

Институт биологии  
гена РАН, Москва

# СОВРЕМЕННАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ: ЧТО ЭТО ТАКОЕ И КАКОВЫ ЕЕ ПЕРСПЕКТИВЫ?

С.Л. Киселев

*В настоящий момент генная терапия уже вышла из состояния эйфорических обещаний, идет планомерная работа по разработке векторных систем, в том числе направленных, оптимизируются дозы и применяемые гены и, вероятно, через 5–7 лет ожидания прошлого десятилетия оправдаются.*

## Гены и геном – основа генной терапии

Два года назад на уровне глав государств как великое достижение человечества было всемирно заявлено о завершении определения первичной последовательности генома человека. Всего было предсказано существование порядка 40 000 генов.

Что же такое ген, для чего он нужен в организме и почему он может быть использован как терапевтическое средство?

Существование единицы наследственности, т.е. некой условной единицы, которая определяет передачу того или иного признака от родителей к детям, например, цвет волос, глаз, было предсказано еще в позапрошлом веке. Монах Грегор Мендель, любитель роз, выбрал для своих исследований к счастью не розы, а горох. Мендель был чрезвычайно везуч, он выбрал два признака, цвет и морщинистость горошин, и основываясь на своих наблюдениях за передачей этих признаков от родителей к потомкам, вывел знаменитые законы Менделя. Если бы он выбрал плодовитость или размер, или, если бы он остановился на розах, законы Менделя были бы открыты другим и позже. В первой половине прошлого, XX века, менделевские законы развил Морган. Для целого поколения российских ученых менделизм-морганизм означал клеймо, за которое ссылали на Соловки, Сибирь или просто заставляли отречься от своих убеждений. Однако невозможно остановить познание. И ко второй половине XX века стало более менее понятно, что из себя представляет единица наследственной информации и где она материализуется. На рис. 1 изображена клетка организма, в клетке находится ядро, в ядре находятся хромосомы, у высших состоящие из 2 в основном полностью идентичных хроматид. Хроматида по своему составу представляет компактизованную ДезоксиРибонуклеиновуюКислоту, далее ДНК, намотанную на белковый каркас нуклеосом. ДНК это не просто кислота как соляная, серная и т.д., это органическое соединение, с которого уже несколько декад стараются скопировать процессор для вычислительной техники. Это некая матрица, которая позволяет благодаря заложенной в ней программе существовать всему живому, от вирусов до человека.

Эта возможность реализуется через два почти универсальных механизма, заложенных в структуре и коде ДНК: 1) репликации, двуцепочечная молекула, имеющая взаимодополняющие цепи, комплементарные, достраивает сама себя, че-

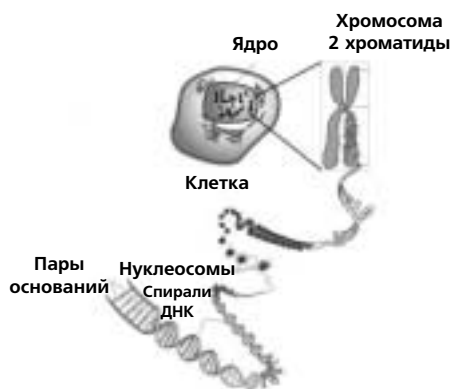


Рис. 1. Схематическое представление наследственной информации.

рез комплементарность, и таким образом обеспечивает идентичность и 2) транскрипция – все необходимое закодировано в молекуле ДНК в единице наследственности, именуемой **геном**, и с **одной** цепи синтезируется Рибоуклеиновая Кислота – далее РНК, с которой уже считываются белки, которые функционируют и из которых построено почти все живое. Итак, первый вывод, сумашедший монах Мендель вычислил единицу наследственности, вне зависимости от систем измерения (метрическая или нет), она получила названия **ген** и гены воспроизводятся, повторяя сами себя. Второй вывод, **ген** кодирует **белки**. Не могу не подчеркнуть фантастичность открытия Менделя, сейчас известно, что один ген может кодировать несколько белков, но его предпосылка была один ген – один признак (для него и еще нескольких поколений один ген – был один белок).

Зачем такой сложный механизм? Для надежности, размер генома, т.е. уникальная последовательность нуклеотидов, кирпичиков ДНК невероятно большой, несколько миллиардов, считывание такого количества невозможно без неких ошибок. Одни устраняются на этапе синтеза ДНК, другие на этапе синтеза РНК, третьи на этапе синтеза белков. Но система не совершенна и случаются ошибки, которые дают начало мутациям, которые, в свою очередь, имеют три последствия: смерть организма – это хорошо, дефектную жизнь организма – это плохо и могут быть безразличны для организма, а это тоже хорошо.

