

УДК 616-055.5:577.33:577.27

©Коллектив авторов

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. МИОДИСТРОФИЯ ДЮШЕННА

БАРАНОВ В.С., БАРАНОВ А.Н.

Институт акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН

Обзор современного состояния исследований и клинических испытаний в области генной терапии. Отмечено, что основные затраты на генную терапию приходится на США, где уже созданы десятки крупных фирм для разработки научных подходов к генной терапии, израсходованы сотни миллионов долларов на разработку новых генных конструкций и способов их доставки. Именно в США сосредоточено уже более 80% генно-инженерных проектов, принятых к клиническим испытаниям, основная часть которых касается разработок методов лечения онкологических заболеваний. Кратко рассмотрены преимущества и недостатки основных способы доставки нуклеиновых кислот в клетки. Перечислены заболевания, для которых уже реализуются проекты по генной терапии. Специальный раздел обзора посвящен состоянию исследований по клеточной и генной терапии миодистрофии Дюшенна, в т.ч. обзору последних работ на эту тему в лаборатории авторов.

Кратко суммированы результаты экспериментов на биологических моделях миодистрофии Дюшенна - мышцах mdx по введению различных экспрессирующих конструкций с кДНК гена дистрофина при помощи генного ружья, липосом, микросфер, вирусных олигопептидов и лактоферрина.

Ключевые слова: генотерапия, векторные системы, клинические испытания, генные болезни, миодистрофия Дюшенна, дистрофин.

ВВЕДЕНИЕ. Реальным практическим следствием революционных преобразований в биологии, обусловленных стремительным прогрессом Международной программы "Геном Человека" в идентификации всех его генов, явилась молекулярная медицина, рассматривающая проблемы здоровья и болезней человека на молекулярном уровне, прежде всего, на уровне функции нуклеиновых кислот. Основные разделы молекулярной медицины, уже получившие реальное развитие, это молекулярная диагностика, привентивная (профилактическая) медицина и генная терапия. Подробно с современным состоянием первого и второго направления молекулярной медицины в мире и в нашей стране можно ознакомиться в соответствующих монографиях и обзорах

[1-5]. Различные аспекты генной терапии неоднократно освещались и в отечественной научной и научно-популярной литературе [6-8]. Вместе с тем, стремительный рост исследований в области генной терапии в мире, наряду с катастрофической нехваткой подобных исследований в нашей стране делают оправданным регулярный критический обзор данного направления молекулярной медицины в отечественной научной литературе.

Цель настоящего обзора - дать представление о состоянии научных разработок и клинических испытаний по генной терапии наследственных и ненаследственных (мультифакториальных) болезней человека в 1998-1999гг, отметить основные достижения в этой стремительно развивающейся области, суммировать мировые и собственные данные по разработке научных основ генной терапии тяжелого моногенного наследственного заболевания - миодистрофии Дюшенна.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Согласно современным представлениям генную терапию (ГТ) понимают как введение нуклеиновых кислот в клетку с целью воздействия на медицинский статус организма и/или лечения болезни [9]. Существенно, что при этом сам ген уже воспринимается как новый фармацевтический препарат для лечения не одного, а многих заболеваний, не только моногенных (мутации в одном гене), но и полигенных, мультифакториальных (мутантные гены + неблагоприятные внешние факторы), инфекционных заболеваний и любых других патологических состояний. Если к этому добавить безусловную перспективность генов и их ДНК-фрагментов в создании нового поколения вакцин против многих инфекционных болезней и даже опухолей, то потенциальные возможности ГТ представляются воистину безграничными! Уместно отметить, что к 2003 году, когда будет полностью расшифрован геном человека и станут известными последовательности всех его генов, фармакология может пополниться 60-70 тысячами новых генно-инженерных препаратов! **

Естественно, что подобную перспективу вполне оценивают многие ведущие фармацевтические фирмы, затраты которых на ГТ только в 1997г. составили около 181 млн долларов США, а в 1998г. - почти 250млн долларов [10]. При этом финансирование исследований, равно как и многие другие показатели, касающиеся состояния ГТ в мире, безусловно, смещены в сторону США. Так, согласно информации на сентябрь 1999 г. английского издательства Уайли и Ко., 310 из 396 одобренных для клинических испытаний проектов ГТ выполняются в США и 68 - в Западной Европе (Франция, Великобритания, Италия, Германия и др.). К сожалению, ни одного сколько-нибудь продвинутого и официально утвержденного генно-терапевтического проекта клинических испытаний в России или в странах СНГ не существует. Следует так же отметить, что из 396 проектов 261 (65,9%) еще находятся на фазе I клинических испытаний (оценка токсичности генной конструкции), 133 - между фазами I/II (ограниченные

*В июне 2000г. объявлено, что коллективы ученых США ("The Human Genome Project" и фирма "Celera Genomics") и Великобритании (UK Sanger Center) завершают работу по расшифровке первичной структуры генома человека (3,2 млрд. пар оснований), начатую международным сообществом как в государственных, так и в частных институтах (Nature, 405, 983-984 (2000)). Эти результаты, составившие "черновую" карту генома человека будут опубликованы в журнале "Nature Genetics" в ноябре 2000г. (<http://www.nature.com/genomics/new>). Ученые Израиля заявили, что обладают компьютерной программой, которая позволит обработать полученные данные по первичной структуре и составить функциональную карту генома человека (прим. ред.).

испытания на небольшом контингенте больных) и только 2 проекта, касающиеся лечения смертельной опухоли мозга - глиобластомы - на фазе III (широкомасштабные клинические испытания в нескольких центрах).

