

ВЗЛОМ ПРИРОДЫ

Генная терапия: будущее уже наступило



Автор: Никита Андреевич Катаев,
StatusPraesens (Москва)

В мире медицины нередко происходят **поистине удивительные события**, которые когда-то казались настоящей фантастикой. Один из ярких примеров — эпизод 1963 года, когда новозеландский врач сэр Альберт Уильям Лилей (Albert William Liley) осуществил первое в истории **внутриутробное вмешательство**, проведя **переливание донорской крови** плоду с гемолитической болезнью¹. Этот прорыв положил **начало фетальной хирургии**, которая сегодня охватывает множество операций по борьбе с онкологическими новообразованиями, а также по коррекции пороков сердца, лёгких, мочевых путей и нервной трубки.

Не менее значимым эпизодом стало появление на свет Луизы Джой Браун (Louise Joy Brown) 25 июля 1978 года — первого в мире ребёнка, зачатого с помощью **экстракорпорального оплодотворения**². А ведь это достижение, которое всего лишь несколько десятилетий назад выглядело невозможным, стало частью нашей **повседневной практики**. По оценкам экспертов из разных стран, с момента рождения Луизы количество детей, зачатых с использованием вспомогательных репродуктивных технологий, составляет **от 13 до 17 млн**³.

Что же нас ждёт впереди? Мы живём в эпоху **генной инженерии**. Со всем недавно, в 2023 году, произошло ещё одно значимое событие в медицинской истории: FDA* зарегистрировала **первый препарат** для лечения серповидноклеточной анемии и трансфузионно-зависимой β-талассемии, основанный на **технологии CRISPR/Cas9****. И это лишь небольшой шаг на пути к новым возможностям⁴. В условиях стремительного научного прогресса и разработки инновационных технологий можно ожидать, что генная терапия продолжит эволюционировать, открывая двери к менее инвазивным и **более эффективным методам** лечения.

Ожидания от биоинженерии в медицине, безусловно, грандиозные — это **надежда на победу** не только над генетическими, но и над онкологическими заболеваниями. В частности, на сегодняшний день уже можно отметить несколько успешных разработок в **области акушерства и гинекологии**, таких как лечение эндометриоза, миомы

матки и злокачественных новообразований^{5–8}. Однако большинство из этих достижений по-прежнему остаются в рамках **исследовательских лабораторий**. Технические сложности, связанные с «терапией будущего», в значительной степени известны и **потенциально решаемы** — осталось лишь усовершенствовать используемые методы.

* FDA (Food and drug administration) — Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств.

** CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) — короткие палиндромные повторы ДНК, регулярно расположенные группами. Cas9 (CRISPR associated protein 9) — CRISPR-ассоциированный белок 9.

Этика и генетика

Современные биоинженерные технологии открывают **практически безграничные возможности**. Однако вместе с ними появляются и глубокие **этические дилеммы**, ставящие под вопрос привычные ценности и принципы, а также религиозные убеждения¹⁵. Вопросы редактирования генома человека, создания химер и использования генетически модифицированных организмов становятся центром обсуждений, фактически вызывая **столкновение науки и морали**¹⁶.

Проект «Геном человека» открыл **новые рубежи**, идентифицируя гены, которые могут повлиять на наше поведение и здоровье. Но если новый вид способен на чувства и осмысленные действия, стоит ли ему предоставлять **права, привычные для людей**? Это вызывает серьёзные общественные споры, особенно когда речь идёт о **необходимых эмбрионах**, которые не могут высказывать своё мнение. Среди морально-этических вопросов выделяются также проблемы **доступа к технологиям**. Справедливо ли, что только обеспеченные смогут воспользоваться преимуществами генной инженерии, создавая **неравенство** в здоровье и качестве жизни?¹⁷

Критики также указывают на возможность возникновения новых болезней через **смешение ДНК различных видов**. Опасения касаются не только здоровья, но и воздействия на дикую природу, риска появления новых вирусов или потери генетического разнообразия среди животных. **Трансгенные организмы**, созданные для повышения продуктивности, могут легко стать уязвимыми к инфекциям, представляя **угрозу для всей экосистемы**¹⁸.

