

THE GENE THERAPY IN THE XXI CENTURY MEDICINE

V. S. BARANOV

The paper presents a definition of gene therapy, its origin and the main results obtained. Basic types of gene therapy applications are briefly outlined. Special attention is paid to some social and ethical problems related to human genome studies and gene therapy trials.

Дано определение генной терапии, рассмотрены основные типы генотерапевтических вмешательств, методы генетической трансфекции клеток эукариот, варианты векторных систем, обеспечивающие адресную доставку генетического материала в клетки человека; моногенные заболевания, а также перспективы генной терапии онкологических и инфекционных заболеваний. Особое внимание обращено на многочисленные этические и социальные аспекты применения методов генной терапии.

© Баранов В.С., 1999

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ – МЕДИЦИНА XXI ВЕКА

В. С. БАРАНОВ

Санкт-Петербургский государственный университет

ВВЕДЕНИЕ

Решающие достижения молекулярной биологии и генетики в изучении тонкой структуры генов эукариот, их картировании на хромосомах млекопитающих, и прежде всего человека, впечатляющие успехи проекта “Геном человека” в идентификации и клонировании генов, мутации которых приводят к многочисленным наследственным болезням, и, наконец, бурный рост в области биотехнологии и генной инженерии явились необходимыми предпосылками для того, чтобы от опытов на животных и теоретических построений уже в 1989 году предпринять первые попытки лечения моногенных болезней.

Что же такое генная терапия? Подразумевает ли она лечение с помощью гена как лекарственного препарата или только лечение путем коррекции мутантного гена? Эти и многие другие вопросы неминуемо возникают при рассмотрении такого многообещающего, а возможно, и потенциально опасного для человечества направления медицины грядущего XXI века, как генная терапия.

КРАТКАЯ ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Генную терапию на современном этапе можно определить как лечение наследственных, мультифакториальных и ненаследственных (инфекционных) заболеваний путем введения генов в клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций. Первые клинические испытания методов генной терапии были предприняты 22 мая 1989 года с целью генетического маркирования опухоль-инфильтрующих лимфоцитов в случае прогрессирующей меланомы. Первым моногенным наследственным заболеванием, в отношении которого были применены методы генной терапии, оказался наследственный иммунодефицит, обусловленный мутацией в гене аденозиндезаминазы (*ADA*). 14 сентября 1990 года в Бетесде (США) четырехлетней девочке, страдающей этим достаточно редким заболеванием (1 : 100 000), были пересажены ее собственные лимфоциты, предварительно трансформированные вне организма (*ex vivo*) геном *ADA* (ген *ADA* + ген *neo* + ретровирусный вектор). Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедура была повторена с интервалом 3–5 месяцев [1]. За три года терапии в общей сложности проведены 23 внутривенные трансфузии *ADA*-трансформированных Т-лимфоцитов без видимых

неблагоприятных эффектов. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни и не бояться случайных инфекций. Столь же успешным оказалось и лечение второй пациентки с этим заболеванием. В настоящее время клинические испытания генной терапии этого заболевания проводятся в Италии, Франции, Великобритании и Японии.

В 1997 году число допущенных к клиническим испытаниям протоколов уже составляло 175, более 2000 пациентов приняли участие в их реализации [2]. Большинство таких проектов (около 80%) касаются лечения онкологических заболеваний, а также ВИЧ-инфекции (СПИДа). Вместе с тем и в современных исследованиях по генной терапии необходимо учитывать, что последствия манипулирования генами или рекомбинантными ДНК *in vivo* изучены недостаточно.

В странах с наиболее продвинутым уровнем исследований в этой области, особенно в США, медицинские протоколы с использованием смысловых последовательностей ДНК подвергаются обязательной экспертизе в соответствующих комитетах и комиссиях. В США таковыми являются Консультативный комитет по рекомбинантным ДНК (Recombinant DNA Advisory Committee, RAC) и Управление по лекарствам и пищевым продуктам (Food and Drug Administration, FDA) с последующим обязательным утверждением проекта директором Национальных институтов здоровья (National Institutes of Health) [1]. В Европе такие протоколы составляют и утверждают в соответствии с рекомендациями Европейской рабочей группы по переносу генов и генной терапии (European Working Group on Human Gene Transfer and Therapy) [3].