Естественно, что среди выполняемых проектов ГТ более 60% приходится на лечение опухолей, примерно по 15% на лечение инфекционных болезней (СПИД, гепатит В, туберкулез и др.), столько же на лечение моногенных заболеваний (муковисцидоз, болезни накопления (мукополисахаридозы), семейная гиперхолестеринемия, гемофилия В и др.). Остальные эксперименты касаются, главным образом, изучения возможностей использования генных конструкций с целью клеточного маркирования в опытах *in vivo*. Такие эксперименты были начаты еще в 1989г. и позволили получить важную информацию об иммунологических свойствах опухолевых клеток и их чувствительности к Т-лимфоцитам.

В этой связи уместно заметить, что в целом история ГТ как нового направления медицины может быть разделена на три этапа. Этап I - (1970-1990) характеризуется попытками лечения дефицита фермента аргиназы заражением клеток вирусом папилломы Шоупа. В это же время предпринята неудачная попытка лечения бета - таллассемии пересадкой клеток костного мозга, трансформированных *ex vivo* бета глобиновым геном; генетическое маркирование Т-лимфоцитов. Начало этапа II знаменуется единственной до настоящего времени успешной попыткой лечения врожденного иммунодефицита, осуществленной в США в сентябре 1990г. В 1992 г. предприняты попытки лечения методом *ex vivo* семейной гиперхолестеринемии (мутация в гене рецептора липопротеинов низкой плотности) и гемофилии В, в 1993 г. - муковисцидоза и в 1995 г. - первые попытки лечения глиобластомы. Эти исследования по ГТ и попытки клинических испытаний до 1996 г. все еще оставались единичными. С 1997 г. и по настоящее время (этап III) (когда наметился качественный прорыв в технике доставки чужеродных генов и, как казалось многим, появились реальные шансы быстрого терапевтического эффекта при самых разных заболеваниях,) число проектов, одобренных в США Комитетом RAC (Recombinant Advisory Committee) увеличилось до 200 и продолжает стремительно возрастать, достигнув к концу 1999г уже 400 [11].

Вместе с тем, по справедливому замечанию одного из пионеров ГТ американского исследователя Фрэнча Андерсона " За исключением нескольких непроверенных случаев ни один из протоколов ГТ пока не оказался успешным в лечении болезней человека "[12].

Краткий анализ результатов ГТ на сегодняшний день позволяет прийти к следующим основным выводам:

1. ГТ пригодна для лечения широкого спектра заболеваний;
2. ГТ- в применяемом объеме имеет низкий риск осложнений;
3. Эффективность ГТ пока весьма разочаровывает [12].

В чем же основная причина таких неудач? Главное - до сих пор практически ни в одном проекте ГТ не удалось получить успешной трансформации (трансдукции) достаточно большого числа клеток-мишеней и добиться терапевтически значимой длительности экспрессии чужеродного гена.

ПРОБЛЕМА ВЕКТОРОВ - ОСНОВНАЯ ПРОБЛЕМА ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Проблема доставки нужного гена в нужную клетку с целью получения правильной дозы необходимого белкового продукта, обладающего

терапевтическим эффектом, до настоящего времени не решена и по сути, продолжает оставаться центральной проблемой ГТ проектов.

Трудность достижения этой цели по образному выражению Фрэнча Андерсона определяется тем, что "организм человека затратил много тысяч лет, чтоб защитить себя от нападения факторов внешней среды, в т.ч. от чужеродной ДНК, пытавшейся проникнуть в его геном" [12]. Естественно, что преодолеть эти барьеры оказывается очень сложно. Не случайно технология доставки генов является главным препятствием на пути успеха ГТ.

Для решения этой проблемы в настоящее время существуют самые разные методы (физические, химические, биологические), достаточно подробная характеристика которых дана в уже ранее цитированных монографиях и обзорах. [1, 6-8] Рассмотрим, однако, более подробно те из них, которые активно совершенствуются и представляются наиболее перспективными на сегодняшний день.

Хорошо известно, что наиболее популярными в проектах ГТ до настоящего времени являются векторы на основе вирусов и липидов (липосом). При этом из 396 ГТ проектов на сентябрь 1999г. в более 40% используют различные варианты ретровирусов (РВ), в 20% - модифицированные аденовирусы (АВ), в 20% липосомы (Л). В остальных 20% проектов применяют, адено-ассоциированный вирус (ААВ), вирус оспы, генное ружье (ГР) и даже "голую" ДНК. Основные преимущества и недостатки всех этих векторов уже были ранее рассмотрены [1, 6-8].

Учитывая, что основным недостатком АВ был выраженный иммунный ответ организма на введение АВ конструкций, прогресс в этой области коснулся создание АВ векторов, лишенных практически всех собственных генов АВ (guttled AdV vectors) и АВ, с резко ослабленным антигенным паттерном, провоцирующим иммунный ответ. Последние по аналогии с военным самолетом-невидимкой получили название Стелс (Stealths AdV). Естественно, что удаление собственных генов АВ позволило резко увеличить размеры переносимых генных конструкций, однако, и создало дополнительные сложности с наработкой и очисткой таких векторов.

В связи с тем, что ретровирусы успешно инфицируют только митотически делящиеся клетки, заметно повысился интерес к другим вирусам, таким как ленти-вирусы и особенно адено-ассоциированные вирусы, которые хорошо проникают и в неделящиеся клетки.

