

# Принципы и методы генной терапии наследственных заболеваний

- **Принципы генной терапии**

**Молекулярная  
медицина**

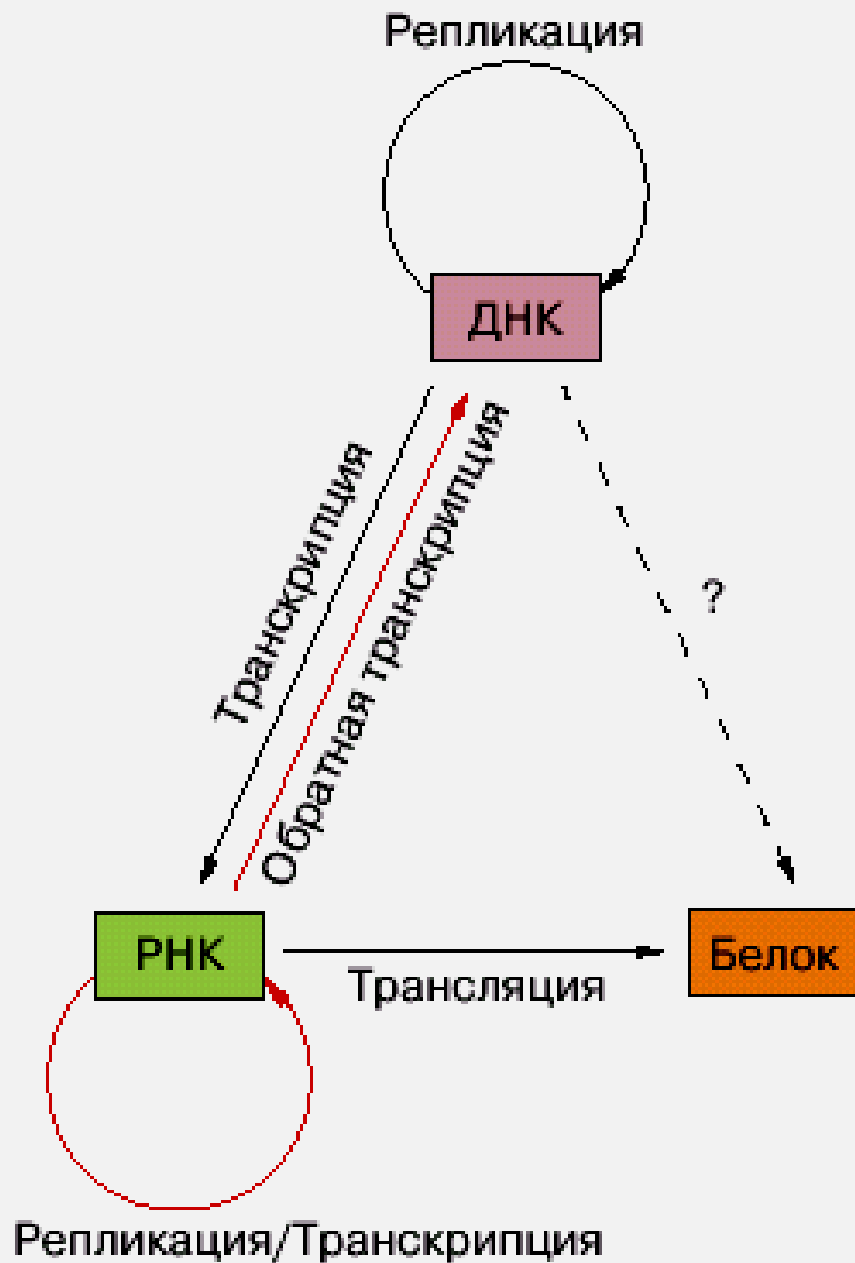
**Генная  
диагностика**

**Генная  
терапия**

**Генная терапия - новая область  
современной биомедицины, основанная  
на введении в организм больного  
рекомбинантных генетических  
конструкций с лечебной целью.**

**14 сентября 1990 г.**

- **- введение ретровирусного вектора, экспрессирующего ген аденозиндеаминазы (ADA) (частота встречаемости 1:100 000) двум больным, страдающим комбинированным иммунодефицитом ADA-SCID (недостаточность аденозиндеаминазы)**
- *(National Institute of Health (NIH), Bethesda, USA)*



**Пути передачи генетической информации**

# **Классификация генной терапии**

- 1) по типу клеток-мишеней:

*соматическая*

*фетальная*

- 2) по цели воздействия:

*позитивная* ( *компенсация*

*экспрессии гена)*

*негативная* (*подавление*

*функций гена)*

- 3) по тактике введения генотерапевтического агента:

- 1. *ex vivo*

- 2. *in vivo*

- *in utero* (введение конструкций в эмбрион)

- *in situ* (локально)



**4) по типу векторной системы:**

*вирусные векторы*

*невирусные векторы*

*микроинъекция*

*“gene gun” (генный пистолет)*

**5) по применяемым агентам:**

*нуклеиновые кислоты*

*белки*

*иммунотерапия*

**по типу  
клеток-  
мишеней**

*соматическая*

*фетальная*

**по цели  
воздействия**

*позитивная*

*негативная*

**по тактике  
введения  
агента**

*ex vivo*

*in vivo*

*in situ*

*in utero*

**по типу  
векторной  
системы**

*вирусные  
векторы*

*невирусные  
векторы*

*микроинъекция*

*генное ружье*

**по типу  
агента**

*нуклеиновые  
кислоты*

*белки*

*иммунотера  
пия*

тип клеток-мишеней	цель воздействия	тактика введения агента	метод введения	тип агента
<i>соматическая</i>	<i>позитивная</i>	<i>ex vivo</i>	<i>вирусные векторы</i>	<i>нуклеиновые кислоты</i>
<i>фетальная</i>	<i>негативная</i>	<i>in vivo : системно, in situ (локально), in utero (эмбрион)</i>	<i>невирусные векторы</i>	<i>белки</i>
			<i>микро-инъекция</i>	<i>иммуно-терапия</i>
			<i>генное ружье</i>	

## *Смена парадигм генной терапии*

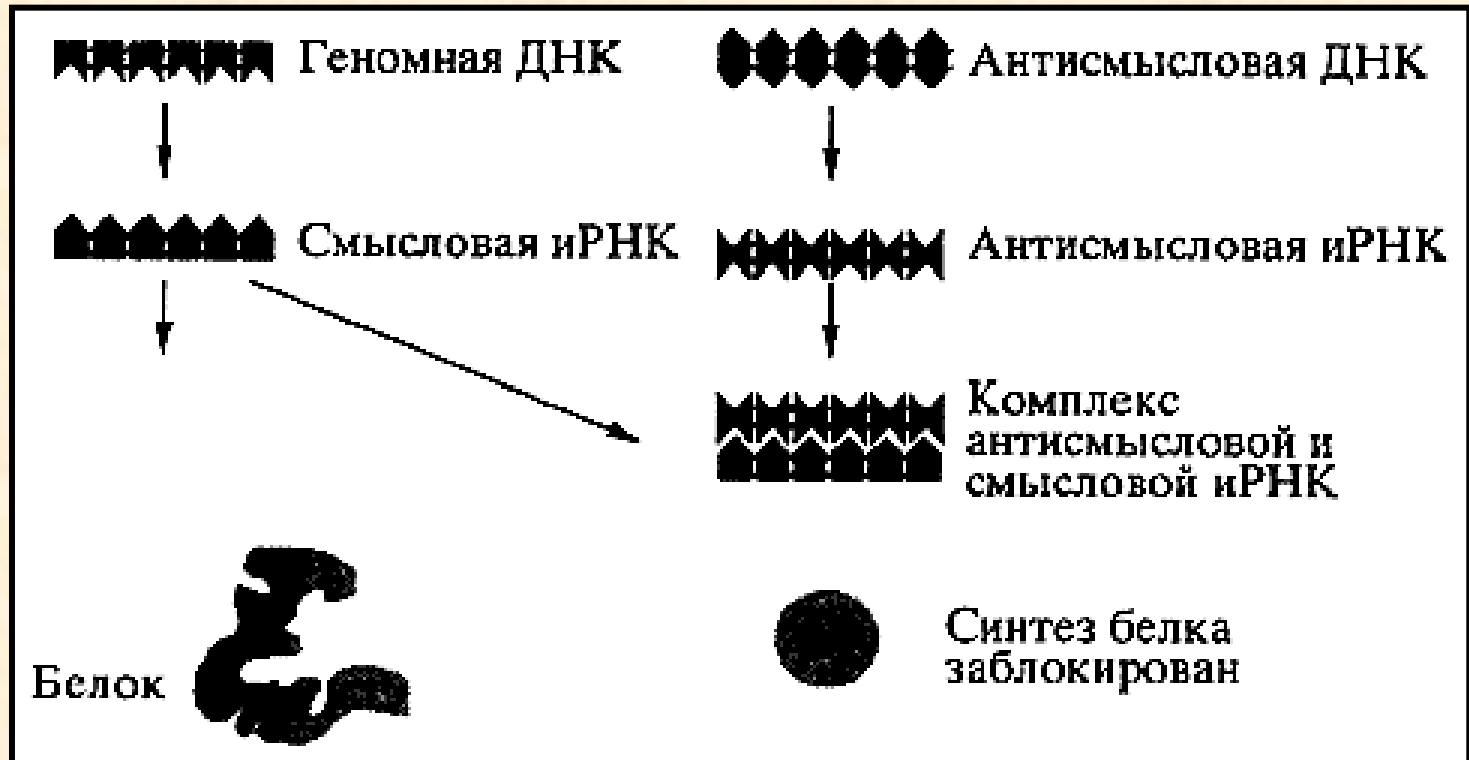
- **от «генетической» к генной терапии**
- **от «пересадки» генов к пересадке клеток**
- **от вирусных к невирусным векторам**

# **Генотерапевтические агенты**

# **Нуклеиновые кислоты – генотерапевтические агенты**

- **Антисенс ДНК и РНК**
- **Рибозимы**
- **Peptide – nucleic acids (PNA)**
- **РНК - ловушки**

# Антисенс ДНК и РНК



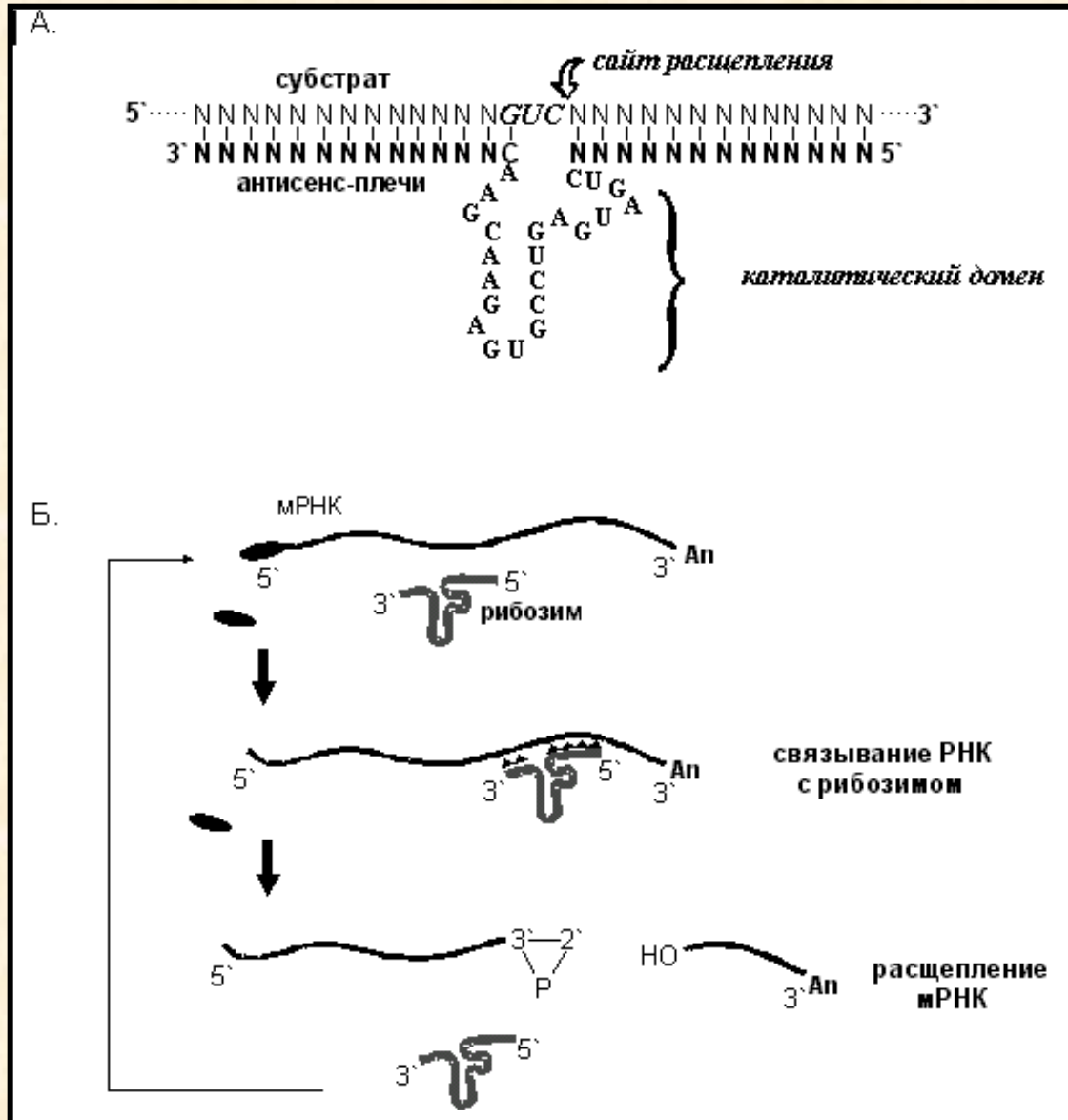
## Преимущества:

относительная специфичность дуплекса возможность экспрессии в составе любого вектора отсутствие иммуногенности

## Недостатки:

быстрая деградация (РНКазы, ДНКазы) в клетке

# Рибозимы



## Преимущества:

каталитические свойства  
(расщепление мишени)  
в процессе взаимодействия с мишенью молекулы не расходуются (ингибирование экспрессии гена – мишени при низких концентрациях)  
отсутствие иммуногенности  
индукция интерферона