Непредсказуемые последствия могут **затмить достижения**, если не относиться к ним с осторожностью. Соблюдение баланса между **научным прогрессом и моральными принципами** остаётся немаловажным фактором, чтобы неожиданно созданные технологии не превратились в опасные инструменты. При этом необходимо разработать общепринятые правила, а также обеспечить научный и социальный контроль.

[Ожидания от биоинженерии в медицине, безусловно, грандиозные — это надежда на победу не только над генетическими, но и над онкологическими заболеваниями. Осталось лишь усовершенствовать методы.]

Генные возможности

Наиболее изученная и широко используемая стратегия генной терапии — **доставка работоспособного гена в клетку**, где он берёт на себя необходимую функцию. Учитывая, что при этом **не удаляют** неисправную копию, такой метод направлен на компенсацию мутаций, связанных с потерей или недостатком определённой функции. Выработка нормального белка, кодируемого добавленной извне последовательностью нуклеотидов, зачастую улучшает состояние больных. Кроме того, терапевтическое воздействие может быть нацелено как на **синтез белка с правильной структурой**,

так и на обеспечение его адекватного количества.

Другой интересный метод — **добавление искусственно синтезированных генов**. В этом случае в организм доставляют не правильную копию локуса для замены существующего дефектного варианта, а **совершенно новую** последовательность нуклеотидов. Такой участок создают рекомбинантным способом, транспортируют в клетки, и на его основе происходит синтез необходимых веществ. Используя эту технологию, можно **перенастроить сигнальные пути**, например, для предотвращения сердечной недостаточности и рака или инициировать производство моноклональных

антител, **нейротрофических факторов**, а также ферментов для лечения неврологических заболеваний, ВИЧ-инфекции, болезней накопления^{9,10}.

Противоположная стратегия основана на **«выключении» патологического гена** и известна как **сайленсинг** (от англ. *silence* — «молчание»). С помощью этого метода блокируют локусы, ответственные за выработку токсичных факторов, что может замедлить прогрессирование заболевания. Стоит отметить, что в целом технология осуществима несколькими способами: торможением экспрессии **на уровне матричных РНК** или разрушением уже образованных молекул¹¹.

Наконец, самый перспективный и точный метод — **редактирование генов** (так называемые генетические «ножницы»)¹². Он стал возможен с появлением инструментов, позволяющих **аккуратнее** работать с нуклеотидными последовательностями ДНК. С его помощью можно «вырезать» участок гена с достаточно **высокой точностью**, а потом заменить его на другой. Такие тонкие манипуляции с геномом открывают перед клиницистами поистине потрясающие возможности!

Вижу цель

Генетическая грамотность становится важной частью современного медицинского подхода. В отличие от традиционных лекарств, внедрение рекомбинантного гена в организм требует более тонкого метода, связанного с выбором **подходящего вида переноса**¹³. Прежде всего необходимо определить, какая именно ткань **станет «мишенью»**. При многих гинекологических заболеваниях необходимо доставить материал не во все клетки организма, а лишь в **определённую их группу**, например, в клетки шейки матки, яичников и эндометрия.

Генные **терапевтические стратегии** можно условно разделить на две крупные категории: *in vivo* и *ex vivo*¹⁴. В первом случае модификации проводят **непосредственно в организме пациента**. Для этого препарат, содержащий нужный участок ДНК, вводят человеку подходящим образом (интратекально, внутривенно и др.), а затем он уже попадает в клетки-мишени. Тем не менее одной из главных проблем техники *in vivo*

остаётся **сложность обеспечения** точной доставки гена в нужное место. В отличие от него, **метод ex vivo** предполагает предварительное извлечение клеток для их дальнейшего модифицирования в лабораторных условиях. После **манипуляций «в пробирке»** клетки возвращают обратно в организм пациента. Для этого подходят преимущественно циркулирующие мишени (например, лимфоциты), а также **плюрипотентные стволовые клетки**, которые обладают высоким потенциалом к долголетию и дифференцировке¹⁹.