Таким образом, одной из основных задач **генной терапии** – далее ГТ – является коррекция системы работы генов путем их направленного переноса в организм или определенный тип клеток, тканей. Отличие и, одновременно, преимущество ГТ по сравнению с другими видами терапии заключается в том, что ГТ направлена на устранение **причин** заболевания, в то время как большинство лекарств устраняет лишь симптомы заболевания. В табл. 1 приведены типы заболеваний, которые на настоящий момент считаются мишенями ГТ.

Таблица 1  
Заболевания, при которых перспективным считается проведение ГТ

Моногенные заболевания	Микополисахараидозис Наследственная гиперхолестеролимия Гемофилия В (factor IX deficiency) Хронический грануломатоз
Онкологические заболевания	Меланома Рак предстательной железы Онкогематология и др.
Инфекционные заболевания	СПИД Эпштейна–Барр и цитомегаловирусная инфекции
Сосудистые заболевания	Склероз коронарных артерий Склероз периферических артерий Атеросклероз вен нижних конечностей с трофическими язвами Тромбофлебит
Другие	Неспецифический язвенный колит Боковой амиотрофический склероз Ревматоидный артрит Заболевание Альцгеймера

## Генная терапия и ее составляющие

Минуло чуть более 13 лет с того момента, когда было начато первое испытание ГТ-воздействия на детей, дефектных по гену аденозин дезаминазы (ADA). Лекарство для паллиативного лечения стоит 60 000 долларов в год. Это испытание было удачным, в организм вводился аденовирус, который кодировал фермент. Вирус проникал в клетки и генетически модифицированные клетки производили фермент аденозин дезаминазу. Это позволило почти втрое сократить лекарственное лечение. С тех пор минуло уже 13 лет и на следующих диаграммах отражено количество пациентов, вовлеченных в ГТ-испытания, распределение по заболеваниям, по странам, где эти испытания проводятся (рис. 2).

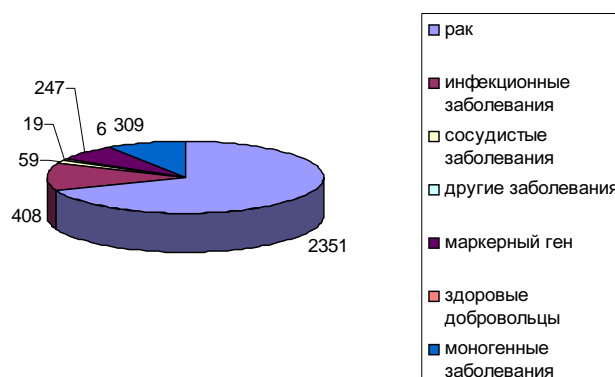


Рис. 2. Распределение пациентов, получающих генотерапию при различных нозологиях.

За это время ГТ испытала целый ряд подъемов и падений, которые были вызваны широко разрекламированными, но неоправдавшимися ожиданиями. Развитие ГТ можно сравнить с развитием биотехнологий, которые в начале 80-х годов были в глубочайшем кризисе и которые теперь являются царицей мира наравне с информационной наукой.

Что же из себя представляет ГТ и каковы ее составляющие? На настоящий момент существует два типа ГТ-воздействия: ex vivo и in vivo, но в любом случае воздействие оказывается на соматические клетки, а не на клетки зародышевого пути. Ex vivo воздействие заключается в индивидуализированном подходе, когда генно-инженерные манипуляции с клетками пациента осуществляются in vitro, потом уже генетически обработанные клетки попадают обратно в организм. In vivo метод предполагает введение гена в векторной молекуле и осуществляется в организм пациента. До настоящего времени все клинические исследования сфокусированы на внесении дополнительных генов, а не на коррекции или замещении генов, что является более сложным. Но в любом случае ген должен быть доставлен во все, в любые или в какие-либо определенные типы клеток и тканей. Отсюда следует два важных следствия ГТ-воздействия. Во-первых, неотъемлемость ГТ от клеток, и, как следствие, отсутствие генной терапии как таковой, а реальное существование генно-клеточной терапии, оба эти термина мы в дальнейшем будем отождествлять. Во-вторых, как и для любого вида

лекарственной терапии, основной проблемой является **доставка** действующего начала, в нашем случае гена, куда необходимо и с высокой эффективностью. До настоящего момента, все виды ГТ направлены на соматические клетки и не затрагивают клетки зародышевого пути. То, что обеспечивает доставку и проявление нужного гена в клетке, называется вектором. На настоящий момент существуют следующие наиболее популярные способы доставки генетического материала в клетки и организм (ретровирус, аденовирус, липосомы, «голая» ДНК, покси вирус, аденоассоциированный вирус, РНК, баллистическая, вирус герпеса).