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФЕКЦИИ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Решающим условием успешной генотерапии является обеспечение эффективной доставки, то есть трансфекции (в широком смысле) или трансдукции (при использовании вирусных векторов) чужеродного гена в клетки-мишени, обеспечение длительного функционирования его в этих клетках и создание условий для полноценной работы гена (его экспрессии). Трансфекция может проводиться с использованием чистой (“голой” – naked) ДНК, легированной (встроенной) в соответствующую плазмиду, или комплексированной ДНК (плазмидная ДНК, соединенная с солями, белками (трансферрин), органическими полимерами (DEAE-декстран, полилизин, липосомами или частицами золота), или ДНК в составе вирусных частиц, предварительно лишенных способности к репликации.

Основные методы доставки чужеродных генов в клетки разделяются на химические, физические и биологические. Эффективность трансфекции и интеграционная способность трансдуцированной чужеродной ДНК при различных способах трансфекции в ДНК-клетки мишени приведены в табл. 1. Только вирусные векторы или генетические конструкции, включающие вирусные последовательности, способны к активной трансдукции, а в некоторых случаях и к длительной экспрессии чужеродных генов. Из более 175 уже одобренных протоколов клинических испытаний по генотерапии более 120 предполагают использовать вирусную трансдукцию и около 100 из них основаны на применении ретровирусных векторов [2].

Таблица 1. Основные характеристики генетической трансфекции *in vitro* [1]

Метод	Трансдукция	Интеграция	Экспрессия
Са-фосфат преципитация	Химические Низкая	Низкая	Транзиторная
Электропорация	Физические Низкая	Низкая	Транзиторная
Микроинъекция	Высокая	Низкая	Транзиторная
“Бомбардировка” частицами золота	Высокая	Низкая	Транзиторная
Липосомы	Слияние Низкая	Низкая	Транзиторная
Рецептор-опосредованный эндоцитоз	Высокая	Низкая	Транзиторная
ДНК-белковый комплекс	Высокая	Низкая	Транзиторная
ДНК-комплекс-вирусная капсида	Высокая	Низкая	Транзиторная
Рекомбинантные вирусы			
Аденовирус	Высокая	Низкая	Транзиторная
Аденоассоциированный вирус (AAV)	Высокая	Низкая	Длительная?
Вирус герпеса (HSV)	Низкая	Низкая	Слабая
Вирус иммунодефицита (HIV)	Высокая	Высокая	Длительная?
Вирус мышиной лейкемии Молони (MoMLV)	Высокая	Высокая	Длительная?
Вирус ветряной оспы (Vaccinia)	Высокая	Низкая	Слабая

Обзор данных позволяет прийти к заключению, что, несмотря на усилия многих лабораторий мира, все уже известные и испытанные *in vivo* и *in vitro* векторные системы далеки от совершенства [4, 5]. Если проблема доставки чужеродной ДНК *in vitro* практически решена, а ее доставка в клетки-мишени разных тканей *in vivo* успешно решается (главным образом путем создания конструкций, несущих рецепторные белки, в том числе и антигены, специфичные для тех или иных тканей), то другие характеристики существующих векторных систем — стабильность интеграции, регулируемая экспрессия, безопасность — все еще нуждаются в серьезных доработках.

Прежде всего это касается стабильности интеграции. До настоящего времени интеграция в геном достигалась только при использовании ретровирусных либо аденоассоциированных векторов (см. табл. 1). Повысить эффективность стабильной интеграции можно путем совершенствования генных конструкций типа рецептор-опосредованных систем (рис. 1) либо путем создания достаточно стабильных эписомных векторов (то есть ДНК-структур, способных к длительной персистенции внутри ядер). В последнее время особое внимание уделяется созданию векторов на базе искусственных хромосом млекопитающих (Mammalian Artificial Chromosomes). Благодаря наличию основных структурных элементов обычных хромосом такие мини-хромосомы длительно удерживаются в клетках и способны нести полноразмерные (геномные) гены и их естест-

