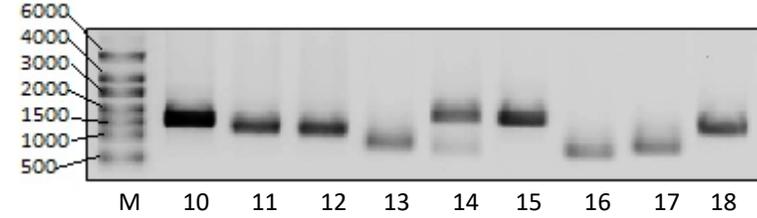
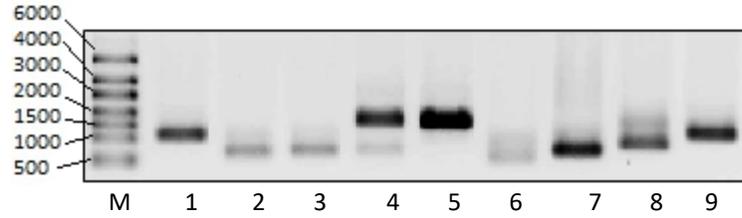
- ✓ Разработана структура функционально-активных вариантов мРНК.
- ✓ Выбраны кандидаты – онкоантигены для меланомной мРНК вакцины. Созданы конструкции для IVT.

Основные ферменты и стадии синтеза мРНК для вакцин

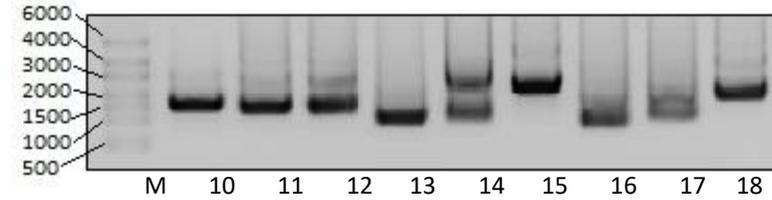
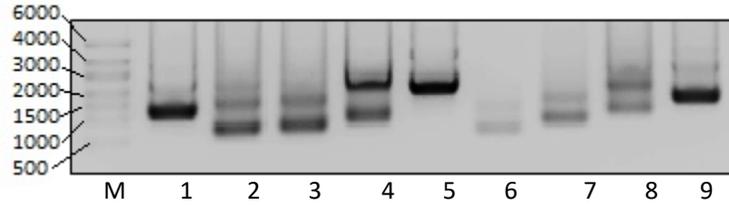


- ✓ Подобраны условия получения мРНК липopleксов.
- ✓ Формирующиеся частицы обладают необходимыми размерами и составом для использования в составе вакцин.

In vitro транскрипция с использованием «домашней» системы



In vitro транскрипция с использованием коммерческой системы



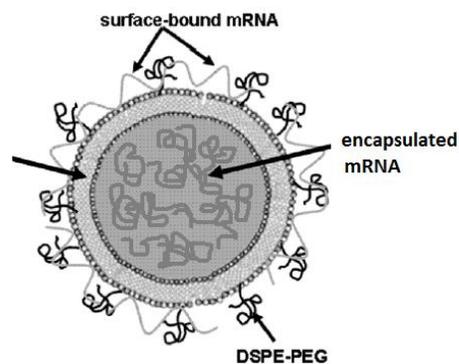
№	Антиген	Ожидаемая длина	№	Антиген	Ожидаемая длина
1	m1	1075	10	MP2(GPGPG)	1633
2	s1	577	11	mPL	1303
3	S1(opt)	577	12	m3PL	1340
4	T1	1804	13	S1PL	805
5	T2	1738	14	T1PL	2032
6	M1	505	15	T2PL	1966
7	N1	719	16	M1PL	733
8	T2	898	17	N1PL	947
9	C1	1372	18	MP3(RVKR)PL	1776



