Вопросы медицинской химии, 2000, том 46, №3, с.264-278

УДК 575.1/. 2:616/577. 21
© Е.К. Гинтер

ГЕНОТЕРАПИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Е.К. ГИНТЕР

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва
315478, Москва, ул. Москворечье, 1
Факс: 324-0702

В обзоре представлены основные достижения в разработке методов генотерапии моногенных наследственных болезней. В настоящее время картировано более 1000 генов моногенных наследственных болезней, несколько сотен из них идентифицировано, что является обязательной предпосылкой для генотерапии. Разработаны различные способы доставки рекомбинантных генетических конструкций, в том числе физические, с помощью вирусных векторов, а также с использованием рецептор-опосредованного переноса в клетки мишени *in vitro* и *in vivo*. Определены необходимые условия для экспрессии трансгенов. Одобрено несколько десятков протоколов генотерапии моногенных наследственных заболеваний. При генотерапии наследственного иммунодефицита, обусловленного недостаточностью аденозинде-заминазы, зарегистрирован клинический эффект.

Муковисцидоз является одним из первых заболеваний, для которого началась разработка методов генотерапевтической коррекции. Оказались достаточно успешными экспериментальные исследования по созданию генетических конструкций с геном муковисцидозного трансмембранного регулятора (МТР), векторов для доставки этой конструкции в эпителий дыхательных путей и безопасности генотерапевтических манипуляций. В то же время 1-я фаза клинических испытаний показала, что ряд физиологических и патофизиологических особенностей муковисцидоза, которые не могли быть учтены в эксперименте, снижают эффективность переноса генетической конструкции, продолжительность ее экспрессии, или даже вызывают нежелательную воспалительную реакцию в месте доставки конструкции в аденовирусном векторе. В настоящее время предпринимаются интенсивные попытки преодолеть возникшие препятствия на пути генотерапии муковисцидоза.

Ключевые слова: наследственные болезни; гены; рекомбинантная ДНК; векторы; трансфекция; трансгеноз; генотерапия; муковисцидоз; ген муковисцидозного трансмембранного регулятора

Генотерапия теоретически может быть использована для лечения самых разнообразных заболеваний человека: моногенных, мультифакториальных, в том

числе, онкологических, инфекционных, дегенеративных, неврологических и т.д. Обязательным условием является достаточно хорошее знание патогенеза заболевания, которое мы собираемся лечить с помощью генотерапии, по крайней мере тех его звеньев, которые являются, с одной стороны, геноконтролируемыми, а с другой - критически важными в процессе развития заболевания. Для моногенных заболеваний ситуация упрощается, так как генотерапия может планироваться даже в том случае, когда мы не знаем патогенез заболевания, но знаем, функция какого гена должна быть исправлена.

МОНОГЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В настоящей статье мы рассмотрим состояние исследований по генотерапии моногенных заболеваний, обратив особое внимание на достижения в области генотерапии муковисцидоза. Известно, по-видимому, не менее 4000 моногенных наследственных болезней и их число, теперь уже медленнее, чем это было раньше, постепенно растет. Моногенные заболевания поражают все органы и системы органов, и значительная их часть проявляется в виде синдромов. По типу наследования различают рецессивные заболевания, среди которых значительную часть составляют наследственные болезни обмена веществ (считается, что они являются наиболее перспективным объектом для генотерапии), доминантные заболевания, причиной которых во многих случаях являются мутации в генах структурных белков (теоретически менее удобный объект для генотерапии) и сцепленные с Х-хромосомой заболевания, как рецессивные, так и доминантные. К настоящему времени картировано, более 1000 генов наследственных болезней и, по крайней мере, несколько сотен генов идентифицировано, т.е. для этих генов выполнено одно из условий их использования в качестве генотерапевтического средства.

Генотерапия моногенных заболеваний, как, впрочем, и других заболеваний может быть реализована при выполнении ряда условий. Прежде всего, должен быть выделен соответствующий ген с его регуляторными последовательностями. Существуют два основных класса регуляторных последовательностей. Во-первых, это цис-регуляторные последовательности, т.е. расположенные в той же хромосоме, что и регулируемый ген. Цис-регуляторные последовательности могут выступать в качестве промоторов, и в этом случае они располагаются непосредственно за 5'-концом от инициирующей последовательности гена. Цис-регуляторные последовательности могут действовать как энхансеры, и тогда они могут быть расположены в любой ориентации и на любом расстоянии от регулируемого гена. Во-вторых, это транс-регулирующие последовательности, которые могут быть расположены в других хромосомах и которые действуют на оба гомологичных аллеля. Считается, что при трансгенозе, соответствующий ген должен переноситься с цис-регулирующими последовательностями, а транс-действующие регуляторные белки будут поставляться клеткой-реципиентом [1]. Сведения о требуемых для регулируемой экспрессии трансгенов цис-расположенных регуляторных элементах были почерпнуты по большей части из экспериментов с трансгенными мышами [2]. Оказалось, что в некоторых случаях для адекватной экспрессии "чужого" гена достаточно его перенести вместе с промотором, в то время как в других случаях в переносимую генетическую конструкцию для ее регулируемой экспрессии, как, например, для генов α-или β-глобина, кроме пучков соответствующих генов, необходимо вводить регуляторные области, расположенные на значительном расстоянии от самих

генов [3, 4].

В общем виде многие авторы полагают, что гены "домашнего хозяйства" не требуют очень точной регуляции их экспрессии, в то время как генам, действующим тканеспецифически, такая регуляция необходима.

МЕТОДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ

Для успешной генотерапии соответствующий изолированный ген должен быть эффективно доставлен в клетки-мишени. В настоящее время используются различные методы переноса генов, в том числе физические (прямая инъекция в ткань "голого" гена, кальций - фосфатная трансфекция, перенос с помощью липосом, электропорация и др.), перенос генов с помощью ретровирусов или других вирусных векторов, прицельная доставка генов в определенный тип клеток с использованием рецепторов этих клеток и некоторые другие методы [5]. Эти методы различаются по эффективности доставки генетических конструкций в клетки-реципиенты. Физические методы доставки генов считаются наименее эффективными: трансфицируется небольшой процент клеток-реципиентов, лизосомы разрушают проникшую в клетку чужеродную ДНК, и, в результате, только в отдельных клетках, подвергнутых обработке, введенные генетические конструкции оказываются встроенными в геном этих клеток. Тем не менее, было показано что даже при обычной инъекции ДНК в мышцы, она способна проникать в мышечные клетки и экспрессироваться там в течение года [б]. Вирусные векторы значительно более эффективно переносят встроенные в них генетические конструкции в клетки-мишени, при этом ретровирусные векторы инфицируют делящиеся клетки и интегрируются случайным образом в их геном вместе со встроенными генетическими конструкциями, а аденовирусные векторы, напротив, трансфицируют неделящиеся клетки и не встраиваются в их геном. В качестве вирусных векторов для доставки генетических конструкций в клетки-мишени использовались также адено-ассоциированные вирусные векторы, которые неслучайным образом встраиваются в определенный район 19 хромосомы, векторы на основе вируса герпеса, вируса противооспенной вакцины и вируса человеческого иммунодефицита и др. Все вирусы, кроме адено-ассоциированного вируса, когда используются в качестве векторов, генетически модифицируются, так что они оказываются неспособными к самостоятельной репликации в клетке-хозяине, но сохраняют способность инфицировать эти клетки, а также избегать деградации лизосомами. Вирусные векторы обладают выраженным в большей или меньшей степени тропизмом к определенной ткани, что может быть использовано для направленной доставки генотерапевтической конструкции. Так, аденовирус тропен к эпителию дыхательных путей, вирус герпеса тропен к нейронам ЦНС, вирус гепатита - к клеткам печени и т.д.. Вирусные векторы отличаются также по способности встраивать большие или меньшие отрезки чужеродной ДНК и по ряду других характеристик, важных с точки зрения их использования для переноса генов человека.

Следует упомянуть также о возможности переноса и обеспечения функционирования человеческих генов в составе искусственных хромосом. Такие хромосомы могут нести большие отрезки ДНК, содержащие несколько генов со всеми регулирующими последовательностями. Примером искусственных хромосом могут служить YACи. Требуется, однако, проделать еще значительную работу, для того чтобы установить, какие центромерные и теломерные участки хромосом должны быть в составе этих искусственных хромосом, чтобы они

могли успешно реплицироваться в митозе [1].

Для направленной доставки генетической конструкции, предназначенной для генотерапии, в определенный тип клеток, помимо вирусов используются и другие способы. Ген, или его переносчик могут быть прикреплены к комплексу полилизин - асиалогликопротеин. Такой комплекс захватывается рецепторами гепатоцитов, и, в результате, генетическая конструкция проникает в печеночную клетку и может начать в ней функционировать.

Проблема направленной доставки соответствующего рекомбинантного гена просто решается в том случае, когда клетки определенного типа (лимфоциты, стволовые гемопоэтические клетки, фибробласты, кератиноциты или гепатоциты) извлекаются из организма, трансфицируются *in vitro* и после культивирования или непосредственно после трансфекции возвращаются в организм (генотерапия *ex vivo*).

ГЕНОТЕРАПИЯ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

Таким образом, к началу 90-х годов был накоплен достаточно большой экспериментальный опыт по созданию генетических конструкций, конструированию различных переносчиков для этих конструкций, трансфекции ими различных типов клеток *in vitro* и *in vivo*, чтобы можно было приступить к собственно генотерапии моногенных заболеваний. Весь этот сложный процесс подготовки к генотерапии заболеваний человека, а также итоговая таблица со списком моногенных заболеваний, генокоррекция которых находилась на разных стадиях реализации, представлены в монографии В.Н. Горбуновой и В.С. Баранова [7]. В этом списке значительную часть составляют наследственные болезни обмена веществ, такие как болезнь Гоше (сфинголипидоз), синдромы Хантера и Гурлера (мукополисахаридозы), фенилкетонурия, гипераммониемия, цитрулинемия, синдром Леша-Нихана (недостаточность гипоксантин-фосфорибозил-трансферазы), метахроматическая лейкодистрофия (недостаточность арил-сульфатазы **А**), наследственные иммуннодефициты, обусловленные недостаточностью аденозиндезаминазы и пуриннуклеозидфосфорилазы и др. В список также включены такие неметаболические заболевания, как гемофилии А и В, связанные с недостаточностью VIII и IX факторов свертывания крови, семейная гиперхолестеринемия (недостаточность рецепторов липопротеинов низкой плотности), муковисцидоз (недостаточность муковисцидозного белка-регулятора трансмембранной проводимости), миодистрофия Дюшенна (недостаточность дистрофина) и некоторые другие заболевания. К этому списку за последние несколько лет добавилось еще несколько наследственных болезней, кандидатов для генотерапии: наследственные нефриты [8], наследственные ретинопатии [9], некоторые формы тугоухости [10].