Большое внимание в последние годы уделяется разработке комбинированных векторов с адресной доставкой, совмещающих преимущества вирусных и невирусных носителей. В частности, особенно активно изучаются комбинации АВ + полилизин + белок (асиалогликопротеин для рецепторов клеток печени, трансферрин (мышечные фибриллы), Fab-полилизин (эпителий бронхов, кишечника). Весьма перспективным представляется использование не самих вирусов, а только отдельных пептидов их оболочки, контролирующих процесс проникновения в клетку и интернализацию в ядро. Некоторые вирусные олигопептиды использованы нами в экспериментах по ГТ миодистрофии Дюшенна (см. ниже).

В качестве перспективных векторов на сегодняшний день рассматриваются синтетические полимеры типа полиэтиленоксид - полиэтилэтилен, а так же биологические полимеры типа декстрана, желатина, образующие при определенных условиях упаковки микросферы, называемые так же полимеросомы

[13]. Размеры таких микросфер можно регулировать в зависимости от условий упаковки. Кроме того, их неограниченные возможности в отношении размеров плазмидной ДНК, растворимость в живых тканях (биodeградируемость) и выраженная способность к проникновению внутрь клеток и даже в ядра (см. ниже) привлекают к полимеросомам все больше специалистов по ГТ. Один из вариантов таких полимеросом оказался особенно перспективным для ГТ миодистрофии Дюшенна (см. ниже). Другой биологический полимер ателоколлаген с успехом применен в создании депо для экспрессирующихся генных конструкций в скелетных мышцах [14].

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К КОРРЕКЦИИ ГЕННЫХ ДЕФЕКТОВ

Сравнительно недавно предложен ряд принципиально новых вариантов ГТ. При этом основное внимание обращено не на доставку нормального гена в клетки-мишени, а на коррекцию повреждений ДНК в самих клетках. Согласно одному из них, исправление точечных мутаций достигается *in vitro* путем высокоэффективной генной конверсии. Известно, что при добавлении в культуру делящихся клеток фрагментов геномной ДНК с частотой 1 на 1 000 возможна гомологичная рекомбинация между нативной геномной ДНК и гомологичным ей фрагментом. Согласно новой технологии, получившей название химерапластика [15], в культуру клеток добавляют небольшие по размерам синтетические ДНК/РНК гибридные молекулы (химеропласты), состоящие из короткой (25 нуклеотидов) цепочки ДНК и комплементарной ей цепочки нуклеотидов РНК. При этом в последовательность ДНК/РНК шпилечной структуры включают нужное основание, по которому планируется замена. Обе нуклеотидные последовательности шпилечной структуры комплементарны фрагменту двухцепочечной геномной ДНК, несущей мутацию. Высокая концентрация олигонуклеотидов в ядре, и наличие бактериального RecA белка позволяет на несколько порядков повысить частоту гомологичной рекомбинации. По некоторым данным успешная конверсия (замещение нужного кодона в геномной ДНК) происходит в 25-40% клеток [15]. Примененный *ex vivo* метод позволяет высокоэффективно осуществлять коррекцию генных дефектов. Клетки-мишени с восстановленной структурой генома могут быть возвращены в организм больного. Складывается впечатление, что подобный подход может быть очень перспективным. Достаточно заметить, что на основе такого подхода в США в 1998г. была организована коммерческая компания KIMERAGEN, руководителем научного отдела которой стал Мишель Блазе, ранее возглавлявший группу по ГТ наследственного иммунодефицита, осуществившую первое успешное ГТ вмешательство на человеке в 1990г. *Предполагается, что метод химерапластики может найти применения для ГТ не менее 2 000 различных наследственных заболеваний.

Концептуально близок к химерапластике и второй ГТ подход, направленный на коррекцию последовательности самого гена. Для многих генов

*Работы по технологии химеропластики основаны на исследованиях американских ученых Dr. E.B.Kmiec и Dr. C.J.Steer (Kren B., Cole-Strauss A., Kmiec E.B., Steer C.J. (1997) Hepatology, 25, 1462-1468; Kren B.T., Bandyopadhyay P., Steer C.J. (1998) Nature Medicine, 4, 285-290). Dr. Michael Blase (Майкл Блайз) - один из ближайших сотрудников пионера генной терапии Френча Андерсена (Dr. W. French Andersen) во время работы по ГТ тяжелого неспецифического иммунодефицита - долгое время возглавлял Отдел клинической генной терапии Института генома человека Национальных Институтов Здоровья в Бетезе, США. В 1998г. он перешел в KIMERAGEN директором по науке, где возглавил работы по химеропластике (прим. ред.)

показано, что отсутствие целого экзона функционально менее катастрофично для функции белка, чем сайтовые мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания либо резко нарушающие конформацию белкового продукта, например, нонсенс мутации (возникновение стоп-кодона) при миодистрофии Дюшенна или delF508 в гене *CFTR* при муковисцидозе. Суть метода, получившего название exon-skipping (перепрыгивание, выбрасывание экзона) сводится к введению в культуру мутантных клеток *in vitro* коротких антисмысловых последовательностей РНК, комплементарных местам сплайсинга первичного РНК-транскрипта. Их гибридизация в ядре приводит к проскальзыванию петли сплайсинга с захватом и выбрасыванием из мРНК экзона, несущего мутацию. Такой подход был с успехом применен для выбрасывания экзона 23 с мутацией типа стоп-кодон у мышей mdx- биологических моделях миодистрофии Дюшенна.