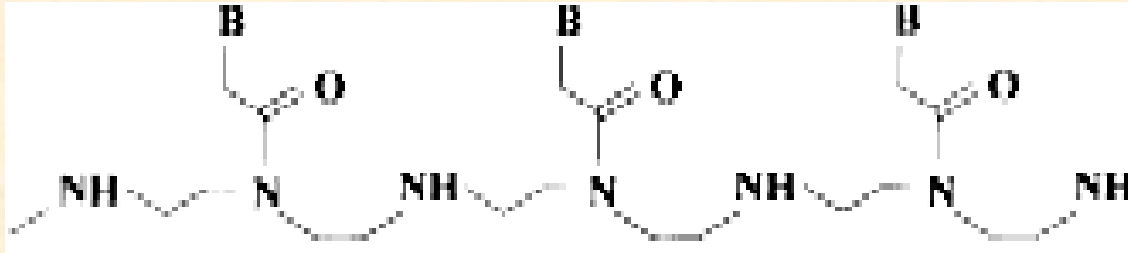
## Недостатки:

быстрая деградация (РНКазы, ДНКазы) в клетке

- Возможно создание модифицированных рибозимов

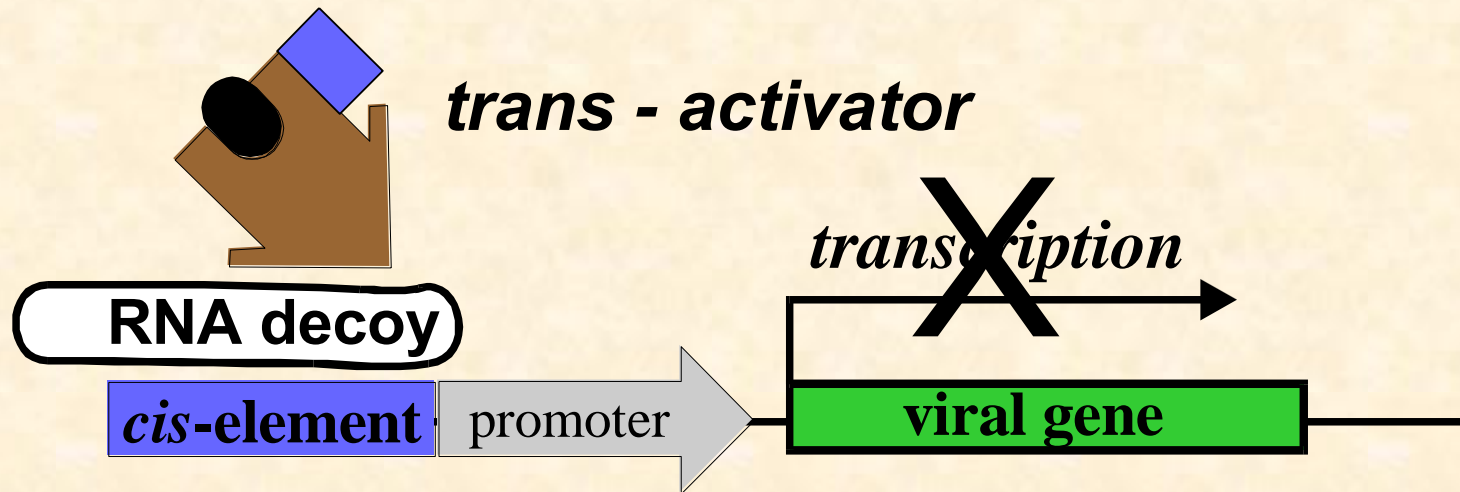


## Peptide – nucleic acids (PNA)



1. Дуплексы DNA/PNA более стабильны, чем дуплексы DNA/RNA
2. Дуплексы DNA/PNA не подвержены действию RNase H, протеаз, пептидаз

## РНК - ловушки



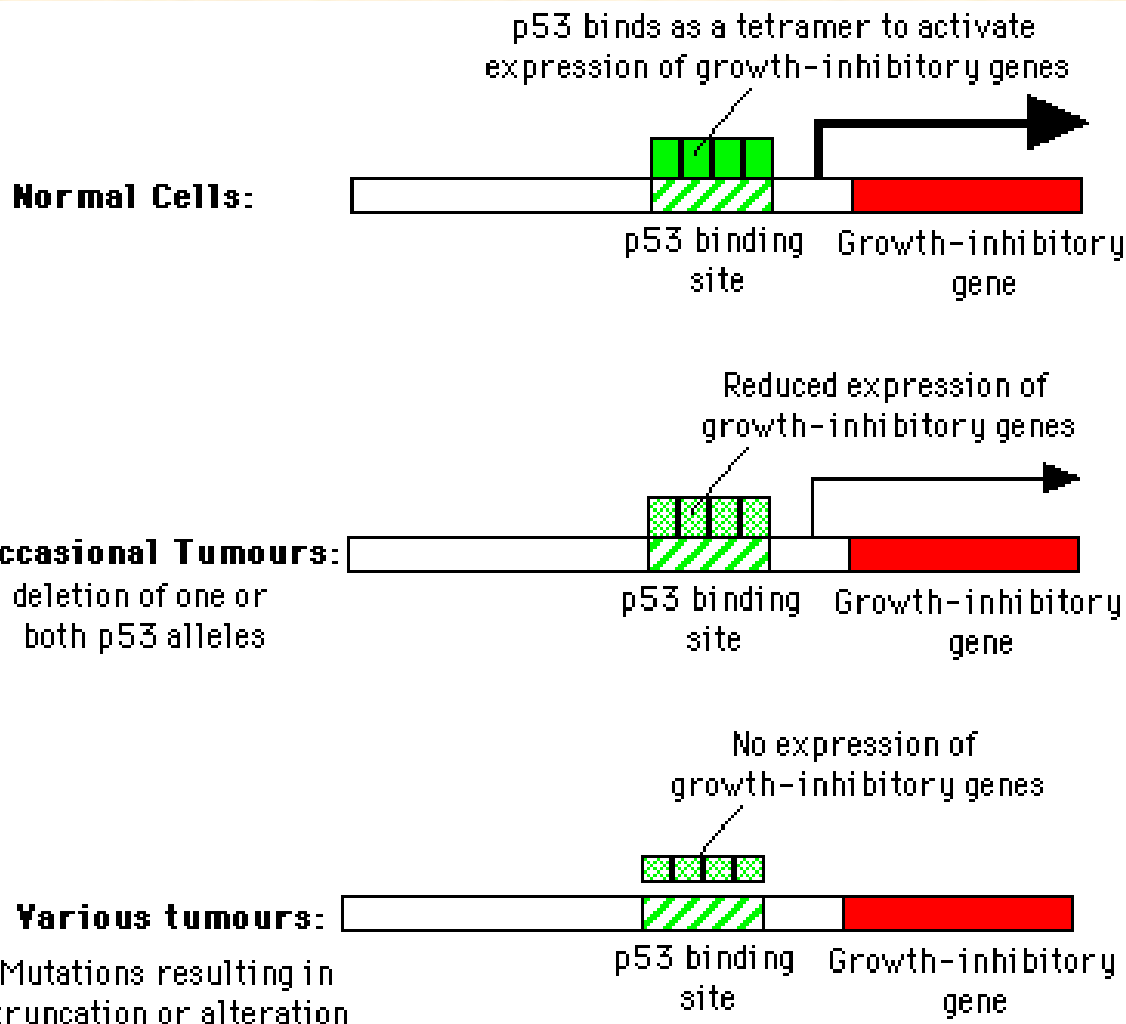
Гиперэкспрессия коротких РНК (РНК – ловушки), направленных на *cis* – активаторные регуляторные элементы, могут использоваться как ловушки для *trans* – активаторных белков.

Механизм действия - блокирование связывания трансаактиваторных белков вируса с регуляторными элементами

## **Белки – генотерапевтические агенты**

- **Трансдоминантные негативные белки**
- **Одноцепочечные антитела (intrabodies)**
- **Суицидные гены**

# Трансдоминантные негативные белки – мутантная версия регуляторных или структурных белков



## Механизм действия:

- 1) Конкуренция за субстраты и кофакторы
- 2) Образование нефункциональных мультимерных комплексов

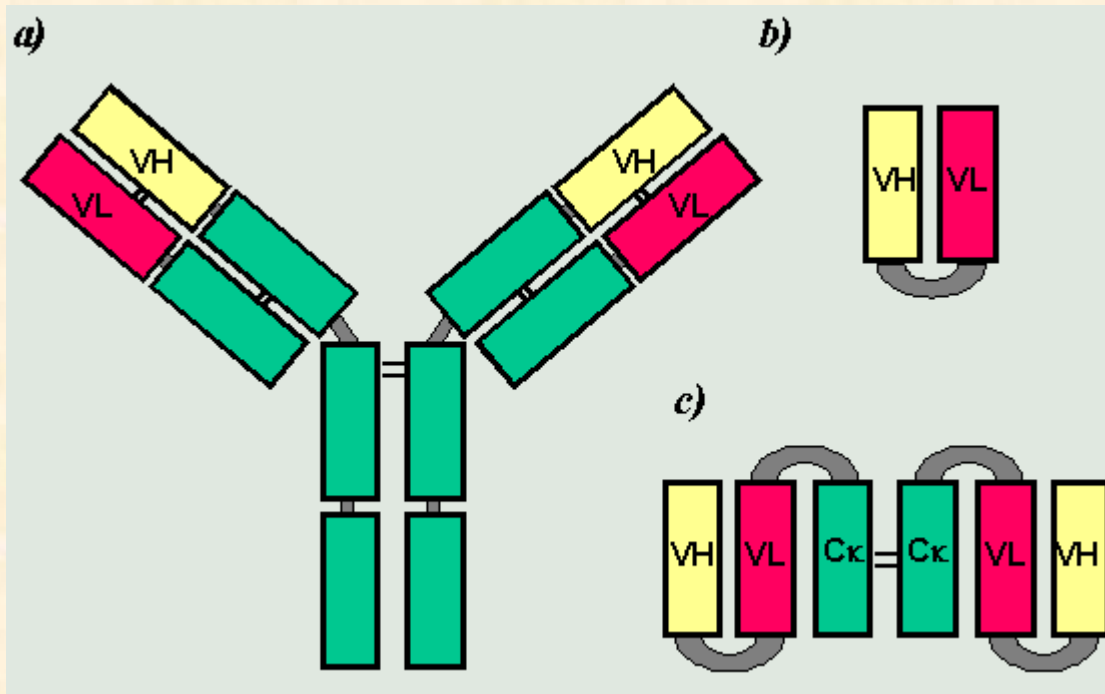
## Преимущества:

- ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СОСТАВЕ НЕВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

## Недостатки:

- ИММУНОГЕННОСТЬ

# Одноцепочечные антитела



## *Новый класс генотерапевтических агентов.*

Одноцепочечные переменные фрагменты антител с сохраненными свойствами антиген-специфичности, получаемые клонированием и экспрессией генов легких и тяжелых цепей антител

А) Варибельные домены тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей

(около 110 а.а.)

В) Домены соединены гибким линкером (глицин(4)-серин(3))

С) Использование домена С<sub>к</sub> легкой цепи разрешает димеризацию – увеличение активности и стабильности

## **Преимущества:**

- возможность экспрессии в гетерологичных системах
- сохранение всех свойств классических антител

## **Недостатки:**

- отсутствие возможности к секреции (связаны с эндоплазматической сетью)

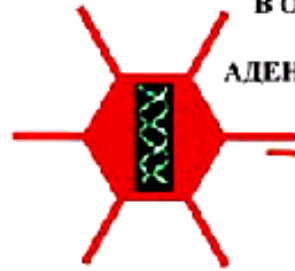
# Суицидные гены

**Вместо ингибирования (или компенсации) функции дефектного гена возможно использование суицидных генов, экспрессия которых вызывает гибель клетки-мишени**

## Примеры:

- **A-цепь дифтерийного токсина**
- **ген цитозиндеаминазы**
- **ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV tk)**

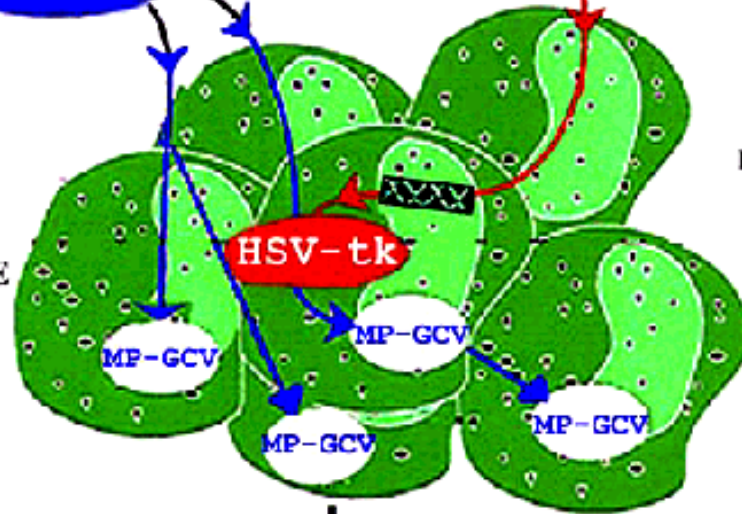
ДОСТАВКА ГЕНА HSV-tk  
В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ  
С ПОМОЩЬЮ  
АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА



ВВЕДЕНИЕ НЕАКТИВНОГО  
ПРЕПАРАТА (ГАНЦИКЛОВИР)