Существует также условная классификация объектов генной терапии, включающая две дополнительные группы¹⁹.

- **Работа с зародышевой линией**, куда входят плюрипотентные стволовые клетки взрослого организма, дающие начало гаметам, или коррекция генотипа на стадии раннего эмбриона. Важно понимать, что изменения, произведённые на этом уровне, передаются следующим поколениям, однако разработка таких методов редактирования генома в мире **строго запрещена**.
- **Модификация** соматических клеток, где эффекты терапии ограничены, то есть новые гены **не наследуются**.

Стремление к центру

Для достижения успешного результата лечения крайне важно точно доставить ген в **нужные ткани или клетки**. Эта задача заключается в том, чтобы переместить **требуемый участок ДНК** в «правильное» место, где он сможет активировать синтез необходимых аминокислот. Поэтому создание надёжной и точной **системы доставки** выступает ключевым моментом.

Транспортные структуры, или **векторы**, могут быть разных типов: плазмидные, вирусные или созданные с использованием нанотехнологий, таких как катионные полимеры и липосомы. Механизм таков: интересующую **последовательность нуклеотидов** помещают в одну из перечисленных систем и с её помощью доставляют в клетки для последующего высвобождения. Важно, чтобы вектор был специфичным, то есть **тропным к определённым тканям**. Он должен **биологически безопасно** переносить один или несколько генов



и не вызывать при этом нежелательных реакций, воспалительных процессов и **иммунного ответа** макроорганизма. Из дополнительных характеристик следует отметить безопасность для **окружающей среды и персонала**, а также относительно **лёгкое производство** в больших количествах промышленными методами²⁰.

При транспортировке необходимо, чтобы вектор смог попасть в **ядро клетки**. Один из способов достичь этого — использование **плазмид**, которые представляют собой **кольцевые внехромосомные молекулы ДНК**, способные к саморепликации и экспрессии генов. Несмотря на то что они отсутствуют у человека, искусственно введённые биоинженер-

ные плазмиды могут **некоторое время функционировать** в клетках. Однако они могут неравномерно распределяться между дочерними клетками, особенно в быстро обновляющихся тканях, что снижает пул клеток с необходимыми генами²¹.

Для доставки также могут быть эффективны **вирусные векторы**. Они способны самостоятельно проникать в мишени и встраивать **свою нуклеотидную последовательность** в ДНК, заставляя клетки производить вещества, необходимые для их размножения. **Рекомбинантные агеноассоциированные вирусные векторы (РАВВ)**²² стали основным инструментом для доставки генетической

информации *in vivo*. В процессе их производства удаляют части, отвечающие за синтез вирусных белков, что снижает риск иммунных реакций и токсичности. Кроме того, такой подход **увеличивает «грузоподъёмность»** системы, позволяя добавлять терапевтические гены гораздо больших размеров.

Одно из перспективных направлений РАВВ — подавление ангиогенеза в **эндотелиальных очагах**. В качестве мишеней выступают **гены факторов роста** эндотелия сосудов, пигментного эпителия, фибробластов и тромбоцитов. В настоящее время учёные активно разрабатывают конструкции на основе молекул ДНК и РНК, а также методы их доставки в организм⁵. Кроме того, в рамках другого эксперимента отмечено успешное использование генной терапии с помощью РАВВ для лечения **миомы матки**. Результаты показали, что подавление активности рецепторов эстрогена с помощью доставки в нужные клетки мутантной формы рецептора (DNER) приводит к **снижению пролиферативной активности** клеток и индукции апоптоза⁶.

Ещё один способ переноса генов млекопитающих и человека — использование транспортных систем на основе **ретро- и лентивирусов**. Главным отличием этих платформ от РАВВ выступает то, что их геном обязательно встраивается в ДНК клеток хозяина. Такая интеграция может вызвать нежелательные последствия, например **инсерционный канцерогенез**. Однако современные вирусные векторы обладают значительно большим уровнем безопасности благодаря молекулярным модификациям. Эти изменения снижают риск размножения лентивирусов в клетках и **активации проонкогенов**. А ещё такие транспортные системы могут содержать до **8000 нуклеотидов**, что открывает возможности для коррекции более длинных участков генов²³.