Естественно, что оба метода (химерапластика и exon-skipping) могут быть применены только для коррекции генома мутантных клеток вне организма. Последние в случае успешной трансформации могут быть пересажены пациенту обратно. Данный подход получил названия *ex vivo* и уже нашел применение в клинических проектах по ГТ. Удельный вес проектов ГТ с применением метода *ex vivo* пока невелик и составляет около 10%. Основная часть проектов по ГТ использует непосредственное введение генноинженерных конструкций в ткань опухоли (25%), внутривенно (15%) и подкожно (15%). Другие способы доставки генов включают интратрахеальный, внутримышечный, интраназальный и др. Некоторые из этих подходов были применены в экспериментах по генной терапии миодистрофии Дюшенна.

ПЕРВЫЕ ПОПЫТКИ ГЕНОТЕРАПИИ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

Наряду с моногенными заболеваниями, где в основе терапевтического эффекта лежит доставка в клетки-мишени неповрежденной экспрессирующейся генной конструкции, все более широкое внимание привлекают ГТ подходы к лечению мультифакториальных заболеваний, патогенетическую основу которых составляют не один, а много разных генов, повреждения которых реализуются в определенных неблагоприятных внешних условиях. Именно при таком варианте ГТ гены выступают как лекарственные препараты, обеспечивающие симптоматическое лечение.

Естественно, что в значительной мере сказанное относится к опухолям, подавляющее большинство которых относится к мультифакториальным заболеваниям. ГТ опухолей посвящена обширная литература и многочисленные исследования, ранее рассмотренные и в отечественной литературе [1, 6-8].

Отметим только, что при лечении многих опухолей мультифакториальной природы все чаще используют целый набор различных экспрессирующихся генно-инженерных конструкций, продукты которых воздействуют на разные факторы и механизмы прогрессии опухоли. Так, для лечения рака простаты широко применяют стратегию замены генов-супрессоров опухолей *p53*, *H-ras*, *Rb*, *p21*, антисмысловые олигонуклеотиды к гену *Bcl2* (для блока антиапоптозных генов), традиционные гены-самоубийцы (вирусная тимидинкиназа или цитозиндезаминаза), а так-же ген мембранного белка е-кадгерина, который обычно утрачивается при прогрессии опухоли, а так-же гены, корректирующие чувствительность опухолевых клеток к андрогенам. *

Значительный прогресс в последнее время достигнут в лечении нейродегенеративных заболеваний таких как боковой амиотрофический склероз,

болезнь Паркинсона, хорей Гентингтона и др. Смысл ГТ вмешательства, проходящего клинические испытания заключается во вживлении в определенные подкорковые отделы мозга при помощи стереотаксического аппарата полупроницаемых пластмассовых капсул содержащих культуры клеток, продуцирующих целый набор белков, препятствующих дегенерации нервных клеток таких как ген цилиарного нервно-трофического фактора (hCNTF), нейротрофические гены *MNTF-BDNF*, *NT-3*, *mNT 4/5*; антиоксидантные гены - *SOD-2*, *CP-2*; антиапоптозные гены - *Bcl2*, *BclK*. При необходимости в эти же экспрессирующиеся конструкции включается и ген тимидин-киназы вируса герпеса, позволяющий ликвидировать инкапсулированные клетки - продуценты с помощью ганциклавира.

Весьма обнадеживающие результаты получены на лабораторных кроликах по лечению ревматоидного артрита. Известно, что более 30 млн американцев страдают ежегодно от этого тяжелого заболевания. Известно, что решающая роль в воспалении суставов и их последующей деформации принадлежит различным цитокинам и другим воспалительным клеточным факторам. Для ГТ ревматоидного артрита предполагается использовать TGF, IGF, BMP-2. Самым перспективным, как показали эксперименты на кроликах, является ген IL-1Ra, отвечающий за синтез белка-антагониста рецептора интерлейкина IL-1 [16].

Существенный прогресс достигнут в экспериментах по профилактике тромбообразования путем введения в клетки эндотелия сосудов гена тканевого активатора плазминогена (фактора V свертывания крови), и профилактики рестеноза артерий после трансплантации (шунтирования) коронарных сосудов, введение гена *MuLv*, препятствующего пролиферации гладкомышечных клеток интимы сосудов.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА (МДД)

Общая характеристика заболевания, гена и продуктов его экспрессии в норме и при МДД

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является наиболее распространенным наследственным нервно-мышечным заболеванием человека. Его частота составляет около 1:5000 новорожденных мальчиков. Причиной МДД являются мутации в гене дистрофина (структурного белка) сарколеммы, которые приводят к его отсутствию в мышечных клетках, следствием чего является нарушение целостности мембраны и запуск процессов дегенерации мышечного волокна.

Ген дистрофина является самым большим из известных генов человека и составляет почти 0.1% (2,4 мпн.) всей геномной ДНК. Он локализован на коротком плече X хромосомы в районе Xp21.2, содержит 85 экзонов, и кодирует мРНК размером около 14 тпн.

Основной продукт гена - мышечный белок дистрофин - имеет молекулярный вес 427 кДа. Функция дистрофина заключается в стабилизации сарколеммы мышечного волокна путем связывания своим N-концом с актином - главным компонентом внутриклеточной системы микрофиламентов,

* По генной терапии злокачественных новообразований см. обзоры в книгах: M. Strauss, J. Bartenger, eds. (1998) Concepts in Gene Therapy, DeGruyter, Berlin и K. Xanthopoulos, ed. (1998) Gene Therapy, NATO ASI Series H: Cell Biology, 105, Springer. Хорошие перспективы в этой области имеют, по-видимому, исследования в области апоптоза трансформированных клеток и тканей с использованием пептидов, содержащих RGD-мотив, индуцирующий апоптоз (прим. ред.)

а С- концом - с группой дистрофин ассоциированных дистро- и саркогликанов - белков сарколеммы и через них с основным белком внеклеточного матрикса ламинином. Мутации в гене дистрофина приводят либо к полному (миодистрофия Дюшенна) либо к частичному (миодистрофия Беккера) отсутствию одноименного белка, следствием чего является нарушение нормального функционирования мембраны мышечной клетки. Повышенная проницаемость мембран или наличие в них физических разрывов, характерных для пренекротических или некротических волокон, приводит к оттоку ферментов из мышц в сыворотку крови. На начальных стадиях заболевания дегенерация мышечных волокон компенсируется активной регенерацией фибрилл, благодаря делению и слиянию миогенных сателлитных клеток. Однако, с возрастом этот процесс становится все менее эффективным, вызывая прогрессирующую мышечную слабость и смерть в результате нарушения функций сердца и диафрагмы [17].

Биологические модели МДД

Большинство исследований по разработке подходов к генотерапии МДД проводятся на мышах со спонтанными или индуцированными мутациями в гене дистрофина. Первой биологической моделью заболевания была спонтанная мутация *mdx* мышей линии C57BL/10J. В настоящее время создан ряд линий мышей с мутациями в гене дистрофина. Наиболее близкими к человеку по тяжести и патогенезу заболевания являются мыши *mdx52* с делецией 52 экзона, а также недавно полученные мыши *mdx* с направленной мутацией (*knock-out*) в гене утrophина - аутосомного аналога дистрофинового гена.

По тяжести нарушений и клиническому проявлению наиболее близкой к человеку моделью МДД является заболевание, индуцированное мутациями в гене дистрофина у собак породы золотой ретривер. Именно на них рекомендуется проводить завершающий этап предклинического тестирования ГТ МДД.

Клеточная терапия МДД

Эффективная медикаментозная терапия МДД до настоящего времени отсутствует. В начале 90-х годов Питером Лоу (Peter Law, Ph.D., Cell Therapy Research Foundation, Memphis, USA) было предложено лечение МДД путем трансплантации аллогенных миобластов. Суть метода заключалась в заборе материала у здорового донора, выращивании миобластов в условиях клеточных культур с последующей их трансплантацией в мышцы больного. Стоимость операции оценивалась около 150 тыс. долларов. Исследования по проверке эффективности трансплантации аллогенных миобластов были проведены в 6 независимых исследовательских лабораториях. Результаты были доложены на Рабочем Совещании в Париже в апреле 1999г [18]. Согласно мнению ведущих авторитетов в области биологии мышц и миодистрофии Дюшенна Терри Партриджа (Великобритания) и Луиса Кункеля (США) в существующем на данный момент виде метод трансплантации миобластов (т.е. клеточной терапии по методу Питера Лоу) абсолютно неэффективен [19,20]. В их экспериментах на мышцах с использованием разнообразных клеточных маркеров и современных методов FISH анализа было показано что уже через 24 часа после трансплантации 90% гетерологичных миобластов отмирает или исчезает из места трансплантации, 5% находятся в покоящемся состоянии, 5% сливаются с пораженными мышечными волокнами, но только в половине из них (2.5%) наблюдается синтез дистрофина.

Значительно более перспективным направлением клеточной терапии МДД представляется трансплантация аутологичных стволовых клеток, полученных из

костного мозга или скелетных мышц. В исследованиях Луиса Кункеля, Ричарда Муллигана и Эмануэллы Гуссоли высокоочищенные стволовые клетки костного мозга здорового донора трансплантировали облученным mdx мышам. Было показано, что в результате трансплантации регенерируют не только клетки костного мозга реципиента, но значительная часть инъецированных клеток мигрирует и в скелетные мышцы, где сливаясь с миофибриллами восстанавливает синтез дистрофина. По прошествии 12 недель после трансплантации доля дистрофин положительных волокон увеличивалась с 1 до 10 %. Таким образом, доказано, что в костном мозге присутствуют стволовые клетки не только всех форменных элементов крови, но и предшественники миобластов. В виду широкого распространения мультипатентных стволовых клеток после трансплантации, открывается возможность не только локального но и системного исправления дефекта в различных группах мышц при МДЦ [21]

Генная терапия МДЦ

Несмотря на очевидные успехи в исследованиях структуры гена дистрофина, его продуктов, и в выяснении биомеханизмов заболевания, реальных успехов в генотерапии МДЦ пока не достигнуто. Причиной этого являются, по-видимому, не только гигантские размеры гена и его мРНК, но и, главным образом, отсутствие эффективных средств доставки гена в мышцы.

Считается, что достижение терапевтического эффекта возможно при успешной трансфекции не менее 20%, а по последним данным даже 40% всех мышечных волокон не только скелетной мускулатуры, но так же мышц сердца и диафрагмы. При этом основными критериями эффективности трансфекции являются: появление дистрофин-положительных мышечных волокон (ДПМВ), нормализация уровня биохимических маркеров МДЦ, изменения физиологических параметров (силы мышц и др.).

В активно разрабатываемых в настоящее время генотерапевтических подходах к лечению МДЦ можно выделить несколько направлений:

- коррекция дефекта путем введения нормальных копий кДНК гена дистрофина в составе рекомбинантных вирусных частиц или посредством невирусных способов доставки;
- коррекция мутаций на уровне геномной копии гена или на его первичном РНК-транскрипте;
- активация в мышечных волокнах и клетках репрессированного в ходе онтогенеза аутосомного гомолога гена дистрофина – гена утrophина

Трансфекция мышечных волокон с использованием вирусных векторов.