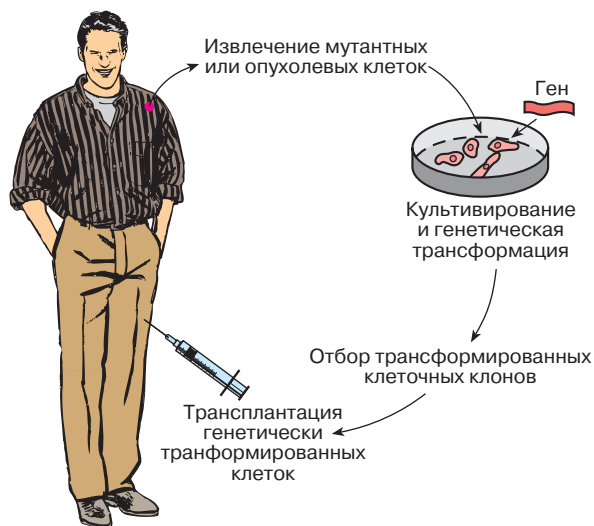


Рис. 1. Генотерапия способом *ex vivo*. Клетки получают от пациента, культивируют *in vitro*, проводят их генетическую трансформацию, отбирают нужные клоны клеток и возвращают в организм пациента. В случае опухолей клетки трансформируют генами, резко усиливающими иммунный ответ организма, облучают и трансплантируют подочно тому же пациенту

венные регуляторные элементы, которые необходимы для правильной работы гена, в нужной ткани и в должное время.

ПРИНЦИПЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*). Клеточная генная терапия или терапия *ex vivo* предполагает выделение и культивирование специфических типов клеток пациента, введение в них чужеродных генов, отбор трансфицированных клеток и реинфузию их тому же пациенту (рис. 2). В настоящее время в большинстве допущенных к клиническим испытаниям программ генной терапии используется именно этот подход [5].

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани больного. Особенно перспективным для лечения генных болезней *in vivo* представляется введение генов с помощью аэрозольных или инъекционных вакцин. Аэрозольная генотерапия разрабатывается, как правило, для лечения пульмонологических заболеваний (муковисцидоз, рак легких).

Разработке программы генной терапии предшествуют тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса. Все эти данные учитываются при составлении соответствующего медицинского протокола. Апробацию процедуры генокоррекции наследственного заболевания проводят на первичных культурах клеток

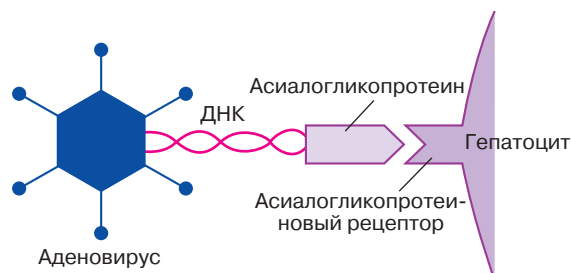


Рис. 2. Рецептор-опосредованный перенос гена. ДНК-последовательность нужного гена соединяют с определенным мембранным рецептором (например, асиалогликопротеином в случае клеток печени), а также с аденовирусом, обеспечивающим проникновение генной конструкции в ядро клетки. Такой комбинированный вектор обеспечивает эффективную адресную доставку гена в клетки печени

большого, в которых в норме функционально активен данный ген. На этих клеточных моделях оценивают эффективность выбранной системы переноса экзогенной ДНК, определяют экспрессию вводимой генетической конструкции, анализируют ее взаимодействие с геномом клетки, отрабатывают способы коррекции на биохимическом уровне.

Используя культуры клеток, можно разработать систему адресной доставки рекомбинантных ДНК, однако проверка надежности работы этой системы может быть осуществлена только на уровне целого организма. Поэтому такое внимание в программах по генной терапии уделяется экспериментам *in vivo* на естественных или искусственно полученных моделях соответствующих наследственных болезней у животных [6]. Успешная коррекция генетических дефектов у таких животных и отсутствие нежелательных побочных эффектов генной терапии являются важнейшей предпосылкой для разрешения клинических испытаний.

Таким образом, стандартная схема генокоррекции наследственного дефекта включает серию последовательных этапов. Она начинается созданием полноценно работающей (экспрессирующейся) ге-

нетической конструкции, содержащей смысловую (кодирующую белок) и регуляторную части гена. На следующем этапе решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени. Затем проводится трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени, оценивается эффективность трансфекции, степень коррегируемости первичного биохимического дефекта в условиях клеточных культур (*in vitro*) и, что особенно важно, *in vivo* на животных – биологических моделях. Только после этого можно приступать к программе клинических испытаний.