Успех терапии связан как с изучением вирусных векторов, так и с созданием искусственных транспортных систем — физических и химических. Например, технология **липосом** основывается на способности липидов с положительно заряженной головной частью связываться с отрицательными молекулами ДНК или РНК. В результате образуются частицы, которые могут попадать в клетки с помощью эндоцитоза. Аналогично действуют **поликатионы**, создавая наночастицы

[Для достижения успешного результата в биоинженерии крайне важно точно переместить ген в нужные ткани или клетки. Поэтому создание надёжной и точной системы доставки выступает ключевым моментом.]

Скандалная генетика

В ноябре 2018 года прогремела сенсационная новость: китайский биофизик **Хэ Цзянькуй** (He Jiankui) провёл **коррекцию гена CCR5 у эмбрионов**, чтобы обеспечить им устойчивость к ВИЧ²⁴. В результате эксперимента **родились девочки-близнецы**, получившие псевдонимы Лулу и Нана. Хэ также упомянул, что работал с эмбрионами семи пар, в которых отцы были ВИЧ-положительными²⁵.

Однако его заявление вызвало бурные **дискуссии в научном сообществе**. На Втором Международном саммите по редактированию генома человека (International summit on human gene editing, 2018)²⁶ многие исследователи **жёстко осудили действия** своего коллеги из-за отсутствия предварительных клинических испытаний и независимых подтверждений²⁷. К тому же изменения в геноме не соответствовали задуманному. У одной из подопытных девочек **мутация прошла лишь частично**, оставляя учёных в неведении о возможных последствиях для её жизни. На самом высоком уровне эксперименты Хэ были названы **этически безответственными**.

В результате публичного осуждения и последующего ареста в 2019 году Хэ и двух его коллег приговорили к **3 годам тюремного заключения** и значительным штрафам порядка **3 млн юаней** (более 30 млн рублей)²⁸. В апреле 2022 года Хэ вышел на свободу, вернувшись к научной деятельности с **новыми целями**. Теперь он намерен направить технологии редактирования генома на лечение **наследственных заболеваний**, таких как мышечная дистрофия Дюшенна и болезнь Альцгеймера, от которой страдает его мать. Хэ осознал, что в своих исследованиях важно соблюдать **этические и юридические нормы**, поэтому он планирует проверять свои методы на модельных системах, таких как грызуны, приматы и «нежизнеспособные человеческие эмбрионы»²⁹. Кроме того, Хэ выражает надежду, что в будущем такие технологии, как CRISPR/Cas9, станут столь же **нормированными**, как вакцинация и экстракорпоральное оплодотворение³⁰.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ РЕВОЛЮЦИЯ



РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9



Мутации, ответственные за наследственные заболевания, хорошо известны: благодаря исследовательским методам можно **заглянуть внутрь** клетки и ядра, «дойти» **до нуклеотидов** и увидеть, где конкретно произошла «поломка». Однако теперь возможно **не только** выявить изменения генетического кода...



...но и исправить его «опечатки» **прямо в клетке**. Прорывом в генетической терапии стала система **CRISPR/Cas9** — она состоит из двух функциональных элементов: направляющей РНК и эндонуклеазы Cas9. Именно этот комплекс называют **«генетическими ножницами»**.

Направляющая РНК «программирует» эндонуклеазу на специфический фрагмент нуклеотидной последовательности — **Cas9 «вырезает» неправильный ген**, не затронув соседние участки. После этого, используя дополнительные инструменты, можно вставить в клетку новый, функциональный ген.

Вывод: Уже существует вполне **практическая** возможность очень точно менять **последовательность нуклеотидов** в ДНК. Внедрение «генетических ножниц» в широкую клиническую практику — вопрос ближайшего будущего!

Из грязи в князи

Первый локус CRISPR был обнаружен у *Escherichia coli* в 1987 году японскими учёными, которые заметили в её геноме **регулярно расположенные элементы** (спейсеры), разделённые неповторяющимися последовательностями³³. Впрочем, исследователи не придали своему наблюдению серьёзного значения.