Эксперименты проводились как с ретровирусными векторами, несущими укороченную (6,4 тпо) к ДНК "мини" гена дистрофина, так и с аденовирусными векторами, способными нести полноразмерную (14тпо) кДНК этого гена. Результаты этих опытов подробно рассмотрены в ряде обстоятельных обзоров [22,23]

В экспериментах на мышах удалось продемонстрировать достаточно эффективную и долговременную трансфекцию скелетных и сердечной мышц после внутривенного введения рекомбинантного аденовируса с кДНК гена дистрофина. Была так же продемонстрирована принципиальная возможность трансфекции и синтеза дистрофина в мышцах диафрагмы mdx мышей с использованием полноразмерной кДНК гена дистрофина человека. Кроме нормализации синтеза дистрофина, удалось показать, что сверхэкспрессия этого

гена (уровень белка в 50 раз выше нормы) не оказывает вредных побочных эффектов.

Вместе с тем, использование вирусных носителей, особенно в экспериментах *in vivo*, наталкивается на существенные методические трудности. К ним относятся - недостаточная пакующая способность у ретровирусов, необходимость наличия клеток-хелперов. Наибольшим серьезным препятствием к использованию вирусных векторов для доставки генетических конструкций является выраженный иммунный ответ на вирусные антигены. Несмотря на огромный объем работ по модификации генома вируса носителя, сокращения размера вирусного генома до минимально возможного размера, иммунный ответ тем не менее сохраняется и делает бессмысленными повторные введения генных конструкций. Тем не менее работы по совершенствованию вирусных способов доставки не прекращаются. Как сообщалось на IV Рабочем совещании по генной терапии МДД в Париже [1999] в результате трансфекции мышц mdx мышей рекомбинантным аденовирусным вектором, лишенным большинства своих генов (guttated adenovirus vector) и несущим кДНК гена дистрофина, эффективность трансфекции достигала 10-20% ДПМВ, а в отдельных экспериментах превышала 25 %. При этом регистрировалось усиление сократительной силы мышц. Наиболее перспективно введение гена дистрофина новорожденным мышам. Было продемонстрировано, что в результате трансфекции мышат аденовирусным вектором и компактизацией ДНК полилизинном рK8, экспрессия дистрофина регистрировалась в течении почти 1 года.

Используя аденовирусный вектор с полноразмерной кДНК гена дистрофина уже год назад предполагалось провести первое клиническое испытание по ГТ МДД в Университете штата Огайо, Коламбус (США). О начале первой программы по клиническому испытанию генно-инженерной конструкции дистрофина с аденовирусным носителем сообщила на Рабочем Совещании в Париже 1999 г. группа французских ученых во главе с С.Брауном (Sergio Brown, Genotone, Strasburg, France). Однако, до сих пор ни американская, ни французская программа по фазе I клинических испытаний ГТ МДД еще не начались. Вместе с тем, нельзя не отметить, что именно в Коламбусе, в Университете Штата Огайо 2 сентября 1999 года Донован Декер - больной с конечностно-плечевой формой мышечной дистрофии, вызванной мутацией в гене мышечного белка саркогликана - стал первым пациентом в мире с мышечной дистрофией, который получил инъекцию генно-инженерной конструкции на базе аденоассоциированного вируса и кДНК гена саркогликана.

Невирусные способы доставки кДНК гена дистрофина.

Невирусные способы доставки включают баллистическую трансфекцию, методы электропорации (электрошока), введение генетических конструкций в составе липосом или упакованных с помощью олигопептидов, молекулярных конъюгатов, полимерных носителей.[1, 6-8, 23]. Эти носители в значительной мере лишены недостатков присущих вирусным векторам, однако, способность к трансформации у большинства из них ниже, чем у вирусных векторов. Первые эксперименты по доставке «голой» плазмидной ДНК с кДНК гена дистрофина человеку показали возможность трансфекции и появление ДПМВ у mdx мышей.

Наиболее продвинутыми на сегодняшний день являются исследования по доставке гена дистрофина методом электропорации или с носителем на основе полимерной формы декстрана [18]. В последнем случае для доставки гена дистрофина использовали декстран, обеспечивающий самособирающийся ДНК

полимерный комплекс. Отсутствие токсичности и иммунного ответа, дессиминация по различным группам мышц и достаточно длительная (более двух месяцев) экспрессия показали перспективность данной системы доставки для проведения клинических испытаний.

Еще более обнадеживающие результаты получены в экспериментах на мышцах, крысах, кроликах и обезьянах по доставке генетических конструкций в мышцы с помощью электропорации. Восьмикратный электрический импульс (200 V/cm^2 , 20 мсек, 17 Гц), через 30 секунд после введения плазмид с геном LacZ приводил к синтезу β -галактозидазы в 76% мышечных волокон, а с использованием электрошока только в 8% [24]

Генная терапия на уровне первичного транскрипта гена дистрофина

Некоторые подходы, используемые в настоящее время для коррекции мутаций в самом гене или в его первичном РНК-продукте уже рассмотрены нами выше.

Особое внимание привлекает техника направленной утраты экзона, несущего мутантный стоп-кодон, разработанная в лаборатории Дж. Диксона (George Dickson) в Великобритании. Работа выполнялась *in vitro* на миобластах мышечной ткани с нонсенс мутацией в 23 экзоне гена дистрофина. В условиях *in vitro* было показано что уже через 6 часов после трансфекции специфическими олигонуклеотидами удаление мутантного 23 экзона происходило в 50% мРНК и в 100% мРНК через 24 часа [25]. Перспективность данного подхода заключается в том, что миобласты начинают синтезировать полноразмерный белок дистрофина, хотя и дефектный по одному функционально незначительному экзону. Будучи пересаженными больному модифицированные миобласты смогут восстанавливать функцию и предотвращать гибель пораженных мышечных волокон.