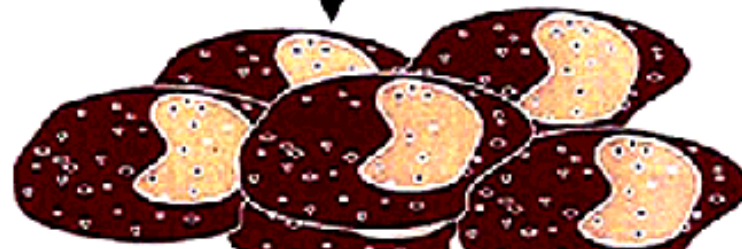
ОПУХОЛЕВЫЕ  
КЛЕТКИ

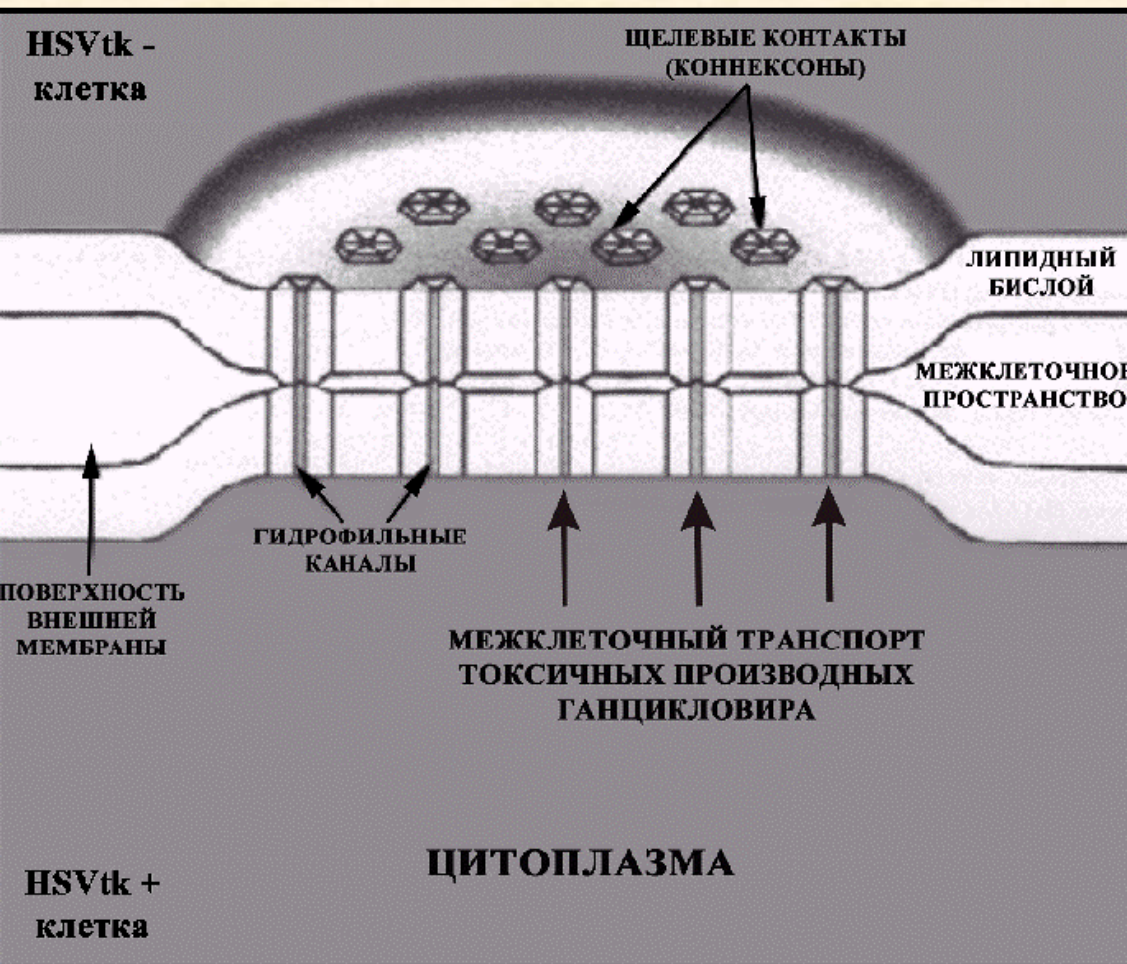


КОНВЕРСИЯ ГАНЦИКЛОВИРА  
В ТОКСИЧНЫЙ МОНОФОСФАТ  
И РАСПРОСТРАНЕНИЕ  
В ОПУХОЛЕВОЙ МАССЕ

АПОПТОЗ (ПРОГРАММИРУЕМАЯ КЛЕТочНАЯ СМЕРТЬ)

МЕРТВЫЕ  
ОПУХОЛЕВЫЕ  
КЛЕТКИ





## Bystander effect

(«эффект свидетеля»)

1) Распространение токсичных продуктов фосфорилирования GCV через межклеточные щелевые контакты

2) Индукция специфического иммунитета

3) Фагоцитоз апоптических везикул, содержащих метаболиты GCV

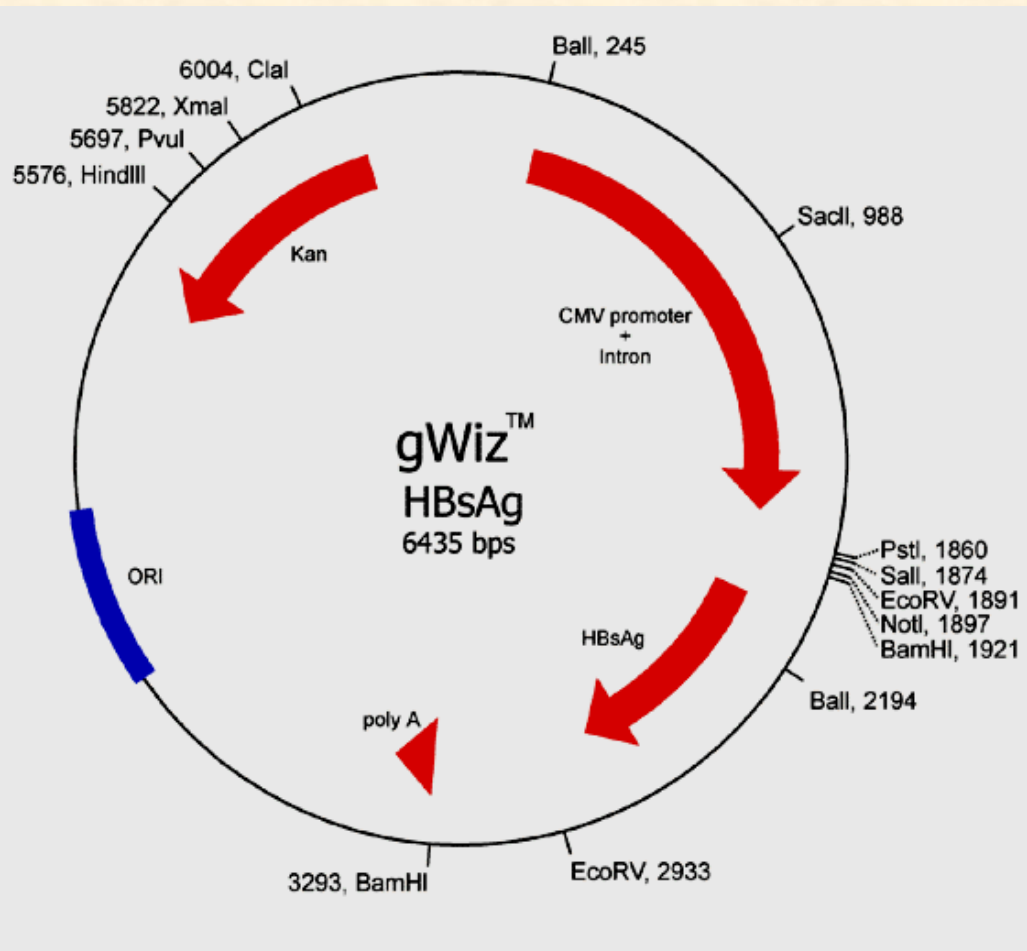
Результат - гибель соседних клеток (генная терапия опухолей)



# Иммунотерапия

- ДНК – вакцины

- Антиген – специфичные Т лимфоциты



## Плазмидный вектор для экспрессии HBs антигена

### Способы введения:

- 1) Внутрикожно
- 2) Подкожно
- 3) Внутримышечно
- 4)? Внутривенно

## **Преимущества:**

- **дешевизна производства**
- **отсутствие иммуногенности (? Анти-ДНК антитела)**
- **экспрессия продукта гена в нативной форме**
- **индукция Т-клеточного иммунитета**

## **Недостатки:**

- **низкая эффективность доставки**
- **низкая емкость векторов**
- **высокая вероятность интеграции в геном клетки**

**Знаем: что лечить**

**Знаем: чем лечить**

**Не знаем: КАК ЛЕЧИТЬ?**

# **Системы доставки генетического материала**

**Векторы**

**вирусные**

**невирусные**

## Вирусные векторы:

- ретровирусы
- аденовирусы
- аденоассоциированный вирус
- герпесвирусы
- лентивирусы
- и др.

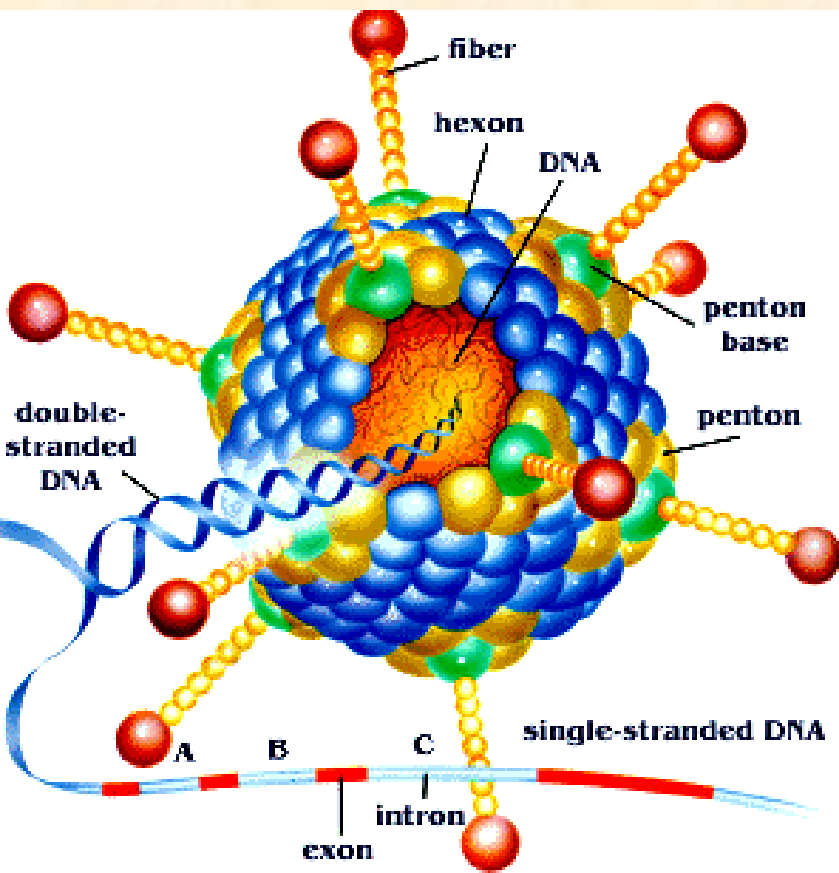
## - Достоинства:

- *трансфекция большого количества клеток*
- *тропизм*
- *неспособность реплицироваться в клетке-хозяине*
- *устойчивость к деградации лизосомами*

## - Недостатки:

*иммуногенность  
(аденовирусы, герпесвирусы)  
потенциальная  
туморогенность  
(ретровирусы)*

# Аденовирусы



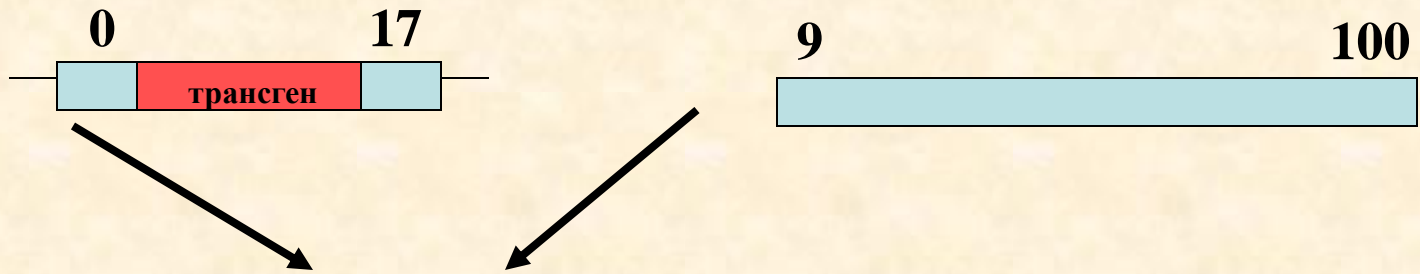
## Преимущества:

- способны инфицировать неделящиеся клетки
- большая клонирующая емкость (в настоящее время - до 28 т.п.о.)
- низкая вероятность встраивания в геном клетки-мишени
- относительная простота производства
  - высокий титр при продукции в перmissive клеточных линиях

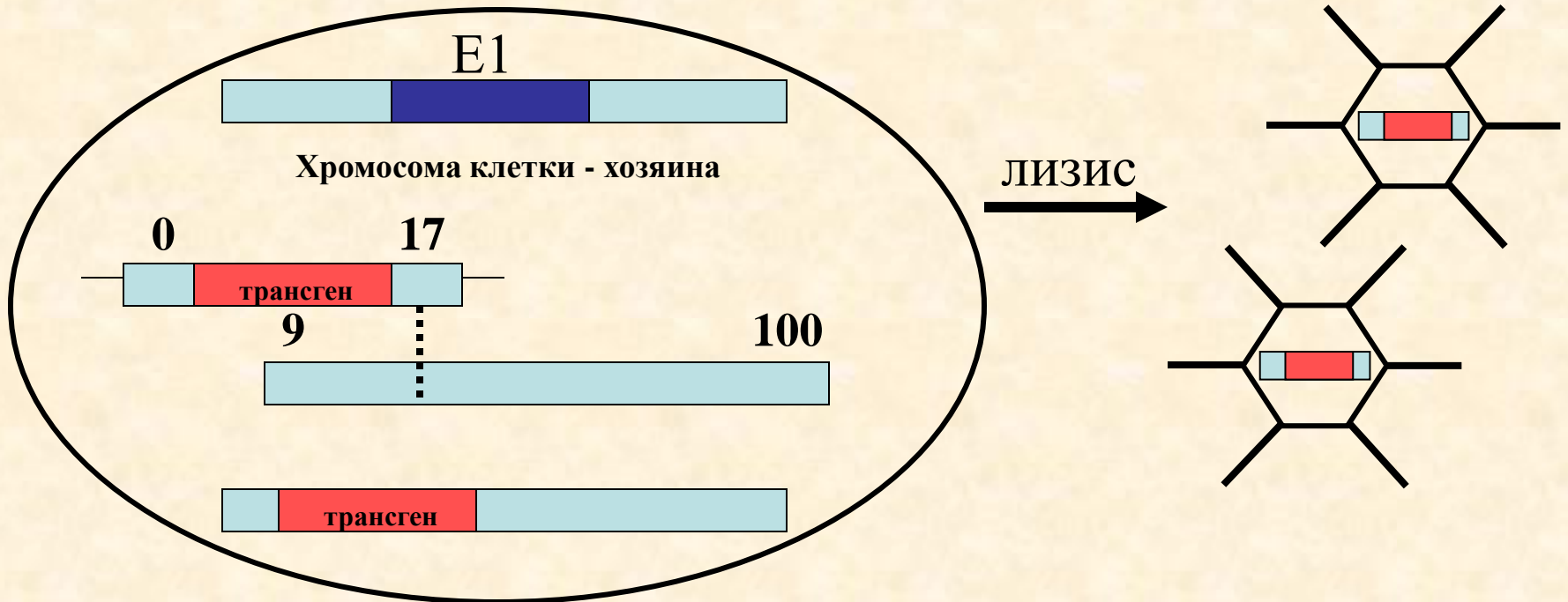
## Недостатки:

- ИММУНОГЕННОСТЬ (иммунный ответ развивается через 2-3 инъекции)
- транзientная экспрессия целевых генов

# Аденовирусные векторы

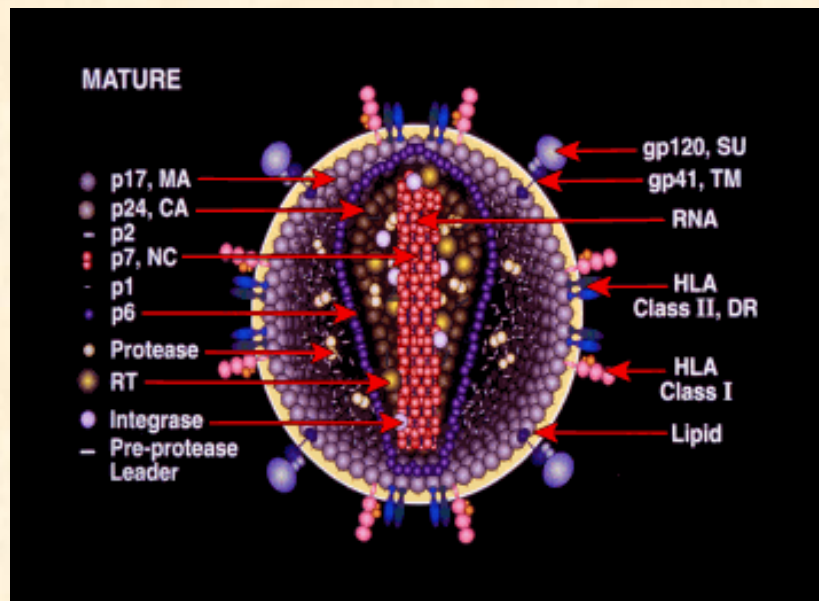


трансфекция





# Ретровирусы



## Преимущества:

- не иммуногенны

постоянная экспрессия  
целевых генов

## Недостатки:

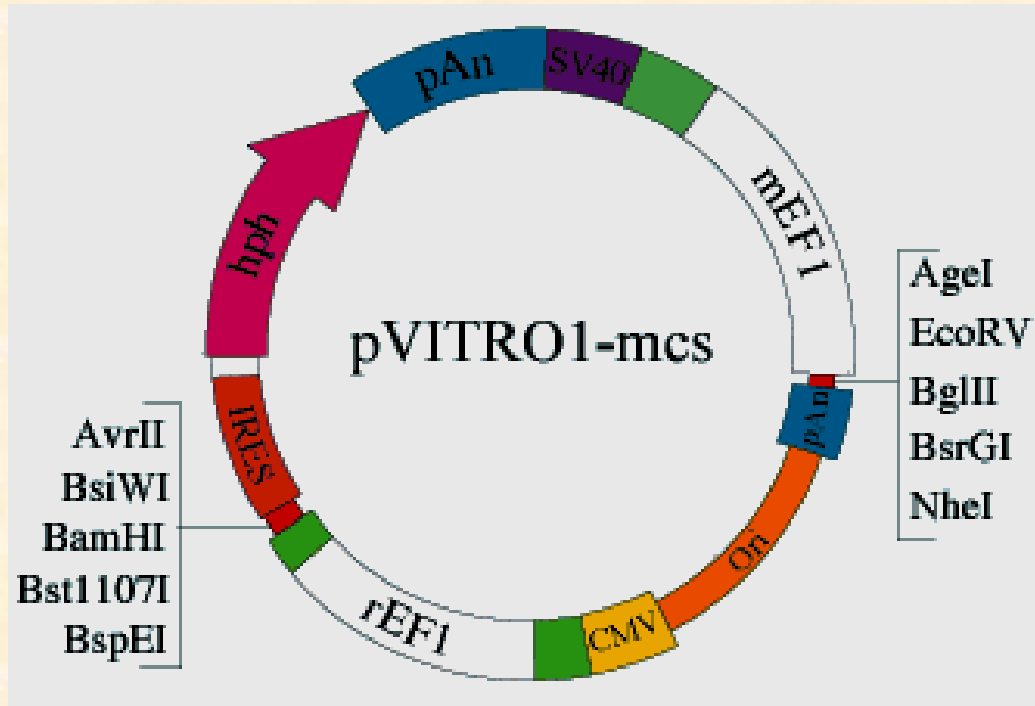
- инфицируют только  
делящиеся клетки

- потенциальная  
туморогенность

- низкий титр

- небольшая клонирующая  
емкость (около 3.5 т.п.о.)

# Невирусные системы



- **прямая инъекция**
- **рецепторо-опосредованный ЭНДОЦИТОЗ**
- **генное ружье**
- **липофекция**
- **электропорация**
- **полимерные носители**

# Плазмидные векторы

## **- достоинства:**

- *отсутствие токсичности и мутагенности*
- *практически неограниченная емкость вектора*
- *дешевизна производства*

## **- недостатки:**

- *трансфекция ограниченной популяции клеток*
- *деградация ДНК лизосомами*
- *отсутствие тропизма*

*( в настоящее время есть перспективные разработки)*

## Обобщенная схема плазмидного вектора для генной терапии

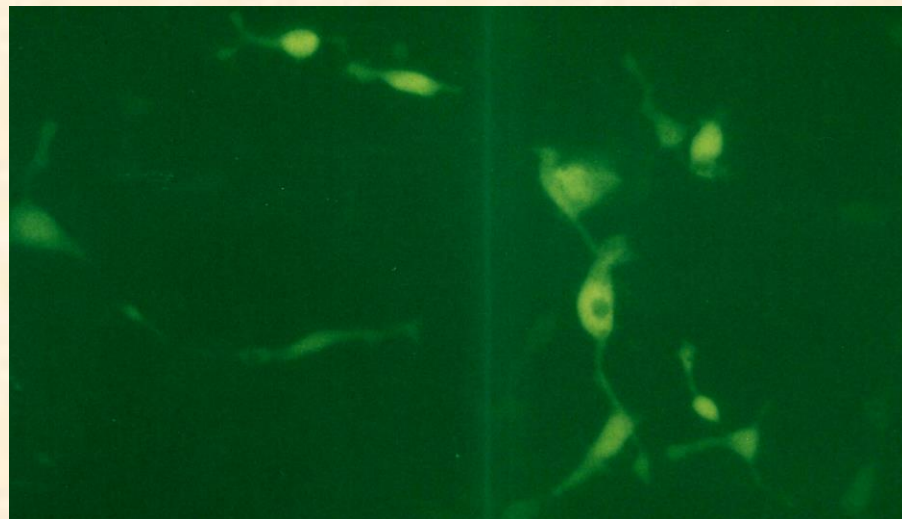
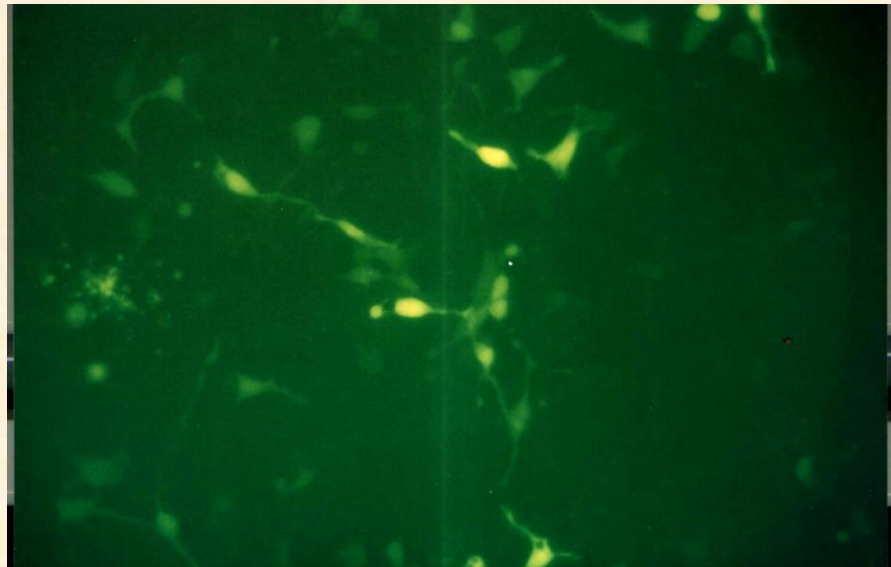


# Маркерные гены:

- **SEAP** (secreted alkaline phosphatase)
  - **$\beta$  - galactosidase**
  - **G418** (neomycin)
- **GFP** (green fluorescent protein)

**Экспрессия гена GFP  
(protein)**

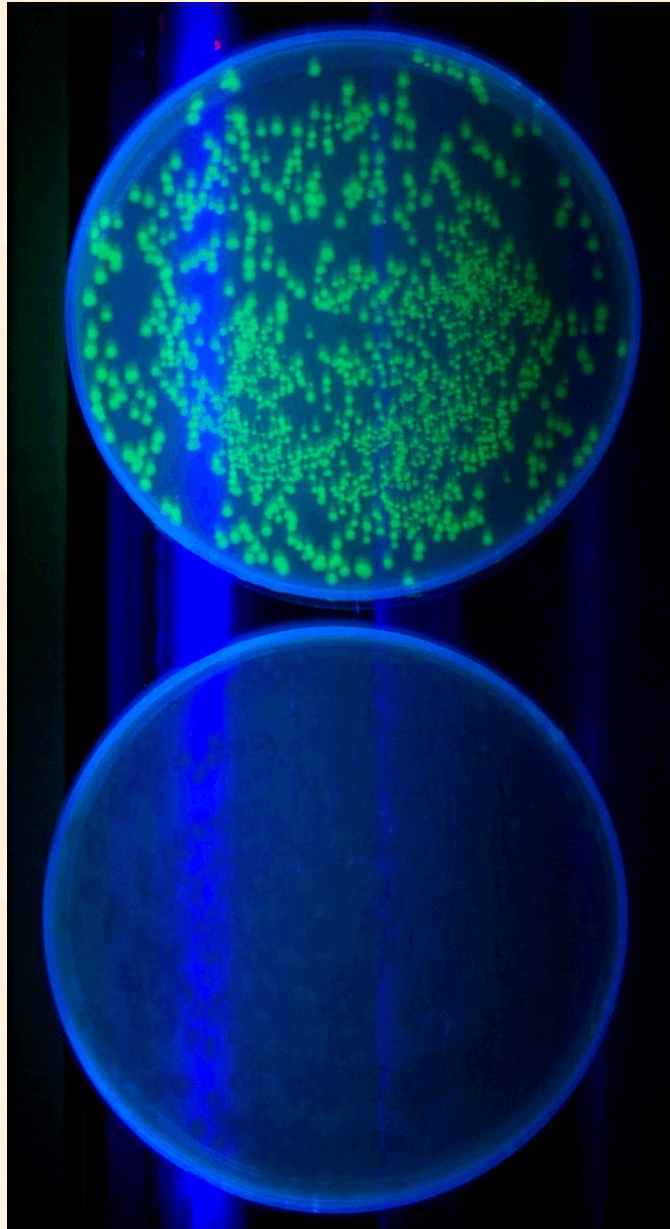
**(green fluorescent  
protein)  
в линии клеток 293**



●<sub>ex</sub> - 488 nm

●<sub>em</sub> - 507 nm

**Экспрессия гена GFP  
(green fluorescent protein)  
в клетках *E.coli***



●<sub>ex</sub> - 395  
nm ●<sub>em</sub> -  
509 nm

# Невирусные системы доставки

## Физические методы доставки рекомбинантных плазмидных векторов:

- **прямая инъекция «голового» гена в ткань (ДНК-вакцинация)**
- **электропорация**
- **липофекция**
- **кальций-фосфатная трансфекция**



**Таблица 1.** Методы внесения ДНК в эукариотические клетки и область их применения

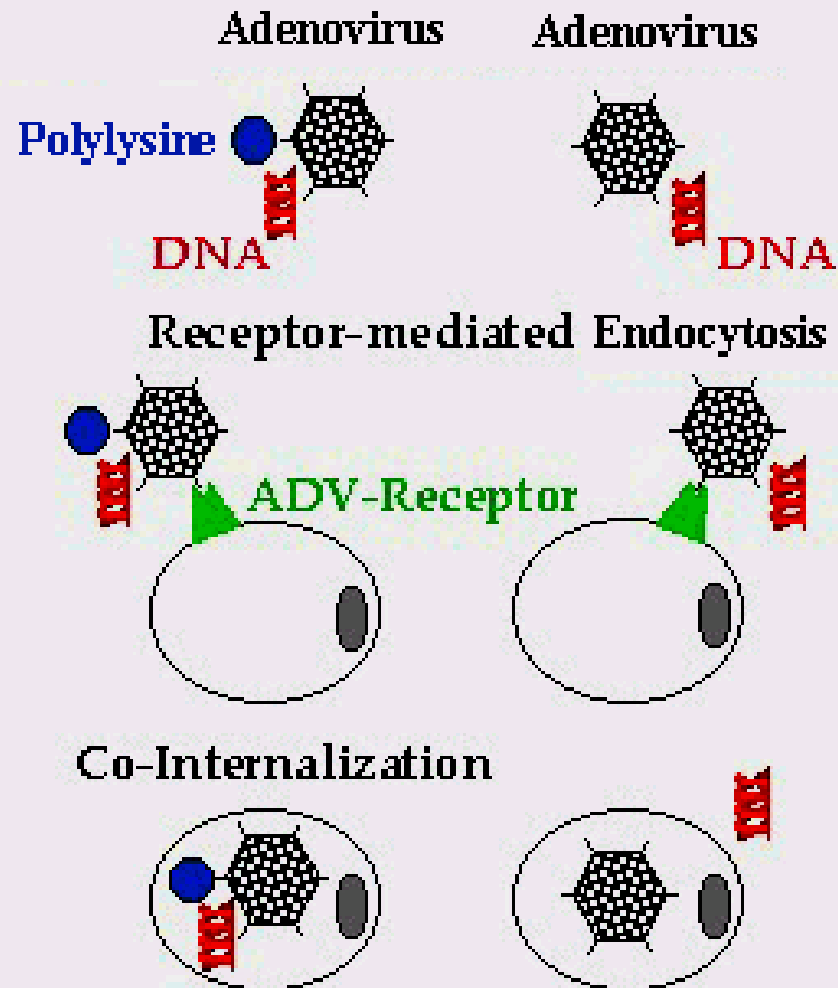
Методы переноса ДНК	Применимость для доставки генов	
	в культивируемые клетки	в ткани
<b>Химические</b>		
осаждение ДНК фосфатом Са	+	—
<b>Физические</b>		
электропорация	+	—
микроинъекция	+	—
бомбардировка частицами	+	+
простая инъекция	—	+
<b>Слияние</b>		
липосомы	+	+
<b>Опосредованное рецепторами поглощение</b>		
ДНК-белковые комплексы	+	+
<b>Рекомбинантные вирусы</b>		
аденовирусы	+	+
ретровирусы	+	—