Наиболее простой, но наименее эффективный способ – это так называемая «голая» ДНК (naked DNA). В этом случае используется ген в сопровождении минимального количества дополнительных нуклеотидных последовательностей, необходимых лишь для наработки ГТ-материала. Следующий по сложности, но обеспечивающий более эффективную доставку генетического материала в клетки, способ использования «голой» ДНК в сочетании с липосомами. В этом случае такой же, как и выше генетический материал, находится в составе липосом. Еще более сложный способ, добавляющий большое количество дополнительных последовательностей, за счет которых повышается эффективность, это необходимая ДНК в составе вирусов (рис. 3). В качестве вектора могут быть использованы генетически модифицированные *ex vivo* клетки. В этом случае ДНК находится в составе клеточного вектора. И, наконец, электромеханическая доставка, когда «голая» ДНК или чисто механически (*gene gun* или баллистическая доставка) или используя электромагнитное поле насильно под воздействием этих полей попадает в клетки.

На сегодняшний день вирусы являются самыми эффективными средствами доставки генетического материала в клетки высших организмов. Используются вектора на основе ретровирусов, аденовирусов, лентивирусов. Но за все приходится расплачиваться. Эффективность компен-

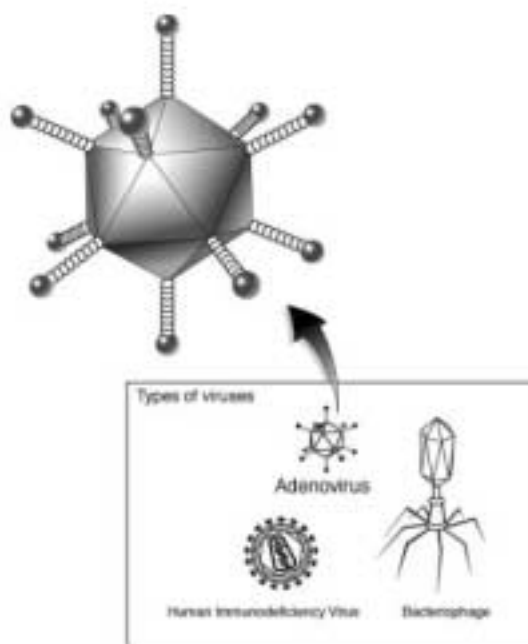


Рис. 3. Схематическое изображение вирусов.

сируется возможными негативными последствиями и стоимостью. Все негативные последствия генной терапии были вызваны по существу высокой дозой вируса, который или сам по себе вызывал отрицательную реакцию или, интегрируя в геном человека, активировал онкогены. Два случая развития лейкемии были зарегистрированы у детей, которые были больны сцепленным с X хромосомой иммунодефицитом. Тем не менее, дальнейшие испытания остановлены не были по требованию родителей детей, получающих лечение. Генная терапия в данном случае была единственным видом терапии, дающим надежду на жизнь, а вероятность интеграции достаточно мала, тем более, что лейкемия у детей поддается лечению. В качестве векторов используются ретровиру-

Таблица 2  
Эффективность различных методов доставки генетического материала в клетку

Заблевание	Вектор	Метод доставки	Ген	Направленность терапии
Рак	Липосомы		HLA B7	Увеличение иммуногенности
Рак	Липосомы			Увеличение иммуногенности
Рак	Аденовирус	Опухолевые клетки <i>in vivo</i>	p53	Индукция апоптоза
Рак	Ретровирус	Опухолевые клетки <i>in vivo</i>	TK	Уничтожение ферментом
Рак	Ретровирус	Фибробласты <i>ex vivo</i>	IL-12	Увеличение иммуногенности
Ишемия	Чистая ДНК	Клетки мышцы <i>in vivo</i>	VEGF	Стимуляция ангиогенеза
СПИД	Ретровирус	T-клетки <i>ex vivo</i>	Химерный TCR	Переориентация цитотоксических T-клеток