Липосомальная форма мРНК



Структура вакцинной липосомальной частицы



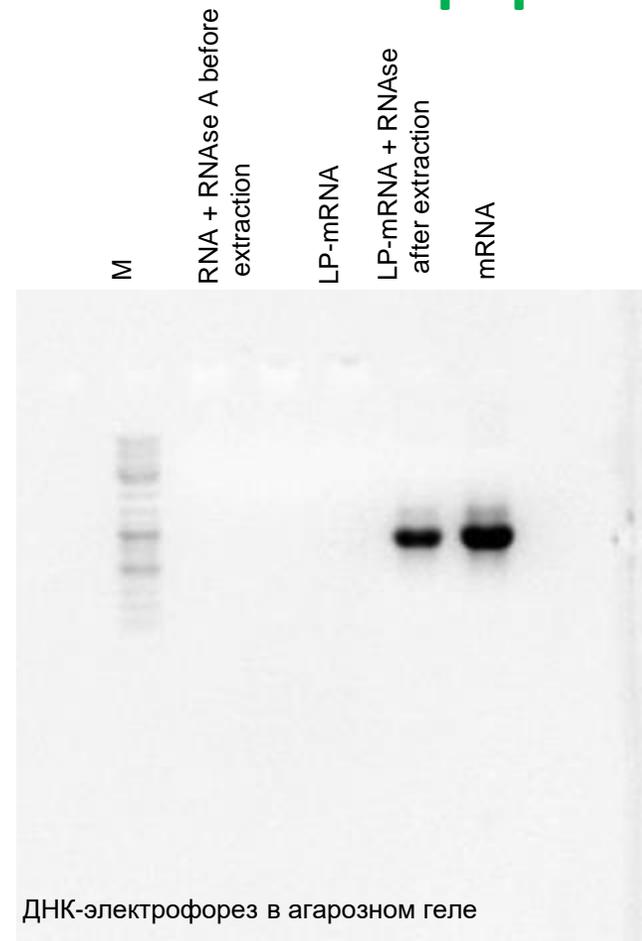
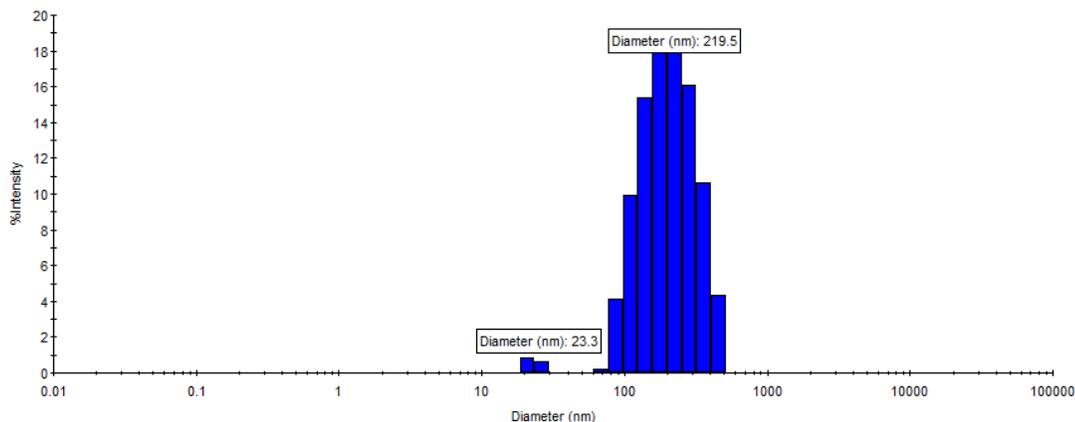
Препарат инкапсулированной в липосомы мРНК

- Подобраны лабораторные условия получения мРНК липоплексов.
- Формирующиеся частицы обладают необходимыми размерами и составом для использования в составе вакцин.



Липосомальная форма мРНК.

Размер 200 – 210 нм
Загрузка мРНК внутрь липосом ~ 80 %
Концентрация мРНК 0.30 – 0.75 мг/мл

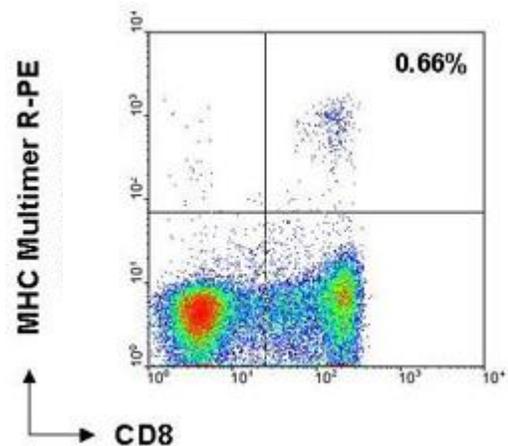


- ✓ Подобраны условия получения мРНК липоплексов.
- ✓ Формирующиеся частицы обладают необходимыми размерами и составом для использования в составе вакцин.