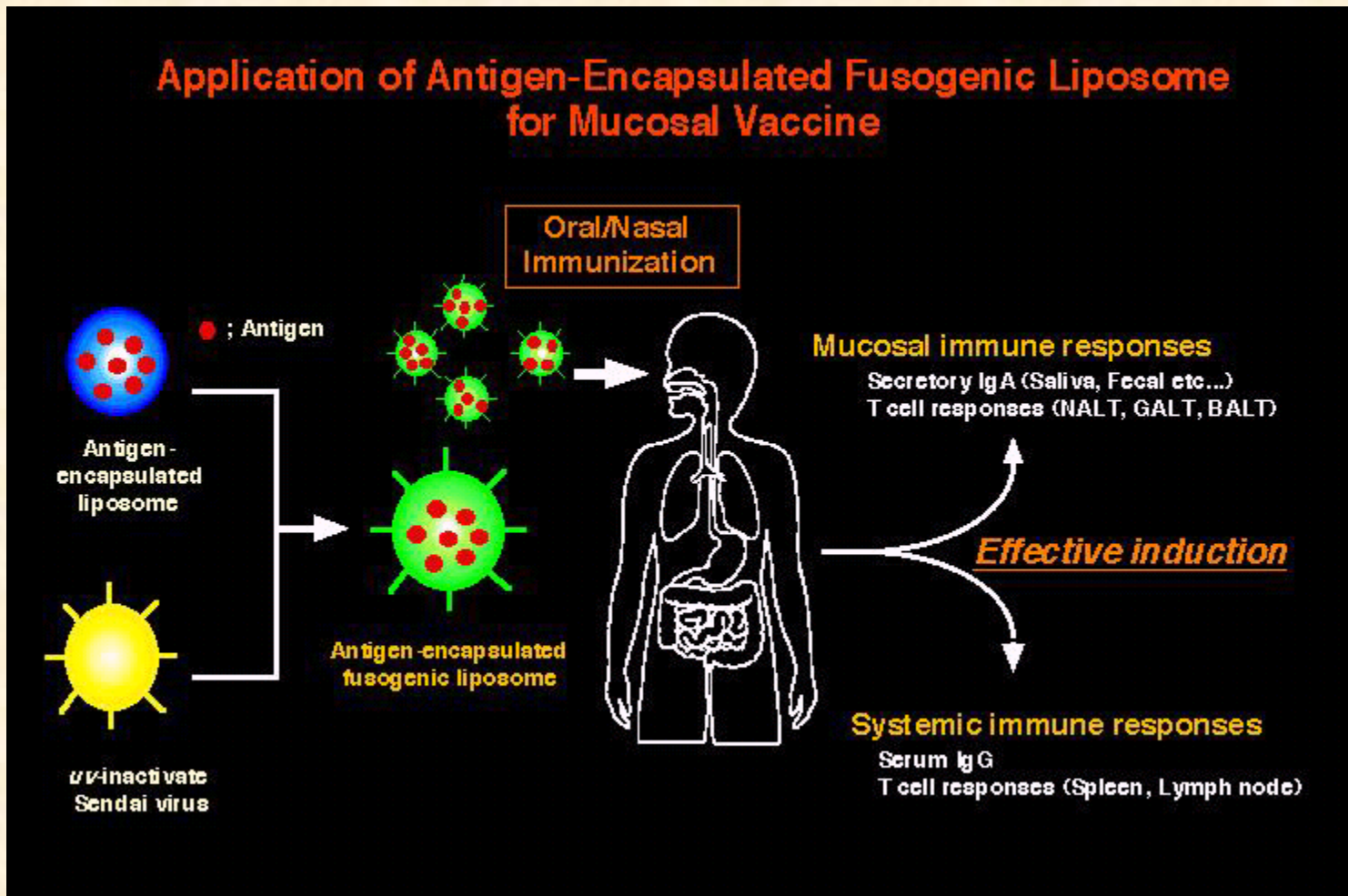
Принцип  
действия  
“Effecten  
Transfection  
Reagent”  
 (“QIAGEN”,  
Germany)

# **Смешанные системы доставки**

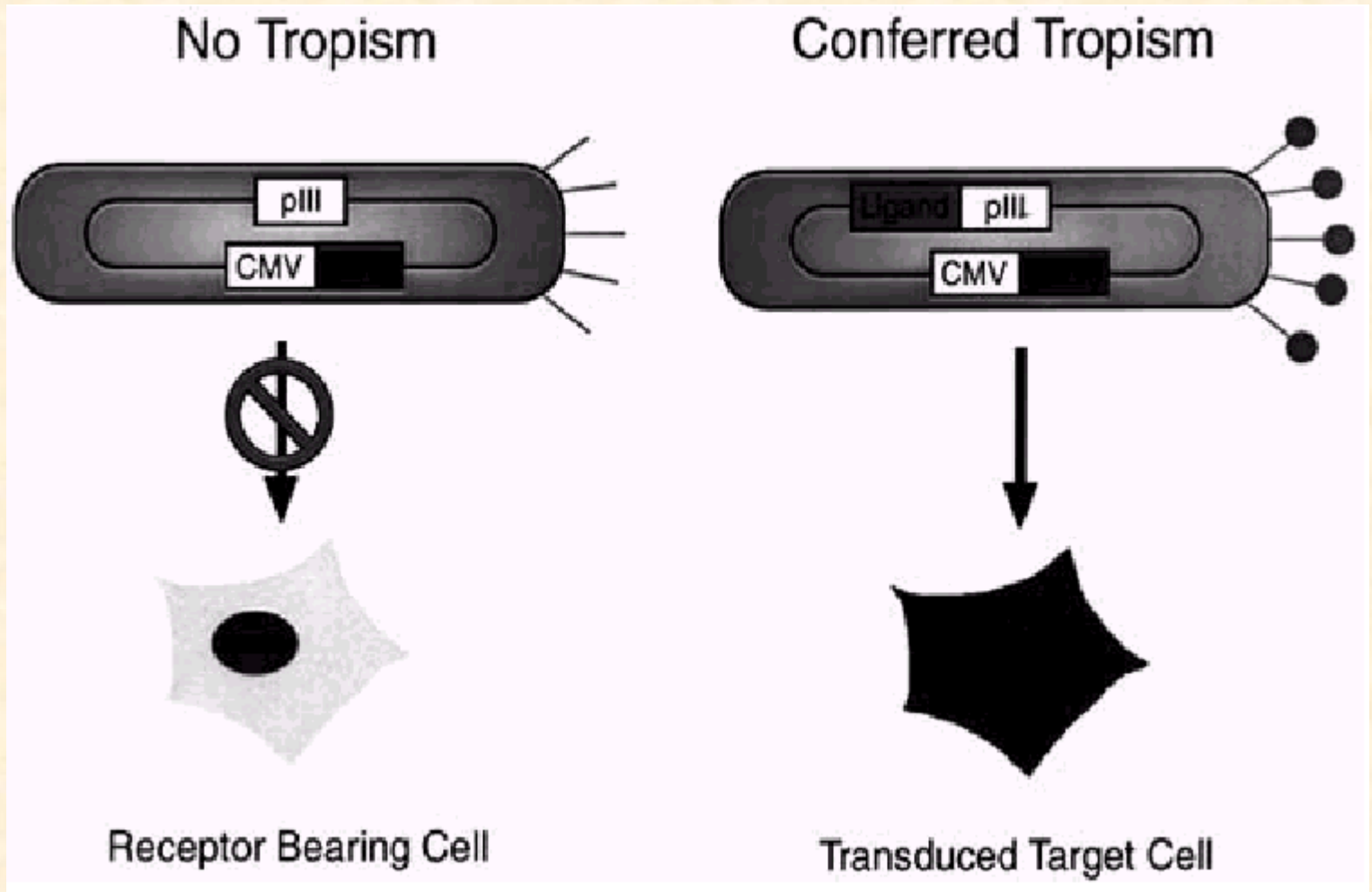
# Рецептор – опосредованный эндоцитоз



# Вирус -липосомы



# Бактериофаги



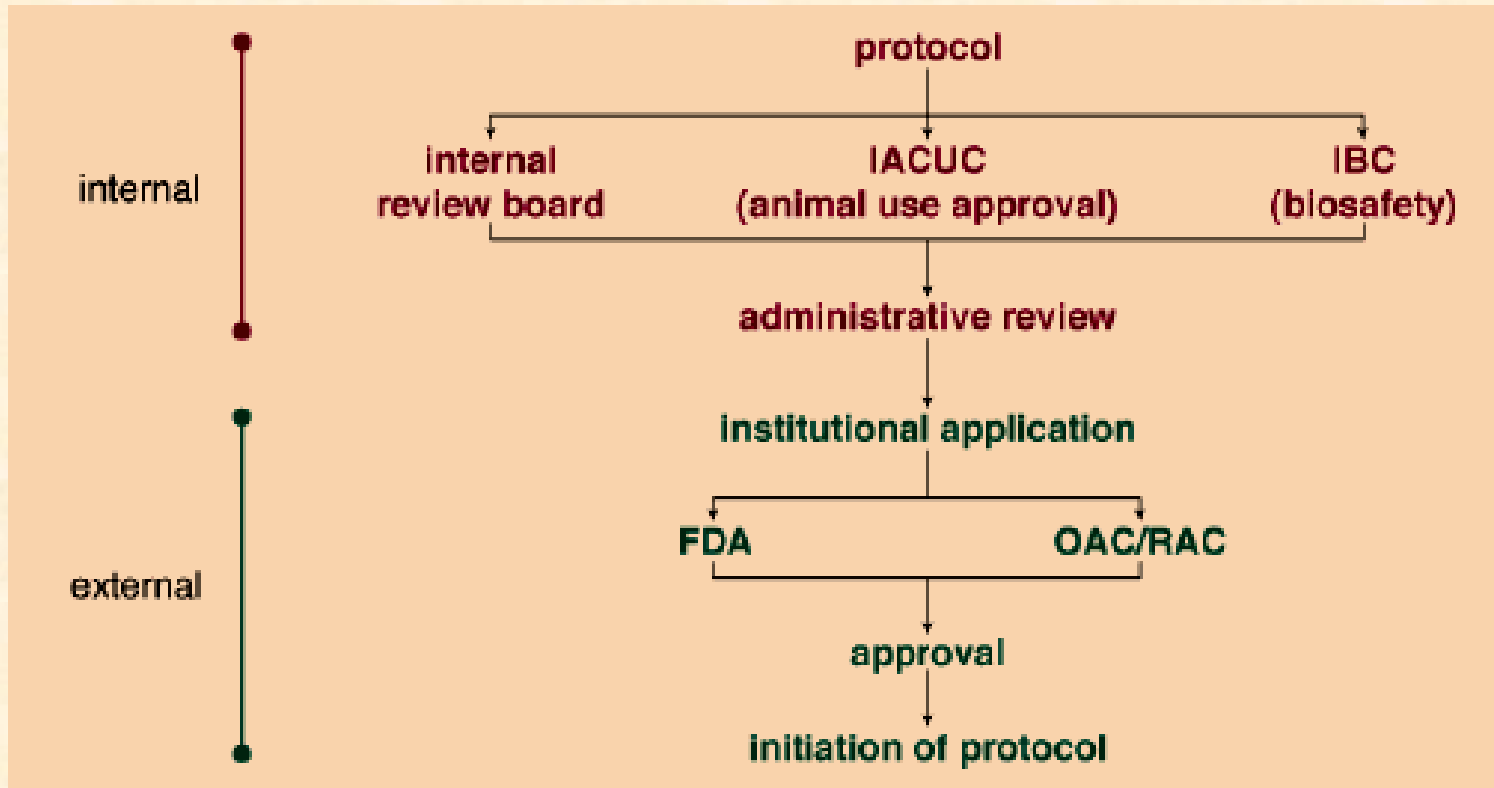
***Генная терапия в  
медицине***

# **Клинические испытания генотерапевтических препаратов.**

- **I фаза. Оценка токсичности генной конструкции.**
- **II фаза. Ограниченные испытания на небольшом контингенте больных.**
  - **III фаза. Широкомасштабные мультицентровые клинические испытания.**



## Начальные стадии внедрения генотерапевтических протоколов



- Зарегистрировано 636 клинических протоколов генной терапии
- **3496** пациента имеют в своем организме генетически модифицированные клетки

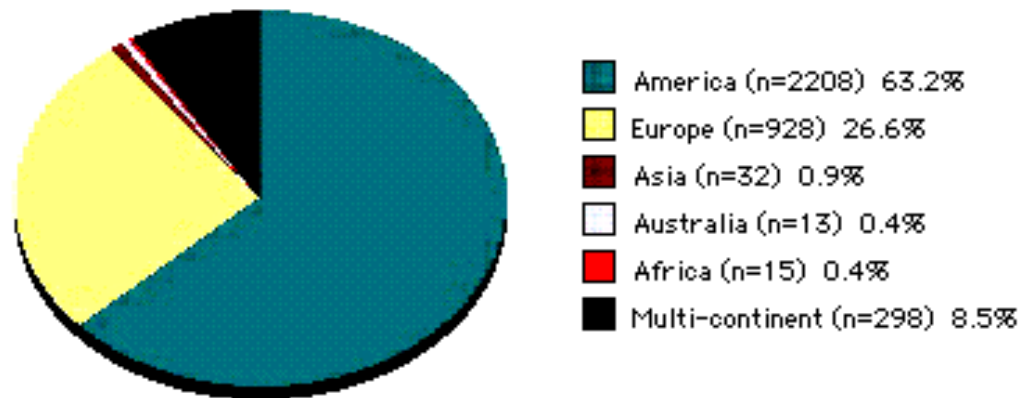
- 63,4 % протоколов и 68,4 % пациентов - генная терапия злокачественных новообразований (цитокины и суицидные гены)
- 12,3 % и 8,8% - генная терапия моногенных наследственных болезней
- 6,4% и 11,7% - генная терапия инфекционных заболеваний