сы, это вирусы, содержащие РНК, с которой может быть считана двуцепочечная ДНК, и она интегрирует в геном пациента. Последнее поколение векторов на основе ретровирусов базируется на HIV, и они получили название лентивирусов. Следующие по популярности аденовирусные вектора. Аденовирус содержит двуцепочечный ДНК геном, недостатком является то, что почти каждый человек уже был экспонирован аденовирусной инфекции и на вектор существует иммунный ответ, снижающий эффективность трансфекции. Аденоассоциированные вирусы имеют одноцепочечный ДНК геном и не иммуногенны, но интегрируют в специфический район хромосомы 19 человека, где находится много генов, связанных с иммунным ответом. Есть еще целый ряд вирусных векторов, но их употребимость гораздо ниже, и мы их обсуждать не будем. Как вы видите, вирусные системы имеют целый ряд негативных свойств. В то же время не следует забывать мудрую фразу Парацельса, который утверждал, что яд – это всего лишь вопрос дозы.

На втором месте по использованию находятся липосомы, которые не так эффективно доставляют материал внутри клетки, но являются относительно дешевыми в производстве и безопасными.

На самом деле все системы показали свою достаточно высокую эффективность, об этом свидетельствуют данные, приведенные в табл.2, где сведены клинические испытания, для которых вторая фаза уже завершается. Разнообразие успешных подходов свидетельствует в пользу перспективности каждого из методов.

В последние годы было несколько сообщений об успешном использовании ГТ в клинике. В этих исследованиях нативная ДНК, кодирующая ангиогенный фактор – васкулярный фактор роста эндотелия (VEGF), была инъецирована в скелетные мышцы пациентов с периферической ишемией, которая приводила к плохому кровоснабжению конечностей. После этого у части больных наблюдался продолжительный и выраженный лечебный эффект, включая тех, кому грозила ампутация [5]. В настоящее время проводятся клинические испытания у больных с ишемической болезнью сердца.

## Генная терапия опухолей

В настоящее время молекулярно-генетические принципы возникновения опухолей считаются в основном выясненными.

Открыта и охарактеризована большая группа онкогенов, т.е. генов, белковые продукты которых стимулируют превращение нормальной клетки в опухолевую. Другая группа генов, обозначаемых как гены-супрессоры опухолей, кодируют белки, подавляющие клеточный рост. Инактивация генов-супрессоров также способствует превращению нормальной клетки в опухолевую.

Для возникновения опухоли человека нужно в среднем около 10 изменений в различных онкогенах или генах-супрессорах. Обычно разные опухоли содержат разный набор измененных генов. Каждая опухоль имеет свой генетический портрет. Однако некоторые гены оказыва-

ются поврежденными особенно часто. Сюда относится ген p53, контролирующий клеточный цикл и поврежденный в 50% опухолей человека, и онкоген ras, активированный в 25% опухолей человека.

Наконец, выявлено большое число генов, изменения которых приводят к тому, что клетки первичной, относительно доброкачественной опухоли, приобретают свойства злокачественных клеток, способных к инвазивному, деструктивному росту и метастазированию.

Считается, что иммунная система организма осуществляет надзор за возникновением трансформированных клеток и удаляет их, однако, существование опухолей указывает на низкую эффективность этого надзора, а может быть и на полное отсутствие такового. Ведь иммунная система направлена на распознавание «чужого», экзогенного материала, а опухоль имеет эндогенное происхождение и для иммунной системы является «своей». Тем не менее, расширившиеся знания о функционировании иммунной системы и формировании иммунного ответа позволяют надеяться на создание схем, при которых иммунная система будет способна распознать опухоль.

Хотя мы узнали очень много о механизмах возникновения рака, это пока не привело к немедленному решению проблемы рака. Одной из причин является разнообразие наборов генетических изменений, приводящих к развитию этого заболевания. Более того, в одной опухоли могут присутствовать клетки с разными генетическими портретами, которые выражаются в виде опухолевых антигенов. Другая причина – трудность вызвать генетические изменения во всех опухолевых клетках так, чтобы подавить рост всех клеток в опухоли. Наконец, третья причина – это высокая пластичность опухолевых клеток, их способность накапливать мутации, сохраняя жизнеспособность. В результате некоторым клеткам удается избежать гибели, и они снова дают рост опухоли.

Таким образом, современные подходы к генной терапии опухолей в основном основаны на, во-первых, нормализации работы мутированного гена (онкогена или гена-супрессора) и, во-вторых, обучении иммунной системы распознавать опухолевые антигены и активировать иммунный ответ.

К первому относятся попытки подавить работу наиболее часто активируемых онкогенов, например, онкогена ras, или, наоборот, вызвать образование нормального продукта гена-супрессора опухолей, например, белка p53.