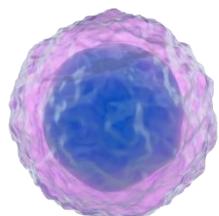


Клеточные тесты для анализа активности мРНК вакцины (2018)

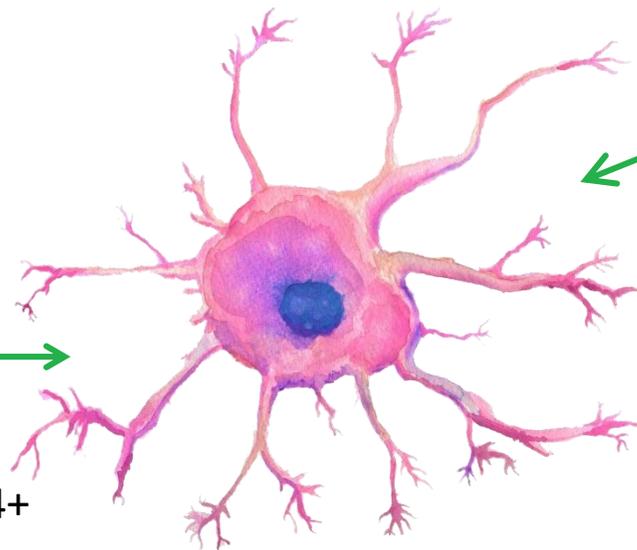
Окраска MHC-peptide мультимерами



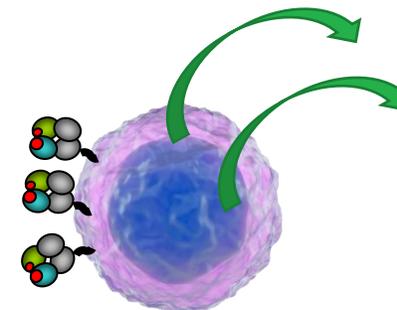
Пролиферация и созревание специфических CTL



Дендритная клетка

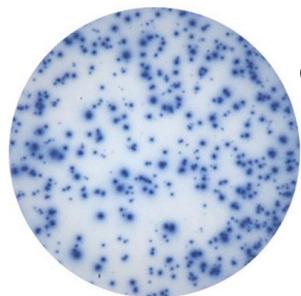


Luciferase reporter cell lines



Химерные CD8+ Т клетки, с мембранными TCR специфичными против меланомных MHC-peptides

ELISPOT

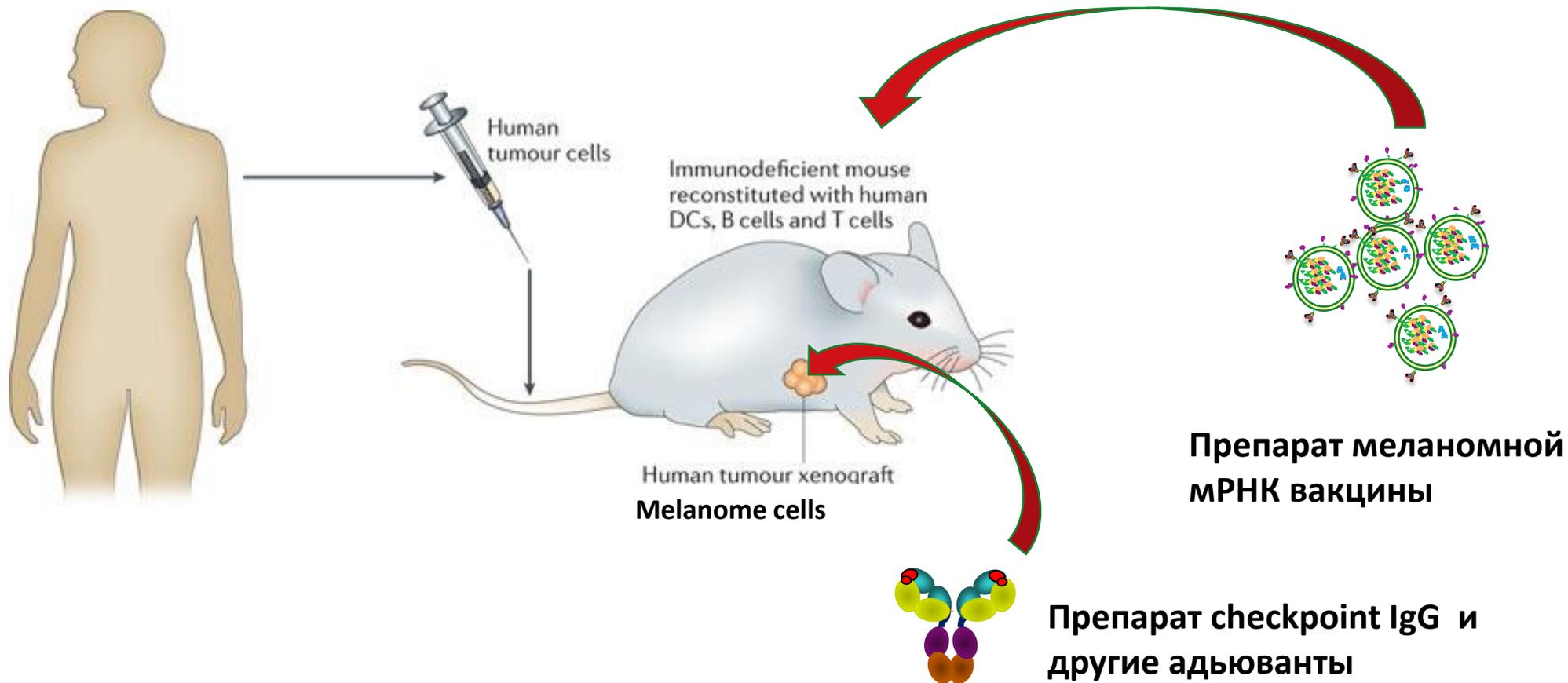


Секреция IFN γ

CD8+/CD4+
Донорские
Т клетки



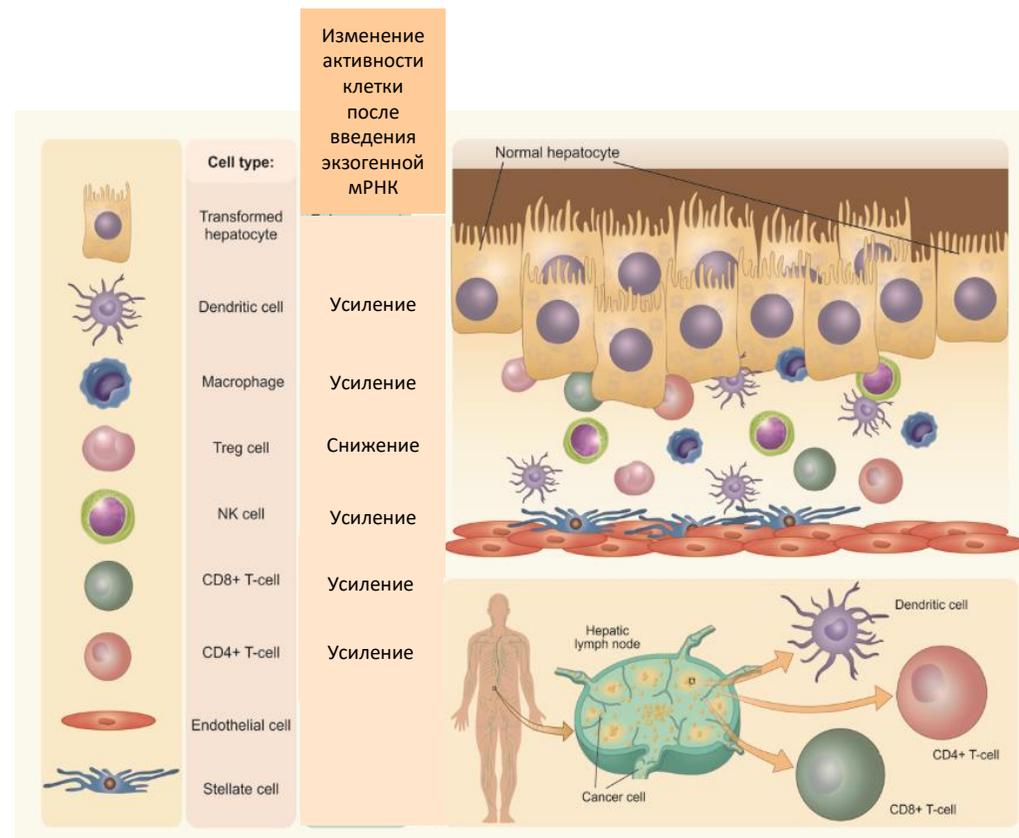
Пилотные исследования активности мРНК вакцины в мышинной модели меланомы (2018)





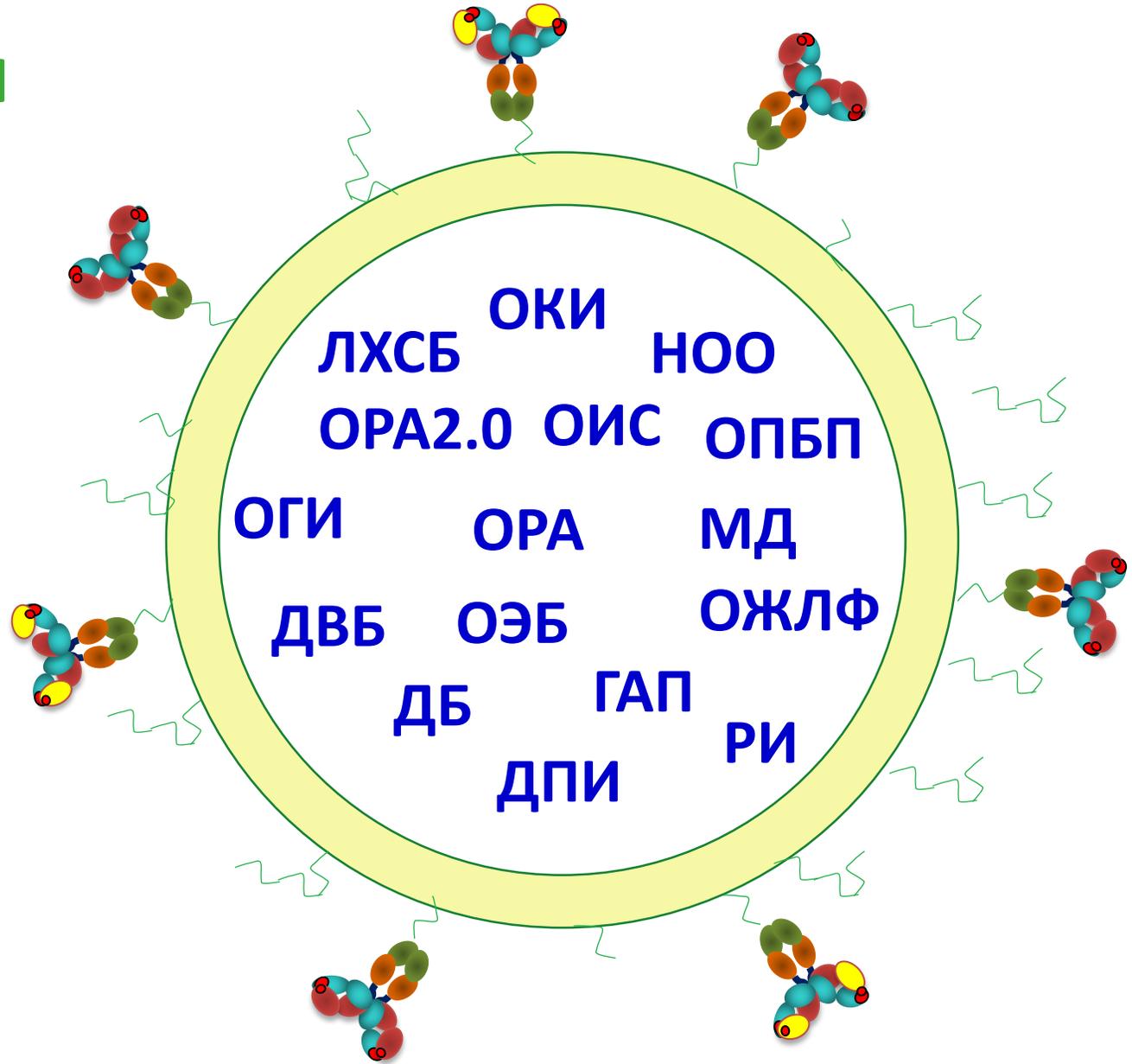
Дальнейшее развитие терапевтического поля для мРНК в БИОКАД

- В дальнейшем платформу мРНК вакцин планируется распространить для тагетирования различных типов иммунных клеток (TIL, NK, Macrophages и др.) в области опухоли, с целью максимального увеличения активности клеточного противоопухолевого иммунитета.
- Кроме того, значительной перспективой развития данной платформы является возможность ее использования для максимально быстрой разработки и производства мРНК вакцин против инфекционных заболеваний вирусной природы и метаболических заболеваний. Потенциально данная платформа позволяет создать и произвести от сотен тысяч до миллионов доз препарата в течении нескольких месяцев.



[Natl Sci Rev.](#) 2014 Jul 14;1(3):396-412. The hepatitis B virus-associated tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma. [Yang P¹](#), [Markowitz GJ²](#), [Wang XF²](#).

∞ Братство вакцин





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!