ГЕНОТЕРАПИЯ МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Успех первых клинических испытаний явился мощным стимулом для ускорения развития новых генотерапевтических методов применительно к другим наследственным болезням. В табл. 2 приведены список болезней, для которых принципиально возможен генотерапевтический подход, генокоррекция которых с большой вероятностью будет осуществлена уже в обозримом будущем, а также те

Таблица 2. Наследственные заболевания, генокоррекция которых находится на стадии клинических испытаний (КИ), экспериментальных разработок (ЭР) и принципиально возможна (ПВ) [1, 7]

Болезнь	Дефектный ген	Клетки-мишени	Стадия
Иммунодефицит	Аденозиндезаминаза	Лимфоциты	КИ
Иммунодефицит	Пуриннуклеозидфосфорилаза	Лимфоциты	ПВ
Семейная гиперхолестеринемия	Рецептор липопротеинов низкой плотности	Гепатоциты	КИ
Гемофилия В	Фактор IX	Фибробласты	КИ
Гемофилия А	Фактор VIII	Миобласты, фибробласты	ЭР
Болезнь Гоше (сфинголипидоз)	β -Глюкоцереброзидаза	Макрофаги, стволовые клетки	КИ
Болезнь Хантера	Идуронатсульфатаза	Макрофаги, стволовые клетки	ПВ
Синдром Гурлера	L-идуронидаза	Макрофаги, стволовые клетки	ПВ
Эмфизема легких	α -1-Антитрипсин	Лимфоциты	ЭР
Муковисцидоз	CF-трансмембранный регулятор	Эпителий бронхов	КИ
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза	Гепатоциты	ЭР
Гипераммонемия	Орнитинтранскарбамилаза	Гепатоциты	ПВ
Цитрулинемия	Аргиносуццинатсинтаза	Гепатоциты	ПВ
Мышечная дистрофия Дюшенна	Дистрофин	Миобласты, миофибриллы	ЭР
Талассемия	β -Глобин	Эритробласты	ЭР
Серповидноклеточная анемия	β -Глобин	Эритробласты	ЭР
Респираторный дистресс-синдром	Сурфактант белок В	Эпителий бронхов	ЭР
Хронический грануломатоз	NADPH-оксидаза	Гранулоциты	ЭР
Болезнь Альцгеймера	Белок – предшественник β -амилоида (ААР)	Нервные клетки	ЭР
Болезнь Паркинсона	Тирозингидроксилаза	Миобласты, фибробласты, нервные клетки	ЭР
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А	Стволовые клетки крови, нервные клетки	ПВ
Синдром Леш-Нихана	Гипоксантинфосфорибозилтрансфераза	Нервные клетки	ПВ

заболевания, для которых уже имеются официально утвержденные протоколы и которые находятся на разных стадиях клинических испытаний.

ГЕНОТЕРАПИЯ НЕНАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Одновременно с развитием исследований в области генокоррекции наследственных дефектов успешными также оказались поиски методов терапевтического использования смысловых последовательностей ДНК для лечения ненаследственных заболеваний, и главным образом злокачественных опухолей и вирусных инфекций. Существенно, что именно в этих разделах патологии поиски путей генокоррекции проводятся особенно интенсивно, а число уже одобренных протоколов клинических испытаний во много раз превышает число таковых для лечения моногенных болезней [7].

В табл. 3 перечислены основные методологические подходы к генотерапии различных опухолей, разработанные и уже широко используемые. Многие из этих подходов вполне приложимы и для борьбы с наиболее серьезными инфекционными заболеваниями, например с ВИЧ-инфекцией (СПИДом).

Результаты первых клинических испытаний этих подходов оказались в высшей степени обнадеживающими, в особенности при лечении нейродегенеративных и онкологических заболеваний нервной системы.

НЕКОТОРЫЕ ЭТИЧЕСКИЕ И СОЦИАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Появление принципиально новых технологий, позволяющих активно манипулировать с генами и их фрагментами и обеспечивающих адресную доставку новых блоков генетической информации в заданные участки генома, стало важным событием в биологии и медицине.

Уже сейчас на современном уровне знаний о геноме человека теоретически вполне возможны такие его модификации с целью улучшения некоторых физических (например, рост), психических и интеллектуальных параметров. Таким образом, современная наука о человеке на своем новом витке развития вернулась к идее улучшения человеческой породы, когда-то постулированной выдающимся английским генетиком Ф. Гальтоном и развитой его учениками и последователями в Великобритании (К. Пирсон, Л. Пенроуз, Дж. Холдэйн), в России (Н.К. Кольцов, Ф.П. Филипченко), в США (Г. Мёллер). Дальнейший ход истории, как известно, полностью дискредитировал саму идею улучшения человеческой породы. Однако грядущее всевластие человека над собственным геномом заставляет вновь и вновь возвращаться к этой теме, делает ее предметом постоянных оживленных дискуссий в широкой и научной печати [2]. Не вызывает сомнения, что первоначальные опасения, связанные с генной инженерией человека, были неоправданны. Уже признано целесообразным применение генной терапии для лечения многих заболеваний. Единственным и неперемным ограничением, сохраняющим свою силу и в современных условиях, является то, что все генотерапевтические мероприятия должны быть направлены только на конкретного больного и касаться исключительно его соматических клеток.