Одним из способов является введение в клетки конструкций ДНК, которые синтезируют матричную РНК (мРНК), кодирующую нормальный белок p53. Образование нормального белка p53 в опухолевой клетке ведет к гибели последней посредством апоптоза. В опухолевой клетке апоптоз блокирован благодаря отсутствию нормального p53 [23].

Другой вариант – введение конструкции, обеспечивающей синтез антисмысловой РНК для онкогена, например, для онкогена ras. Антисмысловая РНК – это РНК, комплементарная мРНК. Она не несет информации для син-

теза белка, но она образует комплексы с мРНК и делает последнюю не способной к синтезу белка. Таким образом, можно в принципе инактивировать онкоген [22].

В опухоль вводят вирус, он заражает клетки, геном вируса проникает в ядро и входящая в состав генома вируса генетическая конструкция начинает синтезировать мРНК для белка-супрессора или антисмысловую РНК для онкогенного белка. Однако и этот метод не дает 100% заражения опухолевых клеток.

Тем не менее, определенные успехи были достигнуты. В частности, заражение опухолей вирусами, которые синтезировали нормальный белок p53, подавляло развитие опухоли, хотя и не приводило к полному излечению.

Здесь мы подходим к основополагающей проблеме любой неинвазивной терапии. Если мы инфицируем вирусным вектором целый организм, то и нормальные клетки будут заражены вирусом, который будет всегда либо синтезировать нормальный белок p53, либо инактивировать экспрессию гена *ras*. И то, и другое может иметь негативные последствия для нормальной клетки. Таким образом, для повышения эффективности воздействия и снижения негативных эффектов необходима направленная или адресная доставка терапевтического средства, в данном случае генно-терапевтической конструкции в определенные клетки или ткани. В данном направлении интенсивно ведутся работы.

Второй подход основан на мобилизации иммунной системы организма против опухоли. Для того, чтобы разобраться с этим, необходимо провести небольшой экскурс в механизм иммунного ответа. В рамках теории иммунного надзора трансформированные клетки должны удаляться с помощью клеток иммунной системы. В упрощенном виде иммунная система должна атаковать то, что имеет признак «чужого» или не имеет признака «своего». Эволюционируя, иммунная система должна была противостоять, в первую очередь, наружной инфекции, против которой она достаточно эффективно борется. Но трансформация клеток самого организма и, как следствие, отсутствие признака «чужой», а в то же время присутствие признака «свой», приводит к возникновению

толерантности в отношении переродившихся клеток. В данном случае мы даже не рассматриваем те опухоли, которые сами «научились» распознавать и атаковать клетки иммунной системы, например, через Fas-лиганд-зависимый лизис. Таким образом, для того чтобы обеспечить эффективное распознавание опухолевых клеток, мы должны отмаркировать их меткой «чужой», а для удаления активировать цитотоксический ответ. Классический ответ на «чужое» представлен на рис. 4.

Антигенпрезентирующие клетки (АПК), к которым относятся дендритные клетки, макрофаги и некоторые другие, взаимодействуют с патогеном, поглощенный патоген процессируется до антигенных пептидов и пептиды представляются в комплексе с молекулами МНС второго типа, формируя первый сигнальный каскад. Одновременно с этим, АПК распознает «чужого», запуская цитокиновый каскад и экспрессию сигнала второго типа ко-стимуляторную молекулу В7. Таким образом, происходит превращение наивной Т-клетки в обученную Т-клетку-помощника. Через сложный каскад цитокинов Т-клетка-помощник инициирует антительный и/или цитотоксический Т-лимфоцитарный ответ. Два сигнала «придуманы» природой для надежности, чтобы избежать ответа на свои антигены. В случае опухоли именно отсутствие сигнала 2 делает невозможным противоопухолевый ответ иммунной системы. Второй механизм иммунного ответа базируется на Т-клеточном ответе на антигены, представленные в комплексе с МНС типа I, но также требует ко-стимуляторного сигнала через молекулу В7. Итак, чтобы преодолеть возникшую толерантность и/или стимулировать активацию иммунного ответа, мы должны воздействовать или ряд цитокинов, сопровождающих сигнал 2 (рис. 4), либо экспрессировать на опухоли молекулу ко-стимуляции В7. Именно эти подходы и реализуются с помощью генного воздействия. Если вводить цитокины в организм системно, то, во-первых, они могут просто не достигнуть места назначения, и, во-вторых, системное введение многих цитокинов имеет трудно предсказуемые отрицательные эффекты. Локальная секреция цитокинов опухолевыми клетками в непосредственной