Начиная с 1989 г., когда был разрешен первый протокол для клинических испытаний генотерапии, по 1998 г. одобрено более 300 протоколов, которые предусматривают испытания генотерапии на более, чем 2500 больных [11]. В абсолютном большинстве случаев реализация этих протоколов означает разные фазы клинических испытаний генотерапии онкологических и других мультифакториальных заболеваний, однако, по крайней мере несколько десятков протоколов касаются клинических испытаний генотерапии при моногенных заболеваниях. Наиболее очевидный эффект, включая существенное уменьшение, или даже исчезновение клинической симптоматики, достигнут при генотерапии

врожденного наследственного иммунодефицита, обусловленного недостаточностью аденозиндезаминазы. При этом заболевании собственные лимфоциты больных после иммуностимуляции трансфицировали ретровирусным вектором, содержащим нормальный ген аденозиндезаминазы, после чего их возвращали в кровоток больного. Всю генотерапевтическую процедуру периодически повторяли. Уже после первых трансфузий генетически измененных лимфоцитов наблюдали не только восстановление иммунологических и биохимических показателей у больных, но и существенное улучшение клинической картины. Если первые клинические испытания генотерапии недостаточности аденозиндезаминазы еще вызывали критику, и не считались доказанными, то теперь практически не осталось сомнения в эффективности генотерапии этого заболевания [12].

В отношении других наследственных болезней добиться столь же значительных успехов в генотерапии пока не удалось, и в лучшем случае протоколы предусматривают реализацию 1-й фазы клинических испытаний, т.е. доказательство возможности переноса гена и обнаружения его эффектов на биохимическом - физиологическом уровне.

Теперь мы перейдем к более подробному анализу попыток генотерапии при муковисцидозе.

ГЕНОТЕРАПИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

Муковисцидоз, или кистозный фиброз поджелудочной железы, является тяжелым аутосомно-рецессивным заболеванием, еще недавно считавшимся летальным. Распространенность муковисцидоза весьма вариабельна в разных странах. В большинстве стран Западной Европы она составляет примерно 1 больной на 2500 новорожденных. По нашим данным [13], средняя частота муковисцидоза в России должна составлять примерно 1 больной на 12500 новорожденных.

Ген муковисцидоза, названный муковисцидозным трансмембранным регулятором (МТР), был картирован, а затем клонирован в 1989 г. [14,15]. Белок, кодируемый этим геном, т.н. трансмембранный регулятор проводимости (МТРП), является белком мембран эпителиальных клеток. Его основная функция заключается в создании регулируемого цАМФ хлорного канала, но не исключено, что он выполняет также другие функции. Мутации в гене МТР приводят к изменению структуры или количества белка МТРП, что обусловливает нарушение транспорта ионов и молекул воды через мембраны эпителиальных клеток большинства экзокриновых желез в легких, кишечнике, поджелудочной железе, желчных протоках, семенных канальцах и т.д. В результате, слизь, выделяемая экзокриновыми железами, становится обезвоженной, вязкой, что способствует развитию и сохранению в ней инфекции и воспалительного процесса. Наиболее серьезные последствия воспалительного процесса возникают в легких и в кишечнике.

Клиническая классификация муковисцидоза, выделяющая легочную, кишечную и смешанную формы, является отражением того, в каком из органов вторичный патологический процесс является наиболее интенсивным.

Лечение муковисцидоза является симптоматическим и включает ферментотерапию, направленную на коррекцию нарушений экзокриновой функции поджелудочной железы, антибиотикотерапию респираторных инфекций, в т.ч. антибиотикотерапию синегнойной палочки, диетотерапию, физиотерапию,

терапию муколитиками. В последние годы такая схема лечения больных муковисцидозом, особенно в связи с появлением антибиотиков нового поколения против синегнойной палочки, принесла свои плоды - удалось существенно увеличить продолжительность жизни больных муковисцидозом, так что в странах Западной Европы и США она приблизилась к 40 годам. В то же время, такие результаты традиционного лечения не удовлетворяют ни больных, ни врачей. Поэтому, муковисцидоз с самого начала формирования идеи генной терапии рассматривался как один из первых кандидатов для ее реализации.

Существует несколько благоприятных предпосылок для генной терапии муковисцидоза. Во-первых, эксперименты на культурах клеток, полученных от больных муковисцидозом, показали, что введение в клетку единственной копии кодирующей последовательности гена МТР, исправляет дефект ионного транспорта, характерный для этих клеток. Более того, было установлено, что трансфекция только 10% клеток конструкцией, составленной из ретровируса и кДНК нормального гена МТР, обусловливает исправление транспорта хлора во всем монослое, по-видимому, вследствие обмена ионами между соседними клетками [16]. Необходимость только частичной коррекции генного дефекта для получения выраженного клинического результата была подтверждена также в опытах с интеркроссами ряда линий мышей с разными аллелями гена МТР, модулирующими проявление гена от О до 100%. Показано, что 5% уровень нормальной экспрессии гена МТР приводит к исправлению на 50% транспорта ионов хлора и отсутствию кишечных проявлений гена МТР [17]. Во вторых, было показано, что ген МТР не требует какой-то особенной регуляции, т.к. в трансфицированной культуре клеток не наблюдается избыточной продукции белка МТРП [18], а постоянный синтез человеческого МТРП в трансгенных мышах не является токсичным для клеток и не приводит к поражению органов мыши [19]. В третьих, разработано несколько мышиных моделей муковисцидоза с мутациями в собственном гене МТР мыши, которые могут быть использованы для тестирования эффективности соматической генной терапии муковисцидоза. Следует заметить, что у мышей муковисцидоз проявляется не менее разнообразно, чем у человека. Только некоторые мышиные модели муковисцидоза обнаруживают типичные нарушения ионного транспорта и более или менее характерные клинические симптомы муковисцидоза человека, особенно в желудочно-кишечном тракте. В то же время при мышином муковисцидозе практически отсутствуют симптомы нарушения ионного транспорта в тканях легких [20], что, естественно, ставит вопрос об адекватности моделей. Олтон с соавт. [21] разработали элегантный неинвазивный метод выявления дефекта ионного транспорта с помощью измерения различий в электрическом потенциале эпителиальных клеток, выстилающих полость носа. Этот метод продолжает использоваться практически во всех клинических протоколах генной терапии муковисцидоза, причем в большинстве клинических протоколов восстановление ионного транспорта в эпителиальных клетках носа является суррогатной конечной целью испытаний с генной терапией муковисцидоза. Несмотря на то, что при муковисцидозе первично поражаются многие органы, основные усилия исследователей направлены прежде всего на исправление генного дефекта в легких и особенно в бронхах и бронхиолах. С клинической точки зрения это понятно и оправдано.

Для соматической генной терапии *in vitro* наиболее широкое применение в

качестве векторов для переноса нормального гена МТР получили рекомбинантные аденовирусы и липосомы, которые легко могут быть доставлены в орган-мишень (легкие) с помощью ингаляции.

ПЕРЕНОС ГЕНА МТР С ПОМОЩЬЮ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Аденовирусы привлекли внимание исследователей прежде всего по той простой причине, что они эффективно инфицируют легочный эпителий - это их естественный путь размножения. Размер генома аденовируса составляет 36 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.), сам вирус легко проникает в неделящиеся клетки, не встраиваясь в их геном, после чего начинается интенсивный синтез белков вируса. Аденовирусные векторы, используемые для генной терапии, являются дериватами аденовирусов типа 2 и/или 5. Оба этих типа относятся к группе С аденовирусов, для которой не зарегистрирован онкогенный потенциал. Для использования аденовируса в качестве вектора из его генома делетируется Е1, а во многих конструкциях и Е3 область [22]. Делеция области Е1 приводит к тому, что вирус становится дефицитным по репликации, т.е., такой вирус способен заразить клетку-хозяина, но неспособен в ней размножаться. Недавно были сконструированы и апробированы в качестве вектора рекомбинантные аденовирусы, в которых были делетированы практически все вирусные гены [23]. В аденовирусные векторы такого типа может быть упаковано до 38 т.п.н. ДНК, содержащих вставку до 7,5 т.п.н. Разработан целый ряд конструкций аденовирус-кДНК МТР. В этих конструкциях сохранены различные последовательности вирусного генома, а кДНК МТР подставлены под разные промоторы, которые обеспечивают эффективную экспрессию кДНК МТР. Так, рекомбинантная кДНК МТР-Ad CFTR создана на основе генома аденовируса 5 типа, в котором делетированы Е1 и Е3 области. Кодирующая часть человеческого гена МТР размером 4,5 т.п.н. поставлена под контроль главного позднего промотора и его трехчленных модифицирующих последовательностей аденовируса типа 2С на 5'-конце и сайта полиаденилирования SV40 на 3'-конце [24]. Похожий вектор для экспрессии гена МТР также создан на основе генома аденовируса 5 типа - Ad.CB-CFTR. В нем в качестве промотора для гена МТР использован промотор гена актина цыпленка [25]. В конструкции Ad2/CFTRl сохранен ген Е3 аденовируса, а кДНК МТР гена экспрессируется под контролем транскрипционных элементов аденовируса типа 2 [26]. Впрочем, проблема собственных контролирующих элементов в гене МТР не может считаться полностью решенной. Например, было показано, что YAC, содержащий полную копию человеческого гена МТР плюс 50 т.п.н. с 5' конца ДНК, при переносе в клетки аденокарциномы толстого кишечника, обеспечивает такую же экспрессию гена МТР, как и собственный, эндогенный ген, экспрессирующийся в этой клеточной культуре [27]. Предпринята также попытка создать химерный промотор для генной терапии с использованием фрагментов 5'-фланкирующей области гена МТР, множественных тандемных повторов консенсусной области и фланкирующих элементов района, ответственного за цАМФ стимуляцию. Такой промотор, по идее авторов, должен обеспечивать усиленную транскрипцию рекомбинантного гена в ответ на искусственно создаваемый фармакологическими агентами высокую концентрацию цАМФ в клетке. Действительно, было продемонстрировано, что интраназальное введение аденовирусного вектора, содержащего ген бета-галактозидазы под таким промотором, обуславливает экспрессию этого гена, которая может быть увеличена в 11 раз в клетках легочного эпителия, при

введении ингибитора фосфодиэстеразы и аналога цАМФ [28].

Аденовирусные векторы могут быть получены с высоким титром, что является обязательным условием эффективной генной терапии, причем они сохраняют высокий уровень инфекционности. Последняя обусловлена тем, что прикрепление вируса к клетке является рецептор-обусловленным, а проникновение генома вируса в клетку происходит при участии клеточных интегринов [29]. Кроме того, вирус обладает способностью избегать деградации в лизосомах. В то же время было показано, что рецептор-обусловленное прикрепление вируса к эпителиальной клетке в действительности реализуется не слишком эффективно, поскольку апикальные мембраны дифференцированных эпителиальных клеток дыхательных путей теряют рецепторную активность для связывания вируса. Кроме того, воспалительный процесс, индуцированный в тканях легких *P. aeruginosa*, также является, по-видимому препятствием для эффективного трансгеноза с помощью рекомбинантного аденовируса [30]. Эффективность инфицирования и трансгеноза может быть существенным образом повышена, если использовать копреципитат рекомбинантного аденовируса и фосфата кальция. В результате реализуются другие механизмы прикрепления вируса к клетке [31].

В предварительных экспериментах было показано, что рекомбинантные аденовирусные векторы, содержащие ген β-галактозидазы, эффективно инфицируют все типы эпителиальных клеток дыхательных путей у грызунов [32]. кДНК человеческого гена МТР была успешно клонирована в делетированной области Е1 генома аденовируса и экспрессия этой кДНК отчетливо выявлялась в эпителии легких хлопковых крыс [24]. При этом, белок МТРП человека детектировался в течение 2-х недель, а мРНК - до 6 недель. Аденовирусный вектор с геном МТР был использован для генотерапии трансгенных мышей с муковисцидозом с помощью интратрахеального введения вектора. Экспрессия гена МТР выявлялась в течение 6 недель, что свидетельствовало о достаточно медленной замене эпителия дыхательных путей и, следовательно, о возможности использования такого способа генотерапии [33]. Рекомбинантный аденовирус, содержащий кДНК гена МТР, успешно восстанавливал *in vitro* цАМФ стимулированную проницаемость для ионов CL в свежеизолированных человеческих эпителиальных клетках носа и бронхов больных муковисцидозом [34]. С использованием модели ксенотрансплантата бронхов от больных муковисцидозом было также показано, что одноразовое введение рекомбинантного аденовируса эффективно трансдуцирует высокий уровень экспрессии гена МТР лишь в 11% эпителиальных клеток, но при этом коррекция в степени проницаемости клеток для Cl^- достигает 91% от нормального уровня. В то же время при таком уровне экспрессии трансгена МТР не происходит восстановления внутриклеточного процессинга гликопротеина, который также меняется при муковисцидозе [35]. В связи с тем, что в первой фазе клинических испытаний аденовирусные вектора, содержащие ген МТР, вызывали воспалительную реакцию в тканях дыхательных путей, предприняты усилия получить аденовирусные конструкции следующего поколения. Одна из таких конструкций представляла собой аденовирус, у которого был не только делетирован Е1 ген, но и Е2 ген, ответственный за ДНК связывающийся белок, содержал температурочувствительную мутацию. Было показано, что такой вектор, введенный в легкие обезьянам, вызывает существенно меньшее периваскулярное

воспаление, чем векторы предыдущего поколения [36]. Исследована также возможность использовать для повторного трансфецирования клеток легочного эпителия аденовирусные векторы, относящиеся к разным субтипам вирусов [37].

ПЕРЕНОС ГЕНА МТР С ПОМОЩЬЮ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ.

Вторым наиболее распространенным вектором для переноса кДНК гена МТР *in vivo* и *in vitro* является комплекс катионные липосомы-ДНК. Катионные липиды обеспечивают высокоэффективное связывание ДНК с образованием нуклеолипидных частиц. Катионные липосомы представляют собой липидные пузырьки, поверхность которых несет положительный заряд. В результате происходит слияние положительно заряженных липосом с отрицательно заряженными клеточными мембранами. Липосомы могут захватывать значительно более длинные последовательности ДНК, вплоть до ДНК YACов размером 650 т.п.н. В отношении липосом нет тех опасений, которые возникают при использовании вирусной трансфекции, в частности в их токсичности или иммуногенности. Липосомы могут быть сконструированы таким образом, что после их слияния с клеточной мембраной и доставки в клетку рекомбинантной ДНК, они деградируют естественным путем.

Разработано значительное число различных липосом.* Один из типов – DC-Chol/DOPE ((N-(N'"N') - диметиламиноэтан-карбамоил, холестерин) был использован как переносчик рекомбинантной ДНК и не вызывал никакой токсической или аутоиммунной реакции при внутривенном введении мышам в высокой концент-рации [38]. Эти липосомы были успешно применены для переноса генетических конструкций в экспериментах на добровольцах для лечения рака [39].

Ряд генов, в т.ч. кДНК гена МТР были успешно введены с помощью липосом DOTMA/DOPA в ткань легких мышей *in vivo*, где они обнаруживали экспрессию [40]. Липофектин [41] и DOPE/DC-Chol [42] использованы для доставки кДНК гена МТР человека в легкие 2 трансгенных линий мышей с помощью интратрахеального введения с последующим распылением. Продукты гена обнаруживались в ткани легких в течение определенного времени. На мышах, а также на культуре клеток была апробирована конструкция, в которой в качестве вектора для переноса *lacZ* кДНК были взяты катионные липосомы ϖ - (1-(2,3 диолеоилокси)пропил)–триметил аммонийметилсульфат (DOTAP). Было показано, что при аэрозольном введении ген *lacZ* попадает и экспрессируется в эпителиальных клетках дыхательных путей [43]. Исправление электрофизиологического нарушения в течение 8-9 дней, наблюдаемого в трахее муковисцидозных мышей, удалось достичь при интратрахеальном введении комплекса pCMV-CFTR-DOTAP [44]. В то же время, количественная оценка эффективности трансгеноза показывает, что трансфекционная активность липосом не очень высокая. Так, введение плазмидной ДНК, содержащей ген МТР в составе катионных липидов GL-76 в назальный эпителий трансгенных мышей с муковисцидозом с помощью перфузии, показало, что при этом не наблюдается коррекции дефекта транспорта (Na^+), а транспорт хлора (Cl^-) восстанавливается лишь частично. Правда, введение той же конструкции в легкие обеспечивала вполне заметную генную трансдукцию и физиологический эффект [45]. Было показано также, что повторное введение комлекса кДНК МТР - липосомы мышам с муковисцидозом не вызывает побочных эффектов и восстанавливает

*Расшифровку сокращений и другие сведения по геносомам *in vivo* см. в статье Е.В. Богданенко и соавт. в этом номере (прим. ред.)

цАМФ-зависимую секрецию хлора в эпителиальных клетках трахеи, как и первое введение [46].

ДРУГИЕ МЕТОДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНА МТР

Кроме аденовирусов и липосом в качестве векторов для переноса рекомбинантной ДНК гена МТР предпринимались небезуспешные попытки использовать и другие носители. Лей с соавт. [47] создали и испытали конструкцию на основе вируса Эпштейна-Барра, в которой ген МТР регулировался длинным терминальным повтором вируса саркомы Рауса. Лентивирусный вектор с геном МТР успешно вызывал генную трансдукцию в человеческом ксенотрансплантате бронхов. При этом, трансдукция происходила только в недифференцированных эпителиальных клетках [48]. В работе Жанга с соавт. [49] в качестве вектора был использован адено-ассоциированный вирус, в который были вставлены укороченные гены МТР с промоторами (весь ген МТР не помещается даже в модифицированном геноме адено-ассоциированного вируса). При этом было показано, что некоторые мини МТР гены эффективно и в течение длительного времени экспрессируются в клетках-мишенях, сохраняя функцию нормального МТР гена. Апробирована также невирусная конструкция - ExGen 500, представляющая собой производное линейно организованного полиэтиленимина, как вектора для переноса генетического материала в эпителиальные клетки *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что такая конструкция значительно более эффективно переносит рекомбинантную ДНК в ткань легких, чем липосомы [50]. В исследованиях отечественных авторов [51] были получены интересные результаты по доставке нескольких генов, в том числе гена МТР, с помощью вирусных олигопептидных комплексов и искусственных полимерных микросфер (ИПМ), которые вводили мышам различными способами. ИПМ обнаруживали, например, еще через 2 месяца после введения в ядрах клеток бронхиального эпителия и стромы легких. При внутримышечной инъекции самкам мышей ИПМ с маркерными генами на 13 или 15 сутки беременности эти ИПМ не только проникали через плаценту, но и накапливались в разных тканях мышиных эмбрионов, в том числе в легких.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

Если кратко подвести итоги предварительному этапу подготовки к генотерапии муковисцидоза, то можно констатировать, что они выглядели весьма обнадеживающими. Это касается как создания векторов для переноса генетических конструкций, включающих ген МТР, так и самих конструкций. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* на культурах клеток, ксенотрансплантатах и животных разных видов было показано, что можно не только осуществить эффективный перенос гена МТР в эпителиальные клетки легких, но и обеспечить достаточно высокую экспрессию человеческого гена МТР, которую можно было обнаружить не только на молекулярном, но и на физиологическом уровне. Все это позволило перейти к фазе I реализации клинического протокола генотерапии муковисцидоза. Как уже было указано, 1 фаза клинических испытаний не предусматривает достижение клинического эффекта. Она предназначена, прежде всего, для выяснения эффективности, безопасности и зависимости реакции от дозы для различных конструкций, включающих ген МТР и векторов с помощью электрофизиологической оценки степени исправления *in vivo* дефекта ионного транспорта в клетках эпителия дыхательных путей. Во всех странах, где предпринимаются клинические эксперименты по генотерапии муковисцидоза,

требуется разрешение на их проведение от специальных комитетов. В США такое разрешение необходимо получить от Food and Drug Administration и Recombinant DNA Advisory Committee, в Англии - от U.K. Committee on the Ethics of Gene Therapy и U.K. Medicines Control Agency.

Первый опубликованный клинический эксперимент по переносу гена МТР с помощью аденовируса был проведен в США [52]. В этом эксперименте трем взрослым добровольцам, больным муковисцидозом, интраназально вводили увеличивающиеся дозы рекомбинантного аденовируса, содержащего ген МТР. У всех трех больных найдено снижение различий в электрическом потенциале и увеличение силы ответа при введении антагонистов, которые сохранялись для электрического потенциала в течение трех недель, а для стимуляции цАМФ в течение 10 дней. Патологии, обусловленной введением аденовируса, в этом эксперименте обнаружено не было. Однако, в другом клиническом эксперименте с введением аденовируса интраназально и интрабронхиально у одного больного возникла выраженная воспалительная реакция, которая заставила прекратить эксперимент [53]. Еще в одном клиническом эксперименте с использованием переноса гена МТР с помощью аденовирусного вектора в эпителиальные клетки полости носа 12 больных муковисцидозом было показано, что доля трансфицированных клеток не превышает 1%, не происходит исправления функционального дефекта в эпителиальных клетках, а большие дозы вируса вызывают локальную воспалительную реакцию [54]. Французские исследователи вводили рекомбинантный репликационно дефектный аденовирус с геном МТР шести больным муковисцидозом двукратно: сначала интраназально, а затем с помощью аэрозоля в легкие. Дозы введенных рекомбинантных вирусов варьировали между больными. Не выявлялся токсический эффект от введения конструкции и не появлялись противовирусные антитела. Ad-МТР мРНК и МТРП белок детектировались вплоть до 14 дня после введения аденовируса [55].

В целом клинические эксперименты с переносом МТР гена с помощью аденовирусных векторов в клетки эпителия носа и в другие участки дыхательных путей выявили следующие проблемы: эффективность трансгеноза на основе аденовирусных векторов оказалась существенно ниже той, которую можно было ожидать на основе данных с экспериментальными моделями; высокие дозы вируса могут вызывать локальную воспалительную реакцию; даже первое введение вируса может спровоцировать иммунологическую реакцию с появлением противовирусных антител; даже если достигается физиологический эффект от введения нормального гена МТР, он оказывается преходящим и требуется повторное введение гена МТР для достижения лечебного эффекта.

Один из первых клинических экспериментов с использованием липосом для генотерапии муковисцидоза был проведен в Англии [56]. Двойной слепой эксперимент был проведен на 15 взрослых добровольцах, больных муковисцидозом. Он показал, что липосомы способны переносить ген МТР, который затем начинает функционировать в эпителиальных клетках носа, восстанавливая ионную проводимость. Липосомы не токсичны и не вызывали никакой воспалительной реакции, даже если их вводили в достаточно высокой дозе. В то же время наблюдаемая генная экспрессия имела непродолжительный характер. В другом эксперименте липосомный катионный комплекс pCMV-CFTR-DOTAP вводили интраназально восьми больным муковисцидозом (еще восьми больным вводили только буфер). Трансгенная ДНК обнаруживалась даже через

28 дней после начала эксперимента у семи больных, мРНК трансгена выявлялас у двух больных через три и семь дней после переноса. У двух больны обнаружено также частичное восстановление ионного транспорта эпителиальных клетках носа [57]. В январе 1998 г. появилось сообщение подготовке протокола для оценки эффективности различных доз комплекс GR213487B (липиды-ДНК), предназначенного для переноса гена МТР и ег экспрессии в эпителий носа добровольцев [58], однако о результатах реализаци этого протокола пока неизвестно.

Клинические эксперименты с переносом гена МТР с помощью липосо показали, что этот вектор не вызывает местной воспалительной реакции и к нем не продуцируются антитела в отличие от аденовирусного вектора. В то же врем эффективность трансгеноза при использовании липосом в качестве вектор оказалась существенно меньше, чем при переносе гена МТР с помощью аденовируса, экспрессия трансгена наблюдалась в течение короткого времени, комплекс липосомы-ДНК оказался недостаточно стабильным. Осталось также н вполне ясным не будут ли токсичны липосомы при их введении в ткань легких.

К 1998 г. было начато около 20 клинических экспериментов по гено терапии муковисцидоза (более половины в США) с использованием вирусных невирусных векторов для переноса гена МТР. Анализ результатов реализаци этих протоколов показал, что перенос гена МТР и его экспрессия в тканя дыхательных путей больных муковисцидозом происходят не так успешно, ка можно было бы ожидать на основе предварительных экспериментов. Из этог анализа также вытекает необходимость совершенствования уже имеющихс векторов для доставки гена МТР, более строгого подхода к выбору клето мишеней в эпителиальной ткани дыхательных путей на основе точны представлений о патофизиологии муковисцидоза и, возможно, разработке новы векторов. В то же время многие исследователи считают, что эти проблемы можн будет решить в ближайшие несколько лет.

Работа поддержена проектом 05. «Генодиагностика и генотерапия социально-значимых заболеваний человека» подпрограммы «Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Weatherall G.J.* (1995) Brit.Med. Bull., **51**, 1-11.
2. *Jaenisch R.* (1988) Science, **240**, 1468 - 1474.
3. *Grosveld F., Blom van Assendelft G., Greaves D.R., et al.* (1987) Cell, **51**, 975-985.
4. *Higgs D.R., Wood W.G., Jarman A.P., et al.* (1990) Genes Dev., **4**, 1588- 1601.
5. *Culver K.W.* (1994) Gene Therapy. A Handbook for Physicians. N.-Y., Mary Ann Liebert Inc. Pub.
6. *Davis H.L., Whalen R.G., Demeneix B.A.* (1993) Hum. Gene Ther., **4**, 151 - 159.
7. *Горбунова В.Н., Баранов В.С.* (1997) Введение в молекулярную диагностику и геннотерапию наследственных заболеваний. С.-Пб.
8. *Lien Y.H.,LaiL.W.* (1997) Kidney Int.,61. (Suppl.), S85-88.
9. *Hauswirth W.W., Mclnnes R.R.* (1998) Mol. Vis., **21**, 4- 11.
10. *Lalwani A.K, Walsh B.J., Reilly P.G., et al.* (1996) Gene Ther., **3**, 588-592.

11. *Palu G., Bonaguro R., Marcello A.* (1999) J. Biotechnol., **68**, 1-13.
12. *Weinberg K.I., Kohn D.B.* (1998) Semin. Hematol.. **35**, 354-366.
13. *Петрова Н.В., Гинтер Е.К.* (1997) Генетика, **33**, 1326-1328.
14. *Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.S., et al.* (1989) Science, **245**, 1066-1073
15. *Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B.S., et al.* (1989) Science, **245**, 1059-1064.
16. *Johnson L.G, Olsen J.C., Sarkadi B. et al.* (1992) Nat. Genet., **2**, 21-25.
17. *Dorin J.R., Parley R., Webb S., et al.* (1996) Gene Ther., **9**, 797-801.
18. *Gregory R.J., Cheng S.H., Rich D.P. et al.* (1990) Nature, **347**, 382-386.
19. *Whitsett J.A., Dey C.R,, Stripp B.R. et al.* (1992) Nat. Genet., **2**, 13-20.
20. *Grubb B.R., Boucher R.C.* (1999) Physiol. Rev., **79** (Suppl.), S I 93-214.
21. *Alton E.W.F.W., Hay J.G., Munro C.* (1987) Thorax., 42, 815-817.
22. *Coutel C.* (1995) Biologicals, **23**, 21-25.
23. *Fisher K.J., Choi H, Burda J. et al.* (1996) Virology, **217,** 11-22.
24. *Rosenfeld M.A., Yoshimura K, Trapnell B.C. et al.* (1992) Cell, **68**, 143- 155
25. *Yang Y., Raper S.E., Cohn J.A., et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 4601-4605.
26. *Zabner J., Petersen D.M., Puga A.P., et al.* (1994) Nat. Genet., **6**, 75-83.
27. *Vassaux G., Manson AL., Huxley C.* (1997) Gene Ther., **6**, 8-23.
28. *Suzuki K., Singh R.N., Crystal R.G.* (1996) Hum. Gene Ther., 7, 1883-1893
29. *GoldmanM.J, Wilson J.M. II* (1995) J. Virol., **69**, 5951 - 5958.
30. *van-Heeckeren A., Fercol T., Tosi M.* (1998) Gene Ther., 5, 345-351.
31. *Fasbender A., Lee J.H., Walters R.W, et al.* (1998) J. Clin. Invest., **102**, 184-193.
32. *Mastrangeli A., Danel C., Rosenfeld M.A. et al.* (1993) J. Clin. Invest., **91**, 225-234.
33. *Hyde S.C., Gill D.R., Higgins C.F.,et al.* (1993) Nature, 362, 250-255.
34. *Rosenfeld M.A., Chu C.S., Seth P.,et al.* (1994) Hum. Gene Ther., **5**, 331 -342.
35. *Zhang Y., Jiang Q.. Dudus L.,et al.* (1998) Hum. Gene Ther., **9**, 635 - 648.
36. *Goldman M.J., Litzky L.A., Engelhardt J.F., et al.* (1995) Hum. Gene Ther., **6**, 839-851.
37. *Mastrangeli A, Harvey B.G., Yao J., et al.* (1996) Hum. Gen. Ther., 7, 79-87.
38. *Stewart M.J., Plautz G.E., Del Bouno L., et al.* (1992) Hum. Gene Ther., **3**, 267-276.
39. *Nabel E.G., Gordon D., Yang Z.-Y., et al.* (1992) Hum. Gene Ther., **3**, 649 - 656.
40. *Yoshimura K., Rosenfeld M.A., Nakamura H., et al.* (1992) Nucleic Acids Res., **20**, 3233-3240.
41. *Hyde S.C., Gill D.R., Higgins C.F., et al.* (1993) Nature, **362**, 250-255.
42. *Alton E.W.F.W, Middleton P.G., Caplen N.J., et al.* (1993) Nature Genet., **5**, 135-142.
43. *McLachlan G., Davidson D.J., Stevenson B.J. et al.* (1995) Gene Ther., **2**, 614-622.
44. *McLachlan G., Ho L.P., Davidson-Smith H., et al.* (1996) Gene Ther., **3**, 1113-1123.
45. *Jiang C., O'Connor S.P., Fang S.L, et al.* (1998) Hum. Gen. Ther., **9**, 1531-1542.
46. *Goddard C.A., RatcliffR., Anderson J.R.* (1997) Gene Ther., **4**,1231-1236.
47. *Lei D.C., Kunzelmann K., Koslowsky T., et al.* (1996) Gene Ther., **3**, 427-436.

48. *Goldman M.J, Lee P.S, Yang J.S.et al.* (1997) Hum. Gene Ther., 8, 2261-2268.
49. *Zhang L., Wang D, Fisher H,, et al.* (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **95**, 10158-10163.
50. *Ferrari S., Moro E., Pettenazzo A.,et al.* (1997) Gene Ther., **4**, 1100-1006.
51. *Ivaschenko Y.E., Glazkov P., Baranov A., et al.* (1998) Am. Soc. of Gene Ther. 1-st Ann. Meet. p. 162A.
52. *Zabner J. Couture L.A., Gregory R.J. et al.* (1993) Cell, **75**, 207-216.
53. *Crystal R.G. et al.* (1994) Nat. Genet., **8**, 42-51.
54. *Knowles M.R., Hohneker K.W., Zhou Z., et al* (1995) New. Engl. J. Med., **333**, 823-831.
55. *Bellon G., Calmard L., Thouvenot D., et al.* (1996) C.R. Seances Soc. Biol. Fil., **190**, 109-142.
56. *Caplen N.J., Alton E., Middleton P.G, et al.* (1995) Nature Med., **1**, 39-46.
57. *Porteous D.J., Dorm J.R., McLachlan G., et al.* (1997) Gene Ther., 4, 210-218.
58. *Knowles M.R., Noone P.G., Hohneker K., et al.* (1998) Hum Gene Ther., **9**, 249-269.

Поступила 17.05.99.

GENE THERAPY OF HEREDITARY DISEASES

E.K. GINTER

Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences Moskvorechie st. 1, 315478, Moscow Fax: 324-0702

In the review the main advantages in development of the approaches to gene therapy of hereditary diseases are presented. Now more than 1000 genes of hereditary diseases are mapped and some hundreds are cloned which is prerequisite for gene therapy. The transfer of the recombinant gene into the cell and the subsequent expression of the transgene product are the rate-limiting steps for successful gene therapy. A variety of methods, including the use of physical methods, modified viruses and synthetic vectors, are currently being used in experiments and clinical trials. Since the approval and initiation of the first human gene therapy trial to treat ADA deficiency, there have been several dozen approved gene therapy trials but clear clinical result was stated for ADA deficiency only.

Cystic Fibrosis, CF was among several hereditary diseases which were considered as a target for gene therapy. Experiments on development of recombinant gene constructions, gene delivery by adenovirus vectors and liposomes as well as by other constructions into epithelial lung cells, gene expression and on the safety of gene therapy procedures were relatively successful.

Phase 1 gene therapy clinical trials of CF showed that some unaccounted physiological peculiarities of lung tissue of the patients diminished effectiveness of gene transfer, longevity of CFTR gene expression and in some cases unexpected immunological complications arises during clinical trials. Now an intensive attempt to overcome these problems in gene therapy of CF are undertaken.

Key words: hereditary diseases, genes, recombinant DNA, vectors, transfection, gene therapy, cystic fibrosis, CFTR gene, transmembrane conductance regulator.