Современный уровень знаний не позволяет проводить коррекцию генных дефектов на уровне половых клеток и клеток ранних доимплантационных зародышей человека в связи с реальной опасностью засорения генофонда нежелательными искусственными генными конструкциями или внесением мутаций с непредсказуемыми последствиями для будущего человечества. Вместе с тем в научной литературе все чаще и настойчивее раздаются призывы к возобновлению дискуссии о целесообразности

Таблица 3. Основные подходы в генокоррекции онкологических заболеваний

Принцип	Вводимые гены
Повышение иммунореактивности опухоли	Гены чужеродных антигенов, цитокинов
Генетическая модификация иммунных клеток	Гены цитокинов, костимуляторов
Инсерция генов "чувствительности" либо генов "-самоубийц"	Гены тимидинкиназы HSV, цитозин дезаминазы
Блок экспрессии онкогенов	Антисмысловые Ki-gas мРНК, гены внутриклеточных антител p53
Инсерция генов-супрессоров опухолей	Гены лекарственной устойчивости тип 1
Защита нормальных клеток от химиотерапии	Гены интерлейкина-2, интерферона
Индукция синтеза противоопухолевых веществ нормальными клетками	Вакцины типа БЦЖ, экспрессирующий опухолевый антиген
Продукция противоопухолевых рекомбинантных вакцин	Гены трансферазы, глутатион синтетазы
Локальная радиопротекция нормальных тканей с помощью антиоксидантов	

генокоррекции зародышевых и половых клеток человека.

Вот некоторые вопросы, которые должны быть решены в рамках предлагаемой генетиками широкой дискуссии по генной терапии.

1. Сможет ли в будущем генная терапия обеспечить столь полноценную генокоррекцию, которая не представит угрозы для потомства?

2. В какой мере полезность и необходимость генотерапевтической процедуры для одной супружеской четы перевесят риск такого вмешательства для всего человечества?

3. Сколь оправданны будут эти процедуры на фоне грядущего перенаселения планеты?

4. Как будут соотноситься генноинженерные мероприятия на человеке с проблемами гомеостаза общества и биосферы?

Таким образом, генетическая революция, апофеозом которой явилась генотерапия, не только предлагает реальные пути лечения тяжелых наследственных и ненаследственных недугов, но и в своем стремительном развитии ставит перед обществом новые проблемы, решение которых настоятельно необходимо уже в ближайшем будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Culver K.W.* Gene Therapy: A Handbook for Physicians. N.Y.: May Ann Liebert Inc. Publ., 1994. 117 p.

2. *Kay M.A., Liu D., Hoogerbrugge P.M.* // Gene Therapy: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 12744–12746.

3. *Cohen-Haguenaer O.* Gene Therapy: Regulatory Issues and International Approaches to Regulation // Curr. Opin in Biotechnol. 1997. Vol. 8. P. 361–369.

4. *Hodgson C.P.* The Vector Void in Gene Therapy // Biotechnology. 1995. Vol. 13. P. 222–225.

5. *Smith K.T., Shepherd A.J., Boyd J.E., Lees J.M.* Gene Delivery Systems for Use in Gene Therapy: An Overview of Quality Assurance and Safety Issues // Gene Therapy. 1996. Vol. 3. P. 190–200.

6. *Moreadith R.W., Radford N.B.* Gene Targeting in Embryonic Stem Cells: The New Physiology and Metabolism // J. Mol. Med. 1997. Vol. 75. P. 208–216.

7. *Herrman E.* Clinical Application of Gene Transfer // Ibid. 1996. Vol. 74. P. 213–221.

* * *

Владислав Сергеевич Баранов, доктор медицинских наук, профессор Санкт-Петербургского государственного университета, зав. лабораторией пренатальной диагностики наследственных заболеваний Института акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, главный специалист Санкт-Петербурга по медицинской генетике. Область научных интересов – генетика и цитогенетичное развитие человека, геном человека, генная терапия. Автор более 300 научных публикаций, трех монографий и соавтор четырех монографий.