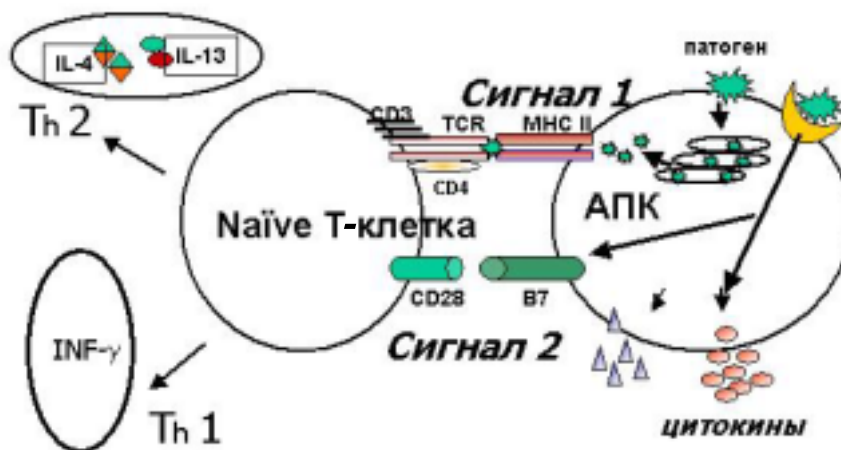


Рис. 4. Упрощенная схема иммунного ответа.

близости от представленных опухолевых антигенов в данном случае имеет большое преимущество. Экспрессировать же ко-стимуляторную молекулу B7 непосредственно на поверхности опухолевой клетки можно только путем введения в опухолевую клетку генетической конструкции.

Большое число исследований было выполнено на лабораторных животных. Генетическая модификация опухолевых клеток, приводящая к секреции определенных цитокинов, может вызывать подавление роста опухоли даже в отсутствии системного иммунного ответа, как в случае с G-CSF [3], IL-4 [9, 10, 20, 21]. В этом случае редукция опухолей происходит при участии нейтрофилов, эозинофилов и макрофагов.

Ряд других цитокинов, таких как IL-1 [6, 24], IL-2 [1, 2, 10], IL-7 [12, 14], INF $\gamma$  [8, 15, 17], GM-CSF [11], Flt-3-лиганд [13], CD95L [19], ингибируют рост трансфected опухолевых клеток *in vivo* только в присутствии опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, а также при участии Т-хелперных и антиген-презентирующих клеток. В случае с лимфотоксином (LT) [16] замедление роста опухоли происходит как при участии Т-клеток, так и с привлечением В-клеток. Также первичное отторжение модифицированных опухолевых клеток может быть ассоциировано с присутствием NK и гранулоцитов [4].

Большинство опухолевых клеток, трансфected с целью продукции определенных цитокинов, не замедляют свой рост *in vitro*, при этом однако рост опухоли *in vivo* значительно замедляется [16, 19], что говорит об активации иммунного ответа организма в результате продукции этих цитокинов. Механизмы данного процесса до конца не ясны и могут отличаться для различных цитокинов. Тем не менее, данный подход с использованием живых цитокин-трансфected опухолевых клеток для активной иммунизации пациентов применяется в клинике [7, 18].

На начальных этапах реализации этого подхода схема приготовления вакцины выглядела следующим образом: получение первичного опухолевого материала пациента и установление из него клеточной линии. Далее размножение этих клеток и подбор условий для их генетической модификации. Проведение генетической модификации, инактивация опухолевых клеток радиацией, определение уровня экспрессии гена, которым проводили модификацию, хранение готовой индивидуальной или аутологичной вакцины. Реально процесс приготовления вакцины занимает 3–4 мес и требует участия высококвалифицированных специалистов. Одновременно с этим надо понимать, что с помощью вакцины практически невозможно удалить опухоль крупного размера, тем более у пациента, который уже прошел курс химио- и радиотерапии и иммунная система которого подавлена не только прогрессирующей опухолью, но и лечением. Какова же область применимости аутологичной вакцины. Несомненно, после хирургического вмешательства с адъювантной целью для предупреждения рецидивов заболевания. Обнадешивающие результаты подобной вакци-

ны получены в сочетании с химиотерапией. Аутологичная вакцинация с использованием различных генов и векторов успешно прошла I фазу клинических испытаний, одновременно стало очевидным, что в настоящее время этот подход достаточно трудоемкий и дорогой.