## **Из 636 генотерапевтических проектов:**

- **420 проектов (66%) - I фаза клинических испытаний**
- **134 проекта (21,1%) - между I и II фазами клинических испытаний**
- **4 проекта (0,6%) - III фаза клинических испытаний**

# **Современное состояние генной терапии**

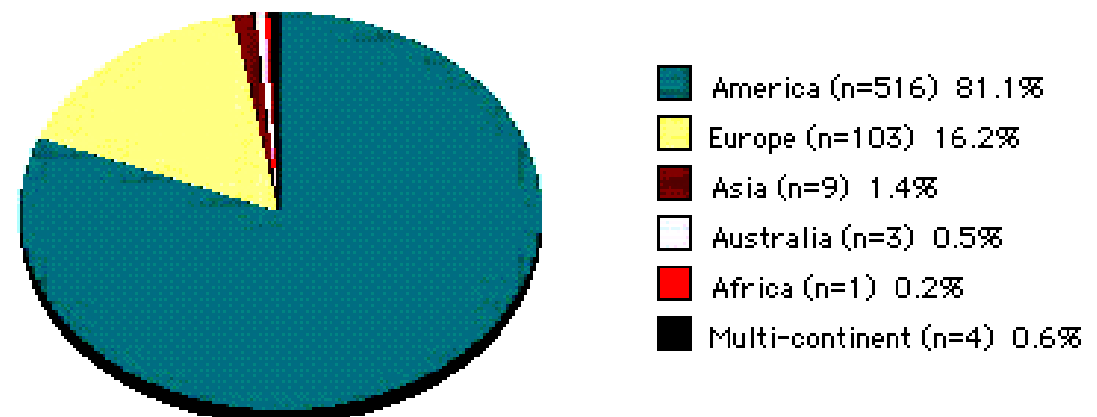
## Patients by continent



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

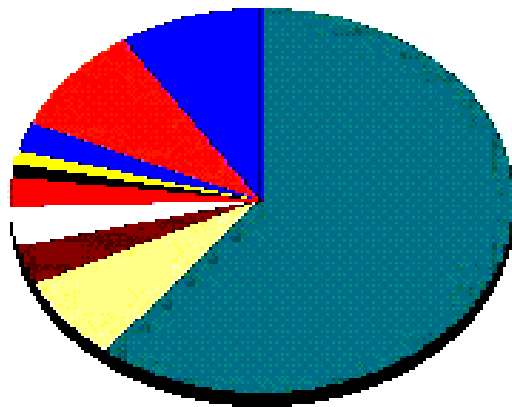
## КОНТИНЕНТЫ

## Protocols by continent



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

## Patients by country

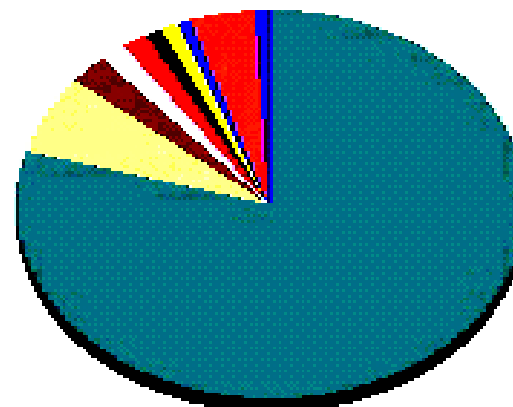


USA (n=2088)	60.4%
United Kingdom (n=257)	7.4%
France (n=111)	3.2%
Canada (n=120)	3.5%
Germany (n=84)	2.4%
Switzerland (n=34)	1%
Italy (n=45)	1.3%
Netherlands (n=85)	2.5%
Other countries (n=314)	9.1%
Multi-country (318)	9.2%

The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

## Страны

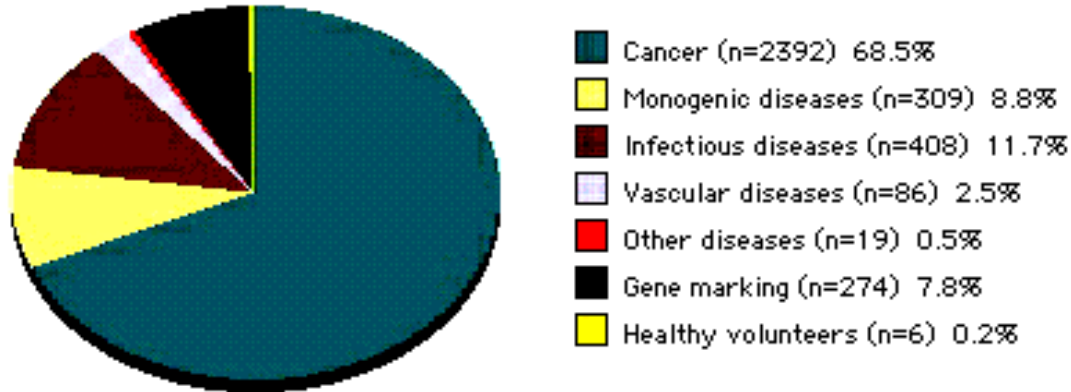
## Protocols by country



USA (n=505)	79.4%
United Kingdom (n=43)	6.8%
France (n=15)	2.4%
Canada (n=11)	1.7%
Germany (n=10)	1.6%
Switzerland (n=8)	1.3%
Italy (n=7)	1.1%
Netherlands (n=6)	0.9%
Other countries (n=26)	4.1%
Multi-country (4)	0.8%

The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

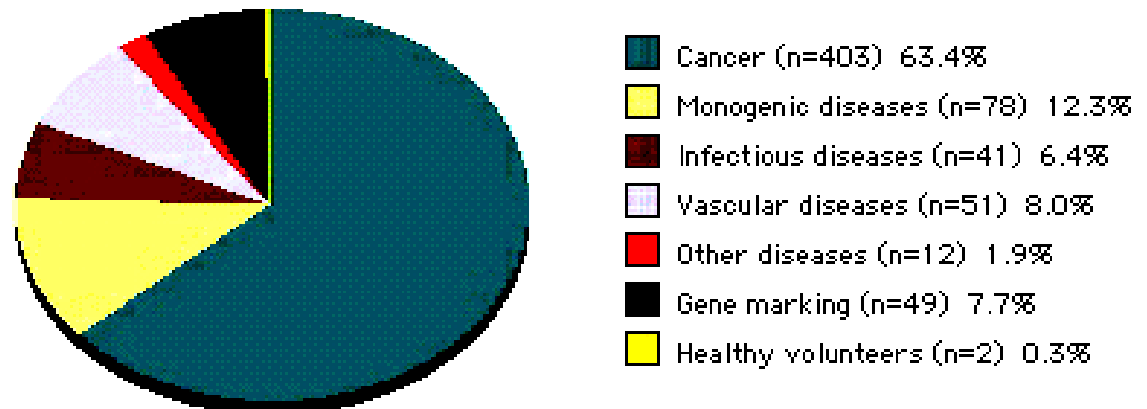
## Patients by disease



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

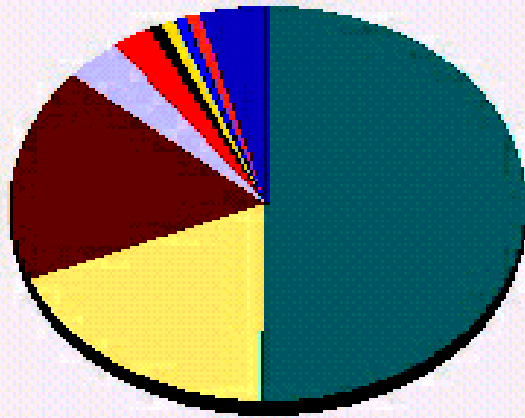
## Болезни

## Protocols by disease



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

## Patients by vector

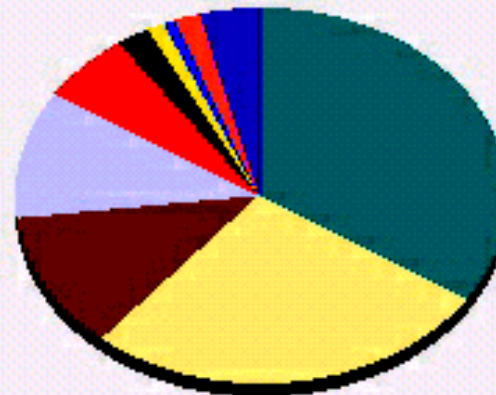


Retrovirus (n=1755)	50.2%
Adenovirus (n=644)	18.4%
Lipofection (n=619)	17.7%
Naked/Plasmid DNA (n=123)	3.5%
Pox virus (n=88)	2.5%
Adeno-associated virus (n=36)	1.0%
RNA transfer (n=30)	0.9%
Herpes simplex virus (n=21)	0.6%
Others (n=35)	1.0%
N/C (n=143)	4.1%

The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

## Векторы

## Protocols by vector

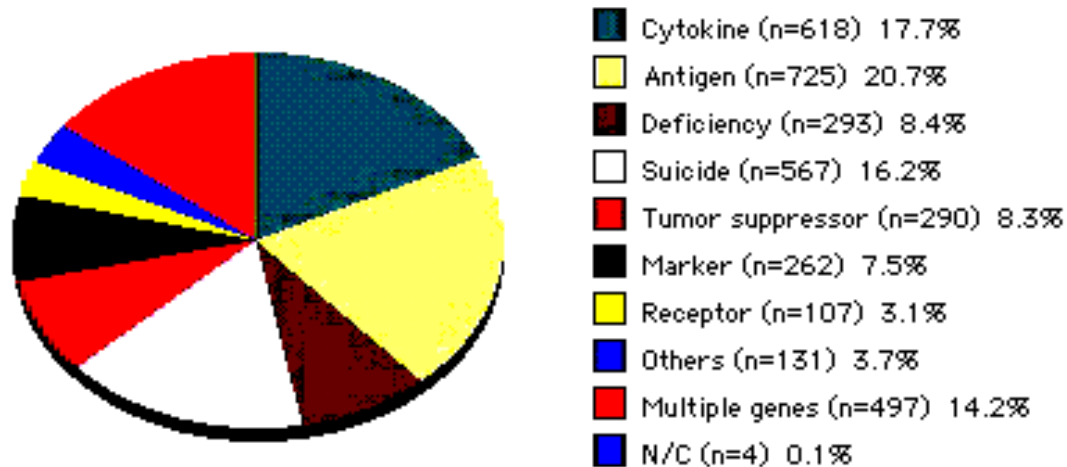


Retrovirus (n=217)	34.1%
Adenovirus (n=171)	26.9%
Lipofection (n=77)	12.1%
Naked/Plasmid DNA (n=70)	11.0%
Pox virus (n=39)	6.1%
Adeno-associated virus (n=15)	2.4%
RNA transfer (n=6)	0.9%
Herpes simplex virus (n=5)	0.8%
Others (n=11)	1.7%
N/C (n=25)	3.9%

The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)