Активизация экспрессии утрофина - аутосомного гомолога гена дистрофина

Оригинальный подход к генотерапевтическому лечению МДД разрабатывается в Оксфордском университете группой под руководством Кей Девис (Kay Davies). Суть метода заключается в попытке дерепрессии аутосомного гомолога дистрофина – гена утрофина, продукт экспрессии которого мог бы быть способен компенсировать недостаток дистрофина во всех группах мышц. В эмбриогенезе человека приблизительно до семи недель развития дистрофин не экспрессируется и его функцию в мышцах выполняет белок утрофин. В промежутке между седьмой и 19 неделями развития экспрессируются оба белка и после 19 недели происходит замещение мышечного утрофина на дистрофин. После 19 недели эмбрионального развития утрофин обнаруживается только в области нервно-мышечных контактов.

Белок утрофин, имея аутосомную локализацию разительно напоминает дистрофин своими N- и C – концевыми доменами, играющими решающую роль в функции дистрофина, тогда как функционально малозначимый центральный *rod domain* присутствует в утрофине в сильно укороченном варианте. Уже получены данные свидетельствующие о том, что трансфекция *mdx* мышечной ткани *in vivo* геном утрофина приводит к экспрессии утрофина в скелетной мускулатуре и диафрагме [26]. Результаты экспериментов указывают на принципиальную возможность коррекции дефектов в мышечных волокнах лишенных дистрофина с помощью утрофина. Основное внимание последних лет в этом направлении сосредоточено на анализе промоторной области гена утрофина, а также механизмов его

регуляции. По последним данным, группе Кей Девис удалось идентифицирован промотор В гена утrophина, воздействуя на который можно включать и изменять уровень экспрессии этого гена [18].

Собственные результаты

Исследования по генной терапии МД в России начаты 4 года назад в Институте акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН (Санкт-Петербург) и ведутся в комплексе с другими научно-исследовательскими институтами России, (Институт молекулярной биологии им. акад. В.А. Энгельгардта РАН; Институт цитологии РАН С-П, Научный Центр Медицинской Генетики РАМН, Институт экспериментальной медицины РАМН С-П), в тесном контакте с ведущими лабораториями по данной проблеме в Великобритании и Италии и частично финансируются из грантов ГКНТ ("Геном человека"), "Национальные приоритеты в медицине" и РФФИ. В работе по исследованию невирусных способов доставки генов в пораженные мышцы использованы экспрессионные плазмидные конструкции как с полноразмерной кДНК гена дистрофина либо с кДНК мини-гена дистрофина под различными промоторами (SV-40, MLV, HSA и др). Апробированы следующие варианты невирусной доставки - баллистическая трансфекция с использованием «генного» ружья [27], введение плазмидной ДНК, упакованной в липосомы (липофектамин и полилизин) [28], аналоги вирусных олигопептидов (K8 и JTS1) [29], синтетические полимерные микросферы [30], комплексы с молекулярными конъюгатами лактоферрина [31]. Экспрессию трансгена изучали с помощью молекулярных (ПЦР, RT-PCR, блотгибридизация, Northern-blot), биохимических (иммуоблот, анализ мышечной креатинкиназы), гистологических, иммуоцитохимических и молекулярно-цитогенетических (FISH) методов.

Анализ результатов комплексных исследований эффективности трансфекции мышечных волокон в условиях различных способов невирусной доставки гена дистрофина в опытах *in vivo* на мышах mdx позволяет сделать следующие основные выводы:

1. Эффект трансфекции (появление дистрофин-положительных мышечных волокон – ДПМВ) наблюдается как при введении чистой плазмиды, так и при доставке кДНК гена дистрофина с помощью различных невирусных носителей; число ДПМВ при использовании носителей и продолжительность экспрессии трансгена достоверно больше, чем в опытах с «голой» плазмидой.

2. В оптимальных вариантах (использование «генного ружья», в/м введения "мини-гена" дистрофина в составе микросфер) достигнута успешная трансформация (т. е. коррекция генетического дефекта) в 15-20% мышечных волокнах мышей mdx. Экспрессия трансгена достигала максимального уровня через 3 недели и регистрировалась вплоть до 6-и месяцев после однократного введения.

3. Перспективными для генотерапии МДД являются также вирусные олигопептиды и лактоферриновые конъюгаты, но не липосомы.

4. Выявленный в этих экспериментах феномен «дистантной трансфекции» (появление ДПМВ в контралатеральной мышце при в/м и в разных скелетных мышцах после в/в введения) открывает реальные перспективы для системного лечения МДД путем парентерального введения экспрессирующих генно-инженерных конструкций в составе невирусных носителей.

5. Применение метода FISH позволяет проследить за судьбой введенных генноинженерных конструкций *in vivo* и доказать их активную инкорпорацию в

ядра миофибрилл при использовании синтетических микросфер и их кластерное расположение вблизи ядерной мембраны мышечных волокон при использовании лактоферрина и вирусных олигопептидов.

6. Экспрессирующие генные конструкции, нагруженные в синтетические полимерные микросферы способны преодолевать гемато-энцефалический и плацентарный барьеры, что делает данный носитель весьма перспективным для генной терапии плода или доставки терапевтических генов в мозг.

7. Испытанные невирусные носители (за исключением "генного ружья") не вызывают дегенеративных изменений в мышцах и не индуцируют иммунного ответа.

Таким образом, в результате проведенных комплексных исследований с использованием плазмидных конструкций с геном дистрофина и рядом маркерных генов (β -галактозидазы - *LacZ*, люциферазы - *Luc*) апробированы новые векторы и способы доставки в опытах *in vivo*, выявлены достаточно перспективные невирусные носители кДНК гена дистрофина, намечены наиболее перспективные пути повышения эффективности трансфекции мышечных фибрилл и кардиомиоцитов, т.е. заложена реальная экспериментальная база для продолжения разработки новых подходов ГТ МДЦ в России, а в перспективе и для фазы I клинических испытаний этого смертельного наследственного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горбунова В.Н., Баранов В.С. (1997) Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. Специальная литература СПб.
2. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Иващенко Т.Э. и др. (1997) в Медицинская лабораторная диагностика. Программы и методы, Ред Карпищенко А.И., Интермедика, СПб, с. 203-227
3. Пузырев В. П., Эрдыниева Л.С., Кучер А.Н. и др. (1999) Генетико-эпидемиологическое исследование населения Тувы. STT, Томск.
4. Баранов В.С., Асеев М.В., Баранова Е.В. (1999) Природа, №3, 17-27
5. Баранов В.С. (1994) Международные медицинские обзоры, 2 (4), 236-243
6. Зеленин А.В., Кайгородов В.А., Прасолов В.С. (1998) Мол. биол 32, 219-228
7. Свердлов Е.Д. (1997) Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1, 3-28
8. Баранов В.С. (1999) Соросовский образовательный журнал, 3, 63-68
9. Kay M., Liu D., Hoogerbrugge P.M. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12744-12746
10. Editorial GT News (1998) // Gene Therapy, 5, pp.861-862
11. Culver K.W. (1994) Gene Therapy, Mary Ann Liebert, Inc. Publisher, NY, p 117
12. Anderson W. F. (1998) Nature, 392, Supp, 25-30
13. Discher B.M., Won Y.Y., Ege D.S. et al (1999) Science, 284, 1143-1146
14. Ochiia T., Takahama Y., Nagahara S et al (1999) Nature Medicine, 5, 707-710
15. Blaese R.M., (1999) J. Gene Med., 1, 144-147
16. Robbins P.D., Ghivizzani S.C., Kang R. et al (1997) in Interdisciplinary Approaches to Gene Therapy (Muller S., Simon J.W., Vesting J.W. eds) Springer Verlag Berlin-Heidelberg, pp 41-49

17. *Partridge T.* (1997) in *Dystrophin Gene, Protein and Cell Biology* (Brown S.C., Lucy J.A. eds), Cambridge University Press, pp. 310-331
18. *Баранов В.С.* (1999) // *Генетика*, в печати
19. *Partridge T., Lu Q.L., Morris G., Hoffman E* (1998) *Nature Medicine*, **4**, 1208-1209.
20. *Beauchamp J.R. Morgan J.E., Pagel C.N. et al* (1999) *J. Cell Biol*, **144**, 1113-1121
21. *Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D et al.* (1999) *Nature*, **401**, 390-394
22. *Dunckley M. G., Piper T.A., Dickson G* (1995) *MRDD Res. Rev.*, **1**, 71-78
23. *Fassati A., Murphy S., Dickson G.* (1997) *Adv. Genet.*, **35**, 117-153
24. *Mir L.M., Bureau M.F., Gehl J. et al* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4262-4267.
25. *Wilton S.D. et al* (1999) *Neurom. Disorders*, **9**(5), 330-338
26. *Tinsley, J. M.; Potter, A. C.; Phelps, S. R.; Fisher, R. et al.* (1996) *Nature*, **384**, 349-353
27. *Зеленин А., Тарасенко О., Колесников В. и др.* (1998) *Генетика*, **34**, 595-600
28. *Baranov V.S., Zelenin A., Baranov A.N. et al* (1997) *NATO ASI Series, Subseries M.*, **105**, 219-223.
29. *Баранов В.С., Тарасенко О.В., Баранов А.Н. и др.* (1998) *Генетика*, **34**, 876-882
30. *Баранов А.Н., Киселев А.В., Иващенко Т.Э. и др.* (1998) *Генетика*, **34** (12), 1-6
31. *Baranov A., Glazkov P., Kiselev A., et al* (1999) // *Gene Therapy* **6**, 1406-1414

Поступила 7.06.99.

GENE THERAPY OF MONOGENIC HEREDITARY DISEASES. DUCHENNE MIODISTROPHY.

VLADISLAV BARANOV

D.O. Ott Institute of Obstetrics and Gynaecology, Russian Academy of Medical Sciences, 3,
Mendeleev line 199034 St. Petersburg Russia

The paper highlights the new trends in gene therapy research area and clinical trials. It should be noted that the majority of firms involved in development of the scientific approaches to gene therapy are concentrated in the United States. The investments of the given companies on development and research of new genetic constructs also delivery systems make hundred millions dollars. The greatest part (more than 80 %) of gene therapy clinical trials projects are also connected with the US research departments; the majority of them is related to tumor therapy. The advantages and drawbacks of the main methods of nucleic acids delivery to the cells are considered; diseases that are attempted to be treated using gene therapy methods are listed. A special attention of the review is devoted to the modern stand in research on cell and Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene therapy, also brief description of basic results achieved in the authors laboratory is given. Basic original results of transfection of mdx mice (DMD biological models) with dystrophin cDNA delivered by gene gun, cationic liposomes, synthetic microspheres, viral oligopeptides and lactoferrine are summarized.

Key words: Gene therapy, gene vehicles, microspheres, virus oligopeptides, genetic diseases, Duchenne muscle dystrophy, dystrophin.