Другой аналогичный подход основан на использовании уже имеющихся опухолевых клеточных линий человека, охарактеризованных по комплексу гистосовместимости и опухолевым антигенам (аллогенная вакцина). В этом случае используются опухолевые клетки, которые не экспрессируют молекулы MHC, или их гистотип совпадает с гистотипом пациента для того, чтобы избежать реакции отторжения трансплантата, но добиться ответа на опухолевые антигены. В настоящий момент проходят II фазу клинические испытания вакцины M-VAX (меланома), G-VAX (рак предстательной железы). Эти вакцины включают набор аллогенных клеток, генетически модифицированных геном гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Совмещение индивидуального подхода со стандартизованным генетически-модифицированным препаратом достигается в другой вакцине, основанной на так называемом *bystander effect* – «эффекте близкого положения». В этой вакцине используется генетически модифицированная геном ГМ-КСФ клеточная линия, не экспрессирующая молекулы гистосовместимости. Этот стандартный препарат смешивается с опухолевой тканью индивидуального пациента, инактивируется радиацией и получается готовая вакцина. Секреция белка ГМ-КСФ в непосредственной близости от опухолевых клеток оказывается достаточно эффективной для формирования иммунного ответа.

### Отечественный опыт генной терапии

Как следует из изложенного, ГТ базируется на передовых технологиях генной и клеточной биологии. В нашей стране события последнего десятилетия не способствовали развитию подобных технологий. Тем не менее, нам удалось начать клинические испытания по генной терапии опухолей и инфаркта миокарда.

В нашей лаборатории был открыт ген, получивший название tag7, который кодировал белок, обладавший свойствами цитокина и хемокина, а именно, привлекал моноциты периферической крови, индуцировал созревание АПК дендритных клеток, вызывал апоптоз некоторых клеточных линий. Зарубежными исследователями была показана важная роль этого белка в обеспечении врожденного иммунного ответа у насекомых. Этот ген мы использовали для генетической модификации клеток. Оказалось, что его экспрессия подавляет рост опухолевых клеток в организме и активирует противоопухолевый иммунный ответ на повторное введение немодифицированных опухолевых клеток. В экспериментах на животных мы сравнили эффективность терапевтической вакцины на основе клеток, модифицированных геном tag7 и геном ГМ-КСФ. По нашим данным, выживаемость животных, получивших вакцину на основе гена tag7, была лучше, чем на основе гена ГМ-КСФ. В своих эксперимен-



тах мы показали, что в противоопухолевый ответ вовлечены дендритные и Т-клетки. Несколько лет экспериментов, проведенных на животных, убедили нас в возможности перехода к клиническим испытаниям по I фазе аутологичной вакцины на основе опухолевых клеток, модифицированных геном tag7. Основной задачей I фазы клинических испытаний является оценка безопасности. Испытания проводились в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва) и НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург). Результаты этого исследования убедительно показали безопасность вакцины и наличие определенных эффектов (преимущественно иммунологических) у части больных. Следует подчеркнуть, что испытания проводились у тяжелого контингента больных, резистентных к стандартному лечению, у которых мы не ожидали выраженных лечебных эффектов от активной специфической иммунотерапии. Кроме того, установлено, что приготовление этой вакцины сопряжено с большими временными и материальными затратами, поэтому дальнейшие исследования планируем проводить с аллогенным опухолевым материалом.

Другое исследование было проведено нами совместно с НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Мы использовали ГТ для стимуляции процесса ангиогенеза при инфаркте

миокарда. Для этого была использована генетическая конструкция, которая кодировала белок под названием сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). Как видно из названия, этот белок стимулирует рост эндотелиальных клеток, которые и являются основой кровеносных сосудов. В данном случае терапевтическое действие было основано на повышении уровня этого белка вблизи ишемизированного участка и стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток. Использовалась «голая» ДНК, которая вводилась пациенту интраоперационно. Лечение получили 16 больных и все они в настоящее время находятся под наблюдением. Проведенная ангиография показала существенное улучшение состояния сосудов миокарда. Необходимо отметить, что такая терапия может быть применима не только для лечения ишемической болезни сердца миокарда, но и при ишемических заболеваниях конечностей.

В заключение следует отметить, что в настоящий момент генная терапия уже вышла из состояния эйфорических обещаний, идет планомерная работа по разработке векторных систем, в том числе направленных, оптимизируются дозы и применяемые гены и, вероятно, через 5–7 лет ожидания прошлого десятилетия оправдаются.