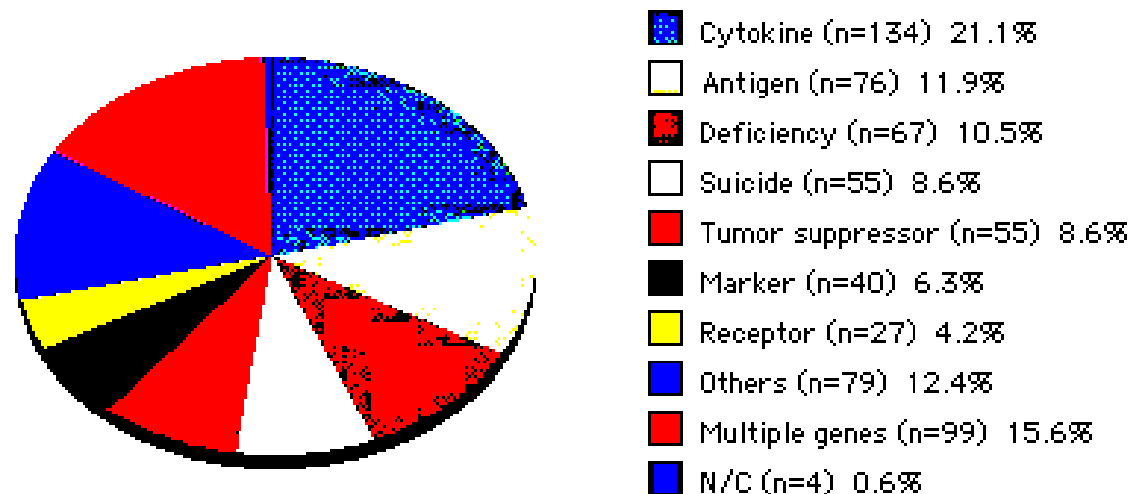
## Patients by gene types



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

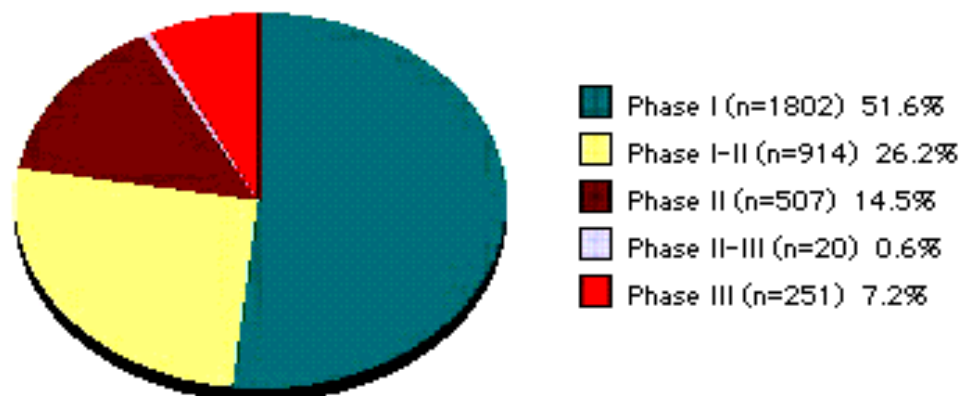
## Гены

## Protocols by gene types



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

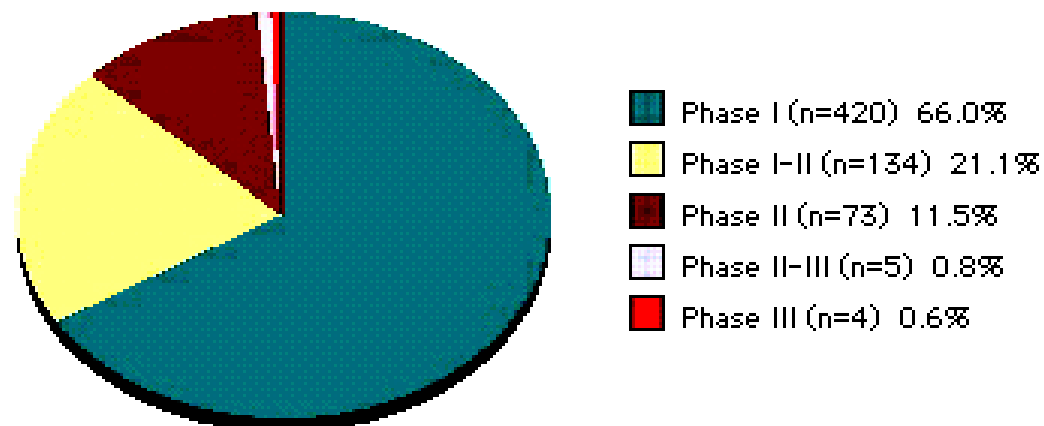
## Patients by phases



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

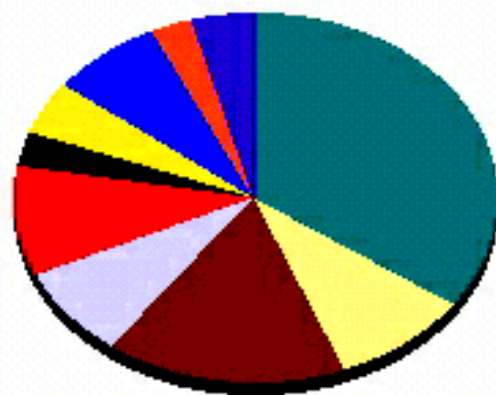
## Фазы

## Protocols by phases



The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

## Patients by routes

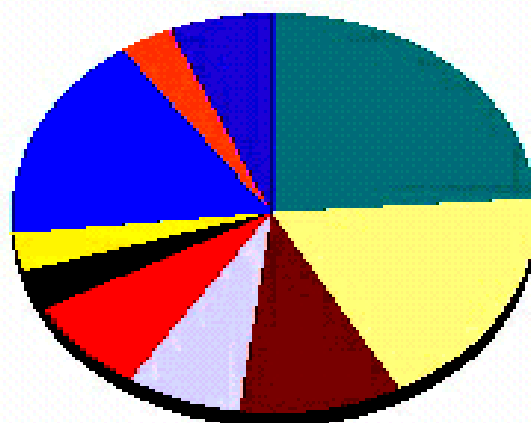


Intratumoral (n=1217)	34.8%
Intravenous (n=320)	9.2%
Subcutaneous (n=562)	16.1%
Bone marrow transplantation (n=276)	7.9%
Intramuscular (n=343)	9.8%
Intraperitoneal (n=107)	3.1%
Intranasal (n=162)	4.6%
Other (n=269)	7.7%
Multiple routes (n=90)	2.6%
N/C (n=148)	4.2%

The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

## Способы

## Protocols by routes



Intratumoral (n=152)	23.9%
Intravenous (n=115)	18.1%
Subcutaneous (n=64)	10.1%
Bone marrow transplantation (n=45)	7.1%
Intramuscular (n=49)	7.7%
Intraperitoneal (n=22)	3.5%
Intranasal (n=20)	3.1%
Other (n=108)	17%
Multiple routes (n=21)	3.3%
N/C (n=40)	6.3%

The Journal of Gene Medicine, © John Wiley & Sons 2002  
[www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)

## **III фаза клинических испытаний**

### **Генная терапия глиобластомы головного мозга.**

**После резекции в ложе опухоли вносятся мышинные клетки RA317, продуцирующие ретровирусный вектор, экспрессирующий ГЕН ТИМИДИНКИНАЗЫ вируса простого герпеса.**

**Через неделю больным вводится препарат ганцикловир, который после фосфорилирования *in situ* обрывает синтез ДНК в быстроделющихся клетках.**

**Genetic Therapy, Inc./Novartis**

## Реализуемые механизмы:

- **прямой эффект фосфорилированного ганцикловира**
- **«bystander effect» - гибель соседних опухолевых клеток за счет проникновения токсического продукта (трифосфат ганцикловира)**
- **локальное воспаление как результат введения мышинных клеток**
  - **системный иммунный ответ**

# **Генная терапия остеосаркомы (ESCCHN) (2 протокола)**

**Частота встречаемости - 40 000 случаев в год (США)**

**Предпосылки - более 50% пациентов, имеют повышенный уровень экспрессии мутантной формы p53**

**Генотерапевтический агент - фактор супрессии опухоли (кДНК p53)**

**Вектор – аденовирус тип 5**

**Способ введения - прямая инъекция в опухоль**

**Увеличение выживаемости в 2 раза**

# **Генная терапия метастатической меланомы (иммунотерапия)**

**Генотерапевтический агент - HLA-B7/Beta-2 Microglobulin cDNA**

**Презентация антигенов МНС класса I на поверхности опухолевой клетки после экспрессии HLA-B7/Beta-2 Microglobulin cDNA**

**Вектор - плазмидная ДНК в комплексе с катионными липосомами и DMRIE-DOPE**

**Способ введения – прямая инъекция в опухоль**

**31% пациентов не имели возврата опухоли в течение 6 лет**

# **Первый трагический случай**

**Смерть в сентябре 1999 г. Джесси Гелзингера (США).**

**Страдал недостаточностью орнитинкарбамоил-трансферазы (ОКТ).**

**Смерть наступила после третьей инъекции аденовирусного вектора последнего поколения, экспрессирующего ген ОКТ.**

**Вскрытие показало атрофию внутренних органов по механизму апоптоза.**

**Новое явление взаимодействия вирусного и человеческого генома?**



## **ПРИМЕРЫ:**

- **муковисцидоз (кистозный фиброз поджелудочной железы) - перенос гена МТР (муковисцидозный трансмембранный регулятор) с помощью аденовирусного вектора и липосом.**
- **мышечная дистрофия Дюшена - введение нормальных копий кДНК гена дистрофина с помощью ретровирусных векторов.**
- **рестеноз (повторное сужение просвета артерии после ангиопластики) - введение в сосуд гена сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в виде плазмидной ДНК.**

<b>Болезнь</b>	<b>Дефектный ген</b>	<b>Клетки-мишени</b>
<b>Иммунодефицит</b>	<b>Аденозиндезаминаза</b>	<b>Лимфоциты</b>
<b>Семейная гиперхолестеринемия</b>	<b>Рецептор липопротеинов низкой плотности</b>	<b>Гепатоциты</b>
<b>Гемофилия В</b>	<b>Фактор IX</b>	<b>Фибробласты</b>
<b>Эмфизема легких</b>	<b>A-1-антитрипсин</b>	<b>Лимфоциты</b>
<b>Фенилкетонурия</b>	<b>Фенилаланин - гидроксилаза</b>	<b>Гепатоциты</b>

<b>Болезнь</b>	<b>Дефектный ген</b>	<b>Клетки-мишени</b>
<b>Талассемия</b>	<b>β- глобин</b>	<b>Эритробласты</b>
<b>Респираторный дистресс-синдром</b>	<b>Сурфактант белок В</b>	<b>Эпителий бронхов</b>
<b>Болезнь Альцгеймера</b>	<b>Белок-предшественник в-амилоида (Aβ)</b>	<b>Нервные клетки</b>
<b>Болезнь Паркинсона</b>	<b>Тирозингидроксилаза</b>	<b>Миобласты, фибробласты, нервные клетки</b>

# **Основные подходы в генокоррекции онкологических заболеваний**

<b>Принцип</b>	<b>Вводимые гены</b>
<b>Повышение иммунореактивности опухоли</b>	<b>Гены чужеродных антигенов, цитокины</b>
<b>Генетическая модификация иммунных клеток</b>	<b>Гены цитокинов, ко-стимуляторов</b>
<b>Доставка генов «чувствительности», суицидных генов</b>	<b>Тимидинкиназа HSV, ген аденозиндезаминазы</b>
<b>Блокирование экспрессии онкогенов</b>	<b>Антисмысловые РНК, одноцепочечные антитела</b>
<b>Доставка генов-супрессоров опухолей</b>	<b>p53</b>
<b>Защита интактных клеток от химиотерапии</b>	<b>Гены лекарственной устойчивости тип 1</b>

<b>Принцип</b>	<b>Вводимые гены</b>
<b>Индукция синтеза противоопухолевых веществ нормальными клетками</b>	<b>Гены интерлейкина-2, интерферона</b>
<b>Продукция противоопухолевых рекомбинантных вакцин</b>	<b>Трансфекция дендритных клеток, вакцины типа БЦЖ, экспрессирующие противоопухолевый антиген</b>
<b>Локальная радиопротекция нормальных тканей с помощью антиоксидантов</b>	<b>Гены трансфераз, глутатион- синтетазы</b>

## **Новые подходы к коррекции генных дефектов:**

- **Химеропластика (коррекция ДНК в клетке)**

**Химеропласты - ДНК/РНК гибриды (около 25 нуклеотидов) шпилечной структуры с комплементарными мишени плечами. В гибрид вводится нужная нуклеотидная замена.**

**В ядре клетки происходит гомологичная рекомбинация с исправлением дефекта последовательности.**

**Успешная конверсия в 25-40% клеток.**

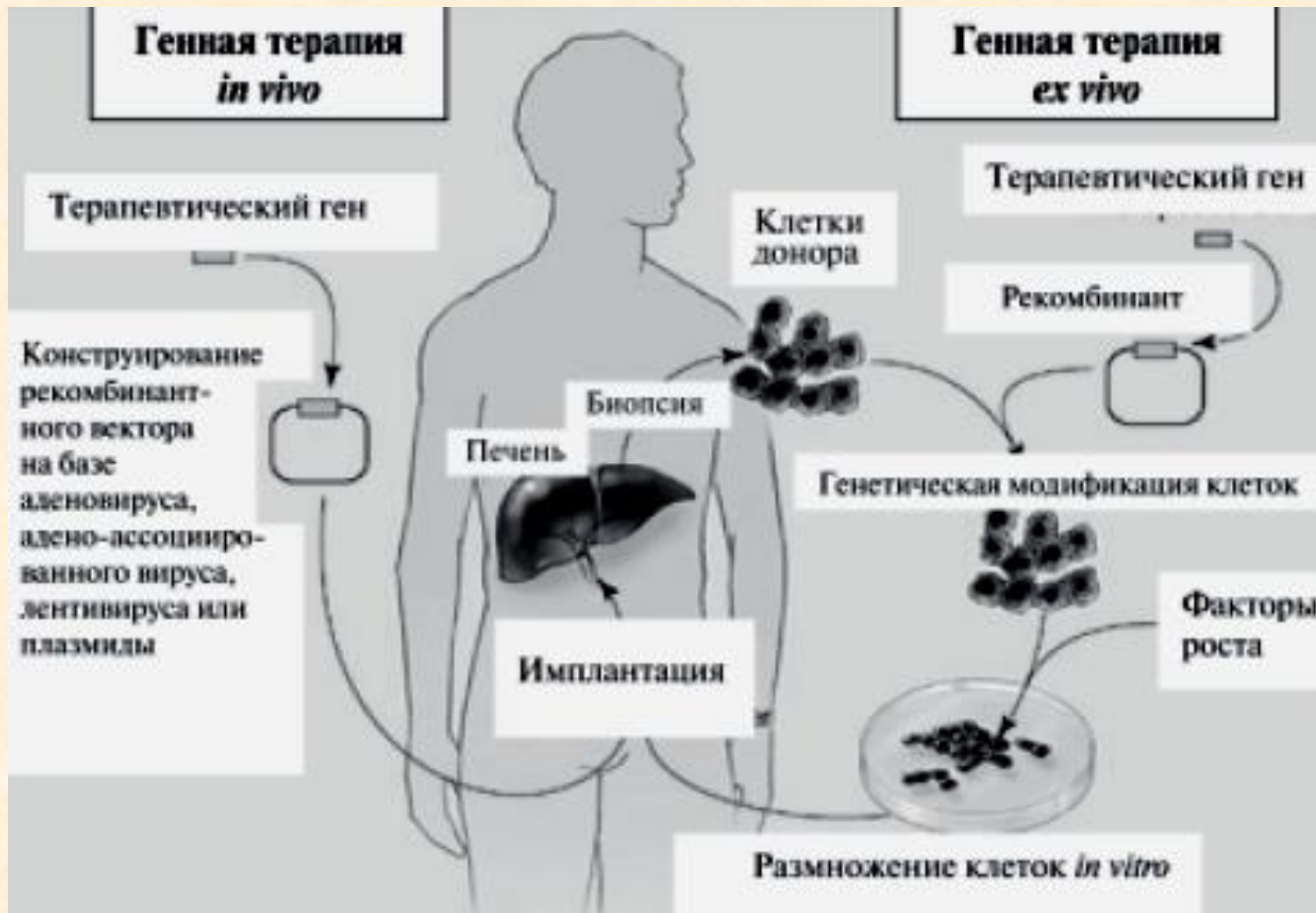
## **Выводы:**

- **Генная терапия пригодна для лечения широкого спектра заболеваний.**
- **Генная терапия имеет низкий уровень риска осложнений.**
- **Эффективность генной терапии на сегодняшний день близка к нулю.**



## **вопросы**

- **Сможет ли генная терапия в будущем обеспечить полноценную генокоррекцию, которая не представит угрозы для потомства?**
- **В какой мере полезность и необходимость генотерапевтической процедуры для индивидуума перевесят риск такого вмешательства для всего человечества?**
- **Сколько оправданы будут эти процедуры на фоне грядущего перенаселения планеты?**
- **Как будут соотноситься генно-инженерные мероприятия на человеке с проблемами гомеостаза общества и биосферы?**



Две основные стратегии, используемые при генной терапии:  
*in vivo* и *ex vivo*

# Генная терапия человека

- На людях *технология генной инженерии была впервые применена для лечения Ашанти Де Сильвы, четырёхлетней девочки, страдавшей от тяжёлой формы иммунодефицита. Ген, содержащий инструкции для производства белка аденозиндезаминазы (ADA), был у неё повреждён. А без белка ADA белые клетки крови умирают, что делает организм беззащитным перед вирусами и бактериями.*

- **Работающая копия гена ADA была введена в клетки крови Ашанти с помощью модифицированного вируса. Клетки получили возможность самостоятельно производить необходимый белок. Через 6 месяцев количество белых клеток в организме девочки поднялось до нормального уровня.**
- **После этого область генной терапии получила толчок к дальнейшему развитию. С 1990-х годов сотни лабораторий ведут исследования по использованию генной терапии для лечения заболеваний. Сегодня мы знаем, что с помощью генной терапии можно лечить диабет, анемию, некоторые виды рака, болезнь Хантингтона и даже очищать артерии. Сейчас идёт более 500 клинических испытаний различных видов генной терапии.**

- **В настоящее время известно 4000 наследственных заболеваний, для большинства из которых не найдено эффективных способов лечения.**
- **Сегодня существует возможность диагностировать многие генетические заболевания ещё на стадии эмбриона или зародыша. Скоро станет возможным исправлять и оптимизировать генотип будущего ребёнка.**
- **Свершения генной инженерии как в познании механизмов функционирования организмов, так и в прикладном плане весьма внушительны, а перспективы поистине фантастичны.**

- **Неблагоприятная экологическая обстановка и целый ряд других подобных причин приводят к тому, что все больше детей рождается с серьезными наследственными дефектами. В настоящее время известно 4000 наследственных заболеваний, для большинства из которых не найдено эффективных способов лечения.**
- **Сегодня существует возможность диагностировать многие генетические заболевания ещё на стадии эмбриона или зародыша. Пока можно только прекратить беременность на самой ранней стадии в случае серьёзных генетических дефектов, но скоро станет возможным исправлять и оптимизировать генотип будущего ребёнка. Это позволит полностью избежать генетических болезней и улучшить физические, психические и умственные характеристики детей.**
- **Сегодня мы можем отметить, что за тридцать лет своего существования генная инженерия не причинила никакого вреда самим исследователям, не принесла ущерба ни природе, ни человеку. Свершения генной инженерии как в познании механизмов функционирования организмов, так и в прикладном плане весьма внушительны, а перспективы поистине фантастичны.**

# Генно-инженерный метод лечения диабета

- Канадские исследователи **идентифицировали белок, ингибирующий выработку инсулина у мышей** и получили линию мышей с мутацией (делецией) гена **Lkb1** в бета-клетках поджелудочной железы. Результатом было увеличение размера и числа бета-клеток в железе, а также количества запасаемого и секретируемого клетками инсулина.

**Важно, что повышенная функциональная активность бета-клеток сохранялась на протяжении не менее пяти месяцев.** У мышей, имеющих в бета-клетках мутацию этого гена, при высококалорийной диете наблюдалось пониженное содержание глюкозы в крови.

- **Одна из самых больших загадок диабета – причина, по которой специализированные клетки поджелудочной железы прекращают секретировать инсулин, так необходимый организму для углеводного обмена. Канадские исследователи идентифицировали белок, ингибирующий выработку инсулина у мышей и получили линию мышей с мутацией (делецией) гена *Lkb1* в бета-клетках поджелудочной железы. Результатом было увеличение размера и числа бета-клеток в железе, а также количества запасаемого и секретируемого клетками инсулина.**

**Важно, что повышенная функциональная активность бета-клеток сохранялась на протяжении не менее пяти месяцев. У мышей, имеющих в бета-клетках мутацию этого гена, при высококалорийной диете наблюдалось пониженное содержание глюкозы в крови. Если результаты этого наблюдения подтвердятся на людях, они могут послужить путеводной нитью в понимании патогенеза диабета II типа и, возможно, в разработке новых способов лечения».**

**Диабет I и II типа – распространенное заболевание, являющееся самой большой проблемой здравоохранения не только Канады, но и всего земного шара. Результаты, полученные командой доктора Скритона, открывают новый нестандартный путь лечения этого дорогостоящего и серьезного заболевания.**



# Почему некоторые опухоли не поддаются химио- и радиотерапии?



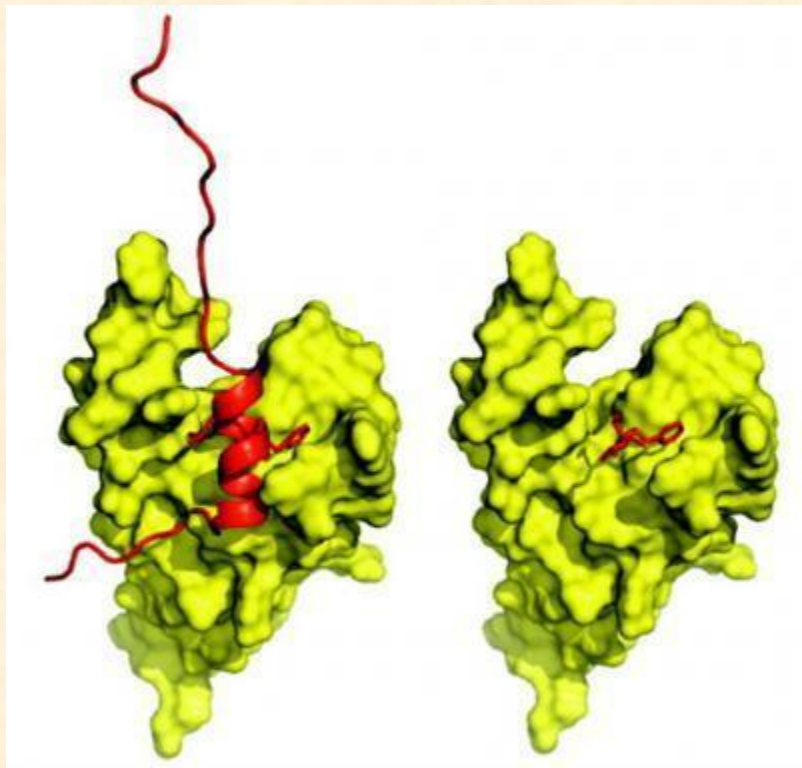
Мыши, у которых была нарушена система активации **p53**, были устойчивы к высоким дозам радиоактивного облучения.

Интересно, что по какой-то причине шерсть этих мышей под действием радиации стала коричневой. Обе мыши одного возраста.

- **p53** – один из белков, относящихся к так называемым супрессорам роста опухолей. Данные белки препятствуют неконтролируемому делению клеток.

- **p53** – белок, вызывающий апоптоз (физиологическую гибель) аномальных быстро делящихся клеток.
- В норме существует по крайней мере два негативных регулятора активности p53 – это белки Mdm2 и Mdmx, которые сдерживают p53, не позволяя ему вызывать гибель здоровых клеток. Однако даже небольшое повышение концентрации в клетке белка Mdmx приводит к **полной инактивации p53, в результате чего опухолевые клетки не гибнут и становятся устойчивыми к любым повреждающим воздействиям.**
- В эксперименте на мышах исследователи показали, что инактивация p53 приводит к тому, что у животных начинают развиваться агрессивные лимфомы, не поддающиеся воздействию химиотерапии.

# Управление экспрессией генов – будущее лекарственных препаратов?



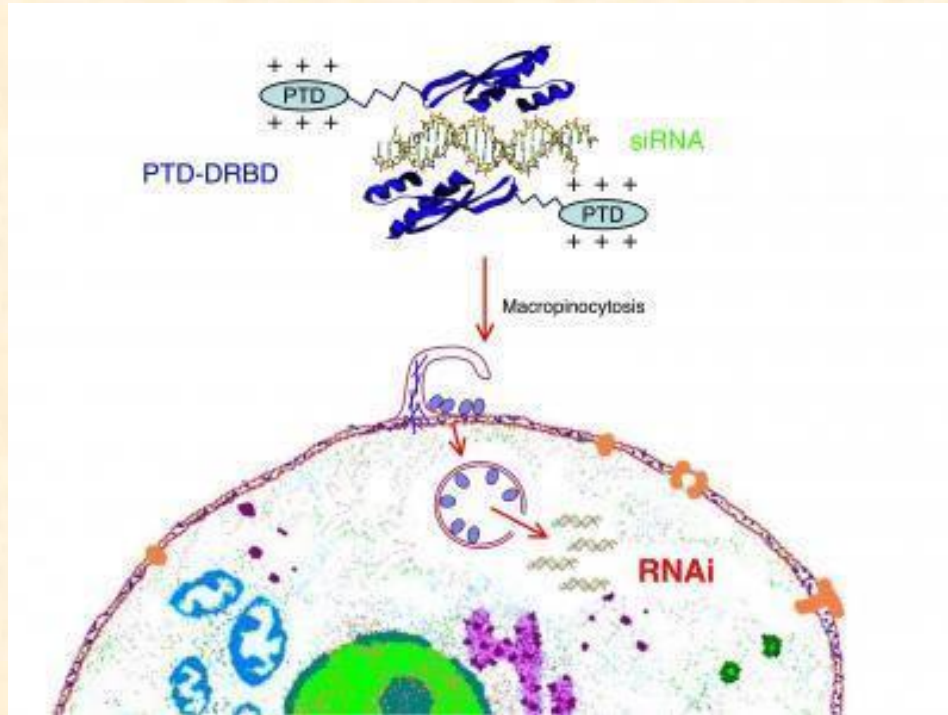
Синтетическая молекула (показана желтым), способная связываться с ДНК (показана красным) благодаря специальному ДНК-связывающему домену и воздействующая на экспрессию генов.

- Исследователи из США сообщили о разработке нового поколения лекарственных препаратов, которые могут использоваться в терапии артрита, онкологических и некоторых других болезней, **изменяя характер экспрессии генов, ответственных за патогенез заболеваний. Работая как молекулярные выключатели, эти препараты могут повышать продукцию белков, недостаток которых приводит к болезни, или блокировать экспрессию генов, кодирующих аномальные белки.**

- В своих экспериментах профессор Анна К. Мапп и ее коллеги сосредоточились на работе молекул, влияющих на экспрессию генов – так называемых **транскрипционных активаторов**. Они контролируют важнейший процесс в клетке – транскрипцию, являющуюся первым этапом синтеза белков на основе генетического кода ДНК. Нарушения работы транскрипционных активаторов могут в свою очередь приводить к нарушениям продукции белков, и в конечном итоге – к тяжелым заболеваниям. Например, *изменения структуры одного из таких регуляторов – небольшого пептида p53, обнаруживаются более чем при половине раковых заболеваний человека.*

Мапп описывает **новую группу синтетических транскрипционных активаторов**, которые могут помочь лучше понять процесс транскрипции. По своей структуре они идентичны естественным транскрипционным активаторам. **В настоящий момент эти молекулы могут применяться в научных целях для изучения механизмов того, каким образом ошибки в регуляции генов приводят к патологии. В будущем, возможно, они станут основой медицинских препаратов нового поколения.**

# Будущее противораковой терапии: новые системы доставки РНК в клетки



Проникновение siRNA в клетку в составе гибридного РНК-белкового комплекса.

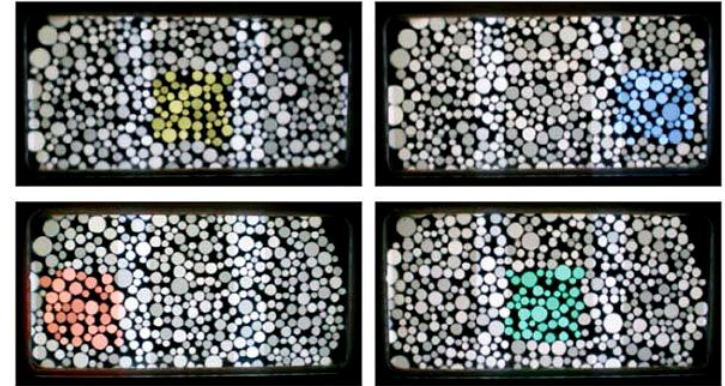
- Исследователи из Медицинской Школы в Сан-Диего при Калифорнийском Университете разработали новую эффективную систему доставки малых интерферирующих РНК (siRNA), подавляющих продукцию определенных белков, в клетки. Эта система должна стать основой технологии специфической доставки лекарственных препаратов в различные типы раковых опухолей. Результаты работы опубликованы в журнале Nature Biotechnology.

- ***«Малые интерферирующие РНК, осуществляющие процесс так называемой РНК-интерференции, обладают невероятным потенциалом для лечения рака»,*** объясняет профессор Стивен Доуди, руководивший исследованием: ***«и, хотя нам предстоит еще очень много сделать, на данный момент мы разработали технологию доставки препаратов в популяцию клеток – как первичной опухоли, так и метастазов, не повреждая при этом здоровые клетки».***

# Как довести рак до самоубийства?

- Специалисты из Казанского государственного университета, московского Института молекулярной биологии и берлинского Института <sup>Элементы</sup> Медицинской иммунологии при клинике «Шаритэ» (Charité) **нашли эффективное средство, чтобы заставить опухолевую клетку “покончить с собой”**. Как оказалось, для этого достаточно обработать клетки **биназой** — ферментом, **который расщепляет РНК**. Ферменты с такой функцией, которые у каждого организма свои, биохимики называют рибонуклеазами. Как недавно выяснилось, **очень часто ферменты эти запускают в раковых клетках механизм апоптоза — генетически запрограммированной самоликвидации**.
- Исследователи считают, что необходимо как можно быстрее расширить банк «противоопухолевых ферментов». Причем бактериальные рибонуклеазы, три из которых они как раз и протестировали, удобнее в использовании, чем ферменты млекопитающих, так как способны действовать в присутствии других препаратов, и к тому же дешевле.

# Обезьян вылечили от дальтонизма при помощи генной терапии



Образцы картинок, на которых обезьяны должны были найти цветное пятно.

Самцы беличьей обезьяны *Saimiri sciureus* от рождения не способны различать красный и зеленый цвета, поскольку у них в сетчатке глаза имеется только два вида опсинов (светочувствительных белков, реагирующих на свет с определенной длиной волны). Для полноценного цветного зрения нужно иметь как минимум три разных опсина. Американским ученым удалось вылечить двух взрослых самцов саймири от врожденного дальтонизма при помощи искусственных вирусов, содержащих ген человеческого длинноволнового опсина. Исследование показало, что для приобретения трихроматического зрения не нужно перестраивать нервную систему — достаточно лишь добавить в сетчатку новый рецепторный белок.