

Е. И. Самильчук

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ — РЕАЛЬНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Институт пульмонологии МЗ РФ, Москва

Генная терапия — введение в организм человека генов с целью коррекции наследственного дефекта или обеспечения иной активности (например, противоопухолевой) — долгое время оставалась в рамках теоретических и экспериментальных исследований. В 1980 году была предпринята несанкционированная попытка генной терапии у больного β -талассемией. Результат, однако, оказался неутешительным как из-за низкой эффективности использовавшегося в то время метода переноса ДНК, так и сложности коррекции дефекта молекулы гемоглобина (последняя состоит из двух полипептидных цепей, контролируемых генами, расположенными на разных хромосомах; синтез обеих цепей строго координирован, однако механизм, обеспечивающий эту координацию, практически неизвестен). Еще одно десятилетие потребовалось на разработку новых методических подходов, пока, наконец, генная терапия вышла на уровень официальных клинических испытаний. Первый клинический протокол генной терапии был утвержден в августе 1990 года Комитетом по надзору за работой с рекомбинантными ДНК Национальных Институтов здоровья США, а в середине сентября уже началась его апробация. Все ведущие научные журналы мира поместили на своих страницах комментарии, посвященные этому событию, оценив его как начало принципиально новой эры в медицине. В момент написания данного обзора клиническая реализация генной терапии проводилась уже по 11 протоколам, еще 9 протоколов были утверждены соответствующими национальными инстанциями и их реализация должна была начаться в ближайшее время, свыше 10 протоколов находились на стадии рассмотрения. К моменту выхода обзора это число, вероятно, будет еще большим. Клинические испытания ведутся по трем направлениям — злокачественные опухоли, СПИД и наследственная патология. Очень близко к генной терапии приближается и направление, связанное с использованием генов для маркировки клеток (с целью слежения за их судьбой после введения в организм человека). Предлагаемый обзор посвящен только

генной терапии наследственных заболеваний. В нем, помимо уже реализуемых (или находящихся на «старте») протоколов генной терапии, рассмотрены и перспективы данного подхода в отношении наиболее частой наследственной патологии органов дыхания — муковисцидоза и эмфиземы легких при дефиците альфа-1-антитрипсина (ААТ). Результаты протоколов генного маркирования и генной терапии опухолей и СПИД можно найти в недавнем обзоре W. F. Anderson [3].

Прежде чем перейти к рассмотрению протоколов генной терапии, кратко остановимся на том, как нормальный ген вносится в клетки пациента. Как правило, это делают с помощью векторов — молекулярно-биологических конструкций, искусственно созданных в лабораториях на основе вирусов (ретро-, адено-, герпесвирусов и др.). Из нуклеиновых кислот этих вирусов удалены или модифицированы гены, определяющие их патогенность и способность размножаться, и, наоборот, вставлены дополнительные гены, придающие этой конструкции нужные свойства и позволяющие проследить за ней в организме. Векторы сохраняют способность «породившего» их вируса проникать в клеточное ядро, а в случае ретровирусных векторов еще и интегрировать свой генетический материал в хромосомы. Таким образом, включив в вектор требуемый человеческий ген (в виде кДНК этого гена), можно обеспечить доставку последнего в клетки. В кДНК кодирующая белок информация представлена в виде непрерывной последовательности, в отличие от гена, где кодирующие участки (экзоны) перемежаются с некодирующими (интронами). Наиболее эффективный перенос гена достигается с помощью ретровирусных векторов (именно они фигурируют во всех реализуемых в настоящее время протоколах генной терапии). Однако у ретровирусных векторов есть одно существенное ограничение — они функционируют только в активно делящихся клетках. Поэтому для тканей, где митозы редки, например в легких, альтернативой являются аденовирусные векторы.

Схематично генная терапия включает следующие

щие стадии: 1 — ген, который должен быть введен в клетку с терапевтической целью, встраивается в вектор;

2 — обеспечивается контакт вектора, содержащего «терапевтический» ген, с клетками пациента (это можно делать как *in vitro*, так и *in vivo*);

3 — вектор проникает в клетки пациента и вместе со своим генетическим материалом вносит в ядро и «терапевтический» ген;

4 — в клетках, подвергшихся генетической коррекции, идет синтез белка, кодируемого «терапевтическим» геном. Синтезируемый белок выполняет свои функции.

Для первого протокола генной терапии был выбран наследственный дефицит аденозиндеаминазы (АДА). Это достаточно редкое заболевание (1 : 100 000 новорожденных) связано с мутацией гена, контролирующего этот фермент. АДА в больших количествах присутствует в клетках крови, и дефицит этого фермента прежде всего сказывается на них. Клинически он проявляется в виде тяжелого комбинированного иммунодефицита, причем особенно затронутым оказывается Т-клеточное звено. Выбор данного заболевания для первого протокола генной терапии не был случаен. Во-первых, фермент АДА, в отличие от гемоглобина, контролируется только одним геном. Но самое главное, что из-за участия данного фермента в метаболизме нуклеиновых кислот клетки с нормальным геном АДА обладают селективным преимуществом перед клетками, содержащими мутантный ген. Последнее повышало шансы на успех генной терапии, и именно поэтому ее первый протокол касался дефицита АДА. Этот протокол [17] предусматривал перенос *in vitro* нормального гена АДА, встроенного в ретровирусный вектор LASN, в предварительно выделенные и размноженные Т-лимфоциты пациента. Процедура включает проведение лейкофереза, очистку лейкоцитов на градиенте фикола и их последующее культивирование в условиях, стимулирующих активацию и рост Т-лимфоцитов (ОКТЗ моноклональные антитела, интерлейкин-2). После того, как Т-клетки начинают делиться, проводится их инкубация с LASN-АДА, и через несколько дней «исправленные» клетки возвращаются обратно в кровь пациента. Для обеспечения максимально полного Т-клеточного «репертуара» (выращивание клеток из одного образца имеет довольно высокую вероятность олигоклональности полученных Т-клеток) процедура повторяется.

Клинические испытания по данному протоколу проводятся в США на двух пациентках с дефицитом АДА (4- и 9-летнего возраста) [3, 7]. Генная терапия у первой пациентки была начата в сентябре 1990 года. До этого она в течение двух лет получала заместительную терапию — инфузии бычьего фермента АДА, конъюгированного с полиэтиленгликолем (АДА — ПЭГ). Какое-то время заместительная

терапия имела эффект, однако затем количество Т-лимфоцитов стало неуклонно снижаться, очень часто развивались инфекции, и к моменту начала генной терапии пациентка была анэргична. Генная терапия первые 10,5 месяца проводилась с интервалом в 1—2 месяца (в течение этого срока пациентка получила 10 инфузий). За это время клиническое состояние и показатели иммунитета улучшились настолько, что генная терапия на полгода была вообще приостановлена, а затем возобновлена в поддерживающем режиме (инфузии один раз в 3—5 месяцев). Контроль лейкоцитов периферической крови пациентки показал, что 25 % Т-лимфоцитов содержат нормальный ген АДА. Уровень самого фермента АДА в Т-лимфоцитах возрос с 1 до 25 % от нормы. Девочка стала посещать школу, инфекции у нее отмечаются не чаще, чем у ее здоровых сверстников, улучшились многие показатели иммунитета. В отношении второй пациентки, генная терапия которой была начата в январе 1991 года, известно, что она получила уже 11 инфузий и что динамика клинических и иммунологических показателей у нее также положительная. Какие-либо побочные эффекты генной терапии в обоих случаях отсутствовали. Хотелось бы подчеркнуть, что обе пациентки все время получали и продолжают получать заместительную терапию АДА — ПЭГ. Это важный в этическом отношении момент, так как никакие клинические испытания не дают морального права лишать пациентов тех препаратов, которые на данный момент являются наиболее эффективными.

Успешные результаты реализации первого протокола генной терапии явились основой для его дальнейшего развития. Так, несомненно, что если ген АДА вводить не в зрелые клетки, а в их предшественники, то можно снизить частоту инфузий и при этом обеспечить более широкий «репертуар» Т-лимфоцитов. На этом основании была предложена модифицированная версия генной терапии дефицита АДА. Последняя предполагает коррекцию не только периферических Т-лимфоцитов, но и клеток-предшественников, находящихся в периферической крови (последние несут на своей поверхности CD34). При этом используются два разных вектора — LASN (для Т-лимфоцитов) и G1NaSvAd (для клеток-предшественников и их потомков). Различие векторов позволяет отдельно проследить за судьбой этих клеток после их введения в организм. Клинические испытания данной модифицированной версии должны начаться в США в ближайшее время.

Дефицит АДА выбран в качестве объекта для генной терапии еще в двух странах — Италии и Голландии. Итальянский протокол включает генную коррекцию периферических Т-лимфоцитов и клеток-предшественников (обогащенную фракцию последних, однако, получают из костного

мозга). Также, как и в американском протоколе, для клеток, различающихся по степени зрелости, используют разные векторы. Генная терапия начата в марте 1992 года у 5-летнего мальчика. Вскоре начнется реализация и голландского протокола, который также предусматривает коррекцию клеток-предшественников из костного мозга.

Еще одним наследственным заболеванием с уже запущенным протоколом генной терапии является гемофилия В [3]. Последняя связана с мутацией гена, контролирующего фактор IX свертывающей системы крови. В данном протоколе коррекции подлежат фибробласты кожи пациента, предварительно размноженные *in vitro*. Введение нормального гена фактора IX осуществляется с помощью ретровирусного вектора. «Исправленные» фибробласты возвращаются пациенту путем подкожного введения. Клинические испытания проводятся в Китае с декабря 1991 года. Результаты данного протокола пока не опубликованы.

В ближайшее время еще одно заболевание — наследственная гиперхолестеринемия, по-видимому, также окажется объектом генной терапии. Эта тяжелая патология связана с мутацией гена рецептора липопротеинов низкой плотности. Соответствующий протокол подготовлен в США [9]. Планируется использовать гепатоциты пациента, которые после вставки в них нормального гена будут возвращаться пациенту через порталную систему кровообращения.

Наследственная патология легких пока отсутствует среди протоколов генной терапии, однако исследования в этом направлении ведутся довольно интенсивно. Этому способствует значительный прогресс, достигнутый за последние годы в изучении молекулярно-генетических механизмов муковисцидоза и эмфиземы легких, связанной с дефицитом ААТ. Муковисцидоз вызывается мутацией CF-гена, расположенного на длинном плече 7-й хромосомы. Этот ген кодирует белок, который формирует в апикальной мембране эпителиальных клеток каналы для ионов хлора. Мутации CF-гена приводят к синтезу дефектного белка, не способного выполнять свою функцию. В результате нарушается транспорт хлора, что в свою очередь приводит к изменению проницаемости мембраны для воды. Формируемый эпителиальными клетками слизистый секрет из-за выраженной дегидратации оказывается чрезмерно вязким и плохо отделяемым. Такой секрет, закупоривая мелкие респираторные пути, приводит к развитию воспаления и хронической инфекции в легких. Более полные данные в отношении этиопатогенеза муковисцидоза можно найти в обзорах [2, 6].

Развитие эмфиземы легких при дефиците ААТ связано с мутацией контролирующего этот белок PI-гена. Последний располагается на длинном плече 14-й хромосомы. Функцией ААТ является ингибирование эластазы — фермента по-

лиморфно-ядерных лейкоцитов. Эластаза, выделяемая в очагах воспаления, разрушает эластические волокна, однако ААТ ограничивает зону ее активности. Ряд мутаций гена PI приводит к синтезу нестабильного или склонного к агрегации ААТ, вследствие чего концентрация этого белка в крови и других биологических жидкостях резко снижена. В результате ограничивается ингибирующее действие ААТ на эластазу; повышенная активность последней приводит к чрезмерному разрушению эластической ткани легкого и, в конечном счете, к развитию эмфиземы. Более подробную информацию в отношении дефицита ААТ и связанной с ним патологии можно найти в обзорах [1, 5].

С точки зрения генной терапии специфика органов дыхания предоставляет определенные преимущества (например, возможность аэрозольного введения вектора), однако, с другой стороны, она же вызывает и ряд проблем. Так, ретровирусные векторы, успешно апробированные при дефиците АДА, оказываются малопригодными из-за низкой митотической активности клеток, которые в данном случае должны подвергаться генетической коррекции. Хотя в экспериментах с растущими *in vitro* клетками респираторного эпителия больных муковисцидозом их удалось «исправить» с помощью ретровирусных векторов, несущих нормальный CF-ген [8, 12, 13], тем не менее генный перенос *in vivo* требовал вектора, не нуждающегося столь остро в активно делящихся клетках. Исходя из этих требований, в лаборатории д-ра Crystal из Национальных Институтов Здоровья США был создан рекомбинантный аденовирусный вектор. Подобно своему «прародителю» — аденовирусу 5-го типа — этот вектор тропен к легочной ткани, однако не представляет для нее опасности, так как дефектен в отношении репликации. С помощью этого вектора, содержащего в одном случае CF-ген [15], а в другом — PI-ген [14] человека, в экспериментах *in vivo* удалось осуществить перенос этих генов в респираторный эпителий крыс. В обоих случаях использовался интратрахеальный способ введения. В результате имели место не только экспрессия информационной РНК обоих генов, но и синтез их белковых продуктов (ААТ определялся в течение по крайней мере одной недели после введения, а продукт CF-гена — 11—12 дней). Недавно в лаборатории д-ра Crystal аденовирусный вектор был также успешно использован для переноса PI-гена и в другие клеточные системы — в эндотелиальные клетки человека *in vitro* [11] и в клетки печени крысы *in vivo* [10]. В последнем случае ген в аденовирусном векторе вводился путем инъекции в порталную вену.

Следует отметить, что использование аденовирусного вектора при генной терапии человека может столкнуться с рядом проблем. Так, поскольку он в отличие от ретровирусных векто-

ров не обеспечивает «бессмертного» пребывания в клетке внесенного гена, то процедура генной терапии должна регулярно повторяться. Однако, если в этот период пациент перенесет банальную аденовирусную инфекцию, то последняя может спровоцировать иммунологическую атаку на данный вектор. Кроме того, в случае «встречи» вектора с дикими штаммами аденовируса, которые могут также попасть в организм пациента, существует опасность их комплементарного взаимодействия, в результате чего может быть генерирован патогенный аденовирус. Все эти вопросы требуют дополнительных экспериментальных исследований, желателен в системах, моделирующих соответствующее заболевание. В связи с этим нужно упомянуть о недавней сенсации — создании мышью модели муковисцидоза [4, 16].

В заключение хотелось бы отметить, что несмотря на все проблемы, стоящие перед генной терапией наследственных заболеваний органов дыхания, один из ведущих лидеров в этой области д-р Crystal настроен довольно оптимистично, и, по его оценкам, клинические испытания должны начаться в ближайшие несколько лет.

Послесловие

Когда данный обзор уже находился в редакции, стало известно, что Комитет по надзору за работой с рекомбинантными ДНК Национальных Институтов Здоровья США утвердил в декабре 1992 года три протокола генной терапии муковисцидоза. В них будет использован аденовирусный вектор, с помощью которого нормальный CF-ген будет доставляться в эпителиальные клетки полости носа (этот протокол стартует весной 1993 года) или же легких (два соответствующих протокола планируется начать в этом же году, но в более поздние сроки).

ЛИТЕРАТУРА

1. Самильчук Е. И., Лапин Б. А. Наследственный дефицит альфа-1-антитрипсина: клинические проявления, методы диагностики, перспективы лечения // Тер. арх.— 1988.— № 8.— С. 141—144.
2. Чучалин А. Г., Самильчук Е. И. Муковисцидоз — состояние проблемы // Там же.— 1993.— № 3.— С. 3—9.

3. Anderson W. F. Human gene therapy // Science.— 1992.— Vol. 256.— P. 808—813.
4. Clarke L. L., Grubb B. R., Gabriel S. E. et al. Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis // Ibid.— Vol. 257.— P. 1125—1128.
5. Crystal R. G., Brantly M. L., Hubbard R. C. et al. The alpha-1-antitrypsin gene and its mutations, clinical consequences and strategies for therapy // Chest.— 1989.— Vol. 95.— P. 196—208.
6. Collins F. S. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implication // Science.— 1992.— Vol. 256.— P. 774—779.
7. Culvert K. W., Anderson W. F., Blaese R. M. Lymphocyte gene therapy // Hum. Gene Ther.— 1991.— Vol. 2.— P. 107—109.
8. Drumm M. L., Pope H. A., Cliff W. H. et al. Correction of cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer // Cell.— 1990.— Vol. 62.— P. 1227—1233.
9. "Ex vivo gene therapy of familial hypercholesterolemia" // Hum. Gene Ther.— 1992.— Vol. 3.— P. 179—232.
10. Jaffe H. A., Danel C., Longenecker G. et al. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and Expression in normal rat liver // Nature Genet.— 1992.— Vol. 1.— P. 372—384.
11. Lemarchand P., Jaffe H. A., Dannel C. et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha-1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1992.— Vol. 89.— P. 6482—6486.
12. Olsen J. C., Johnson L. G., Stutts M. J. et al. Correction of the apical membrane chloride permeability defect in polarized cystic fibrosis airway epithelia following retroviral-mediated gene transfer // Hum. Gene Ther.— 1992.— Vol. 3.— P. 253—266.
13. Rich D. P., Anderson M. P., Gregory R. J. et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells // Nature.— 1990.— Vol. 347.— P. 358—363.
14. Rosenfeld M., Siegfried W., Yoshimura K. et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha-1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo // Science.— 1991.— Vol. 252.— P. 431—434.
15. Rosenfeld M., Yoshimura K., Trapnell B. C. et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium // Cell.— 1992.— Vol. 68.— P. 143—145.
16. Snouwaert J. N., Brigman K. K., Latour A. M. et al. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting // Science.— 1992.— Vol. 257.— P. 1083—1088.
17. "Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase (ADA) deficiency with autologous lymphocytes transduced with a human ada gene" // Hum. Gene Ther.— 1990.— Vol. 1.— P. 327—362.