## Литература

1. Bubenik J., Simova J., Jandlova T. Immunotherapy of cancer using local administration of lymphoid cells transformed by IL-2 cDNA and constitutively producing IL-2 // *Immunol. Lett.* – 1990. – Vol. 23 (4). – P. 287-292.
2. Cavallo F., Giovarelli M., Gulino A. et al. Role of neutrophils and CD4+ T-lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene // *J. Immunol.* – 1992. – Vol. 149. – P. 3627-3635.
3. Colombo M.P., Ferrari G., Stoppacciaro A. et al. Granulocyte colony-stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma in vivo // *J. Exp. Med.* – 1993. – P. 889-897.
4. Colombo M.P. and Forni G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? // *Immunol. Today.* – 1994. – Vol. 15. – P. 48-51.
5. Diaz-Sandoval L.J., Losordo S.W. Gene therapy for cardiovascular angiogenesis // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2003. – Vol. 3 (4). – P. 599-616.
6. Dowdevani A., Huleibel M., Zoller M. et al. Reduced tumorigenicity of fibrosarcomas which constitutively generate IL-1 alpha either spontaneously or following IL-1 alpha gene transfer // *Int. J. Cancer.* – 1992. – Vol. 182. – P. 822-830.
7. Forni G., Parmiani G., Guarini A., Foa R. Gene transfer in tumor therapy // *Ann. Oncol.* – 1994. – Vol. 5. – P. 789-794.
8. Gansbacher B., Bannerji R., Daniels B. et al. Retroviral vector-mediated gamma-interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity // *Cancer Res.* – 1990. – Vol. 50 (24). – P. 7820-7825.
9. Golumbek P.T., Lazenby A.J., Levitsky H.I. et al. Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4 // *Science.* – 1991. – Vol. 254 (5032). – P. 713-716.
10. Hock H., Dorsch M., Kunzendorf U. et al. Mechanism of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon gamma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 2774-2778.
11. Lee C.T., Wu S., Ciernik I.F., Chen H. et al. Genetic immunotherapy of established tumors with adenovirus-murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Human. Gene Ther.* – 1997. – Vol. 8. – P. 187-193.
12. Liu Z.G., Hsu H., Goeddel D.V., Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector function: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death // *Cell.* – 1996. – Vol. 87. – P. 565-576.
13. Lynch D.H., Watson M.L., Alderson M.R. et al. The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is a part of a TNF family gene cluster // *Immunity.* – 1994. – Vol. 1. – P. 131-136.
14. Lynch D. and Miller R. Interleukin 7 promotes long-term in vitro growth of antitumor cytotoxic T lymphocytes with immunotherapeutic efficacy in vivo // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 31-42.
15. Nomura T., Yasuda K., Yamada T. et al. Gene expression and antitumor effects following direct interferon (IFN)-gamma gene transfer with naked plasmid DNA and DC-chol liposome complexes in mice // *Gene Ther.* – 1999. – Vol. 6 (1). – P. 121-129.

16. Qin Z. and Blankenstein T. Tumor growth inhibition mediated by lymphotoxin: evidence of B lymphocyte involvement in the antitumor response // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 4747-4751.
17. Restifo N.P., Spiess P.J., Karp S.T. et al. A nonimmunogenic sarcoma transduced with the cDNA for interferon  $\gamma$  elicits CD8<sup>+</sup> T-cells against the wild-type tumor: Correlation with antigen presentation capability // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 175. – P. 1423-1431.
18. Rosenberg SA, Yanneli J.R., Yang J.C. et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2 // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 1994. – Vol. 86. – P. 1159-1166.
19. Seino KI, Kayagaki N, Okumura K, Yagita H. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand // *Nature Med.* – 1997. – Vol. 3. – P. 165-170.
20. Teng M.N., Park B.N., Koeppen K.W. et al. Long-term inhibition of tumor growth by tumor necrosis factor in the absence of cachexia or T-cell immunity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 3535-3539.
21. Tepper R.I., Pattengale P.K., Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo // *Cell.* – 1989. – Vol. – 57. – P. 503-512.
22. Wang H, Prasad G, Buolamwini J.K., Zhang R. Antisense anticancer oligonucleotide therapeutics // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2001. – Vol. 1 (3). – P. 177-196 (Review).
23. Zhang J.Y. Apoptosis-based anticancer drugs // *Nat.Rev. Drug Discov.* – 2002. – Vol.1 (2). – P. 101-102.
24. Zoller M, Douvdevano A, Segal S, Apte R.N. Interleukin-1 production by transformed fibroblasts. II. Influence on antigen presentation and T-cell-mediated antitumor response // *Int. J. Cancer.* – 1992. – Vol. 50. – P. 450-457.

Поступила в редакцию 05.08.2003 г.