Масштабное изучение CRISPR начал испанский молекулярный биолог, микробиолог и биохимик Франсиско Хуан Мартинес Мохики (Francisco Juan Martínez Mojica). В 1993 году, исследуя архейные организмы вида *Haloferox mediterranei*, обитающие в солёной воде, он наткнулся на необычные **палиндромные последовательности** в их геноме. Эти фрагменты длиной около 30 нуклеотидов повторялись несколько раз и отделялись друг от друга уникальными участками ДНК примерно такой же длины³⁵. Мохики продолжал изучать эти последовательности на протяжении 1990-х годов и в 2000 году объявил, что ранее разрозненные повторы **имеют общие характеристики**. В итоге он ввёл термин **clustered regularly interspaced short palindromic repeats** (CRISPR), что переводится как «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами». В 2003 году он попытался опубликовать первую статью, в которой предположил, что CRISPR — **врождённая иммунная система прокариот**. Однако его научный труд был отклонён рядом авторитетных журналов, включая Nature, прежде чем был принят в Journal of Molecular Evolution только в феврале 2005 года³⁶.

Следующий шаг в изучении этой технологии сделал французский микробиолог Филипп Хорват (Philippe Horvath). В своей работе он исследовал молочнокислые бактерии, где столкнулся с проблемой **бактериофагов**, наносящих вред заквасочным культурам. Хорват искал способы сделать закваски устойчивыми к бактериофагам и, наткнувшись на исследования CRISPR, доказал, что устойчивые к вирусам бактерии **перенимают часть их ДНК**. Благодаря его исследованиям впоследствии была разработана классификация известных CRISPR³⁷ и предложен возможный **механизм действия адаптивного иммунитета** на основе CRISPR³⁸.

В то же время была выявлена ключевая роль **белок-кодирующих генов Cas**³⁹, которые были описаны немного ранее⁴⁰. Суть процесса заключается в следующем: участки ДНК бактериофагов сохраняются в ДНК бактерий в виде CRISPR-массивов, которые затем преобразуются в РНК. В этом же геномном участке у бактерий кодируется **тракр-РНК** (tracrRNA). Вместе они формируют наводящую РНК (guideRNA), которая затем соединяется с нуклеазой Cas9, которая точно наводится на определённый фрагмент ДНК бактериофага, связывается с ним и разрезает, **словно «ножницами»**, нарушая размножение вируса.

В последующие годы множество учёных изучали данную тему, но отдельного внимания заслуживают французский микробиолог Эмманюэль Мари Шарпантье (Emmanuelle Marie Charpentier) и американский биохимик и генетик Дженнифер Энн Даудна (Jennifer Anne Doudna). В своей работе они показали, что CRISPR/Cas9 способен «разрезать» любую молекулу ДНК в заранее определённом локусе, который потом можно «отредактировать». Следовательно, **преобразование кода жизни** стало реальностью. Спустя 8 лет за эту технологию учёные Шарпантье и Даудна получили **Нобелевскую премию** по химии 2020 года⁴¹.

[На основе природного механизма учёные смогли разработать технологию, способную инактивировать нужные участки генома. Метод быстро набрал популярность и получил название «генетические ножницы».]

с плазмидной ДНК, которая затем высвобождается в нужном месте³¹.

Стоит упомянуть и методы, которые не изменяют структуру ДНК в клетках, но влияют на считывание уже имеющейся информации. Речь идёт о малой интерферирующей РНК и **антисмысловых олигонуклеотидах**. Оба этих типа молекул представляют собой короткие цепи длиной от 16 до 25 нуклеотидов. Несмотря на различие в механизмах действия, их цель остаётся общей — модифицировать функционирование патологических генов³².

«Генетические ножницы»

С 2010-х годов учёные постепенно овладели способом, который позволяет изменять последовательность практически на **любом участке молекулы ДНК** с точностью до пары нуклеотидов. Интересно, что сам механизм был заимствован у *Escherichia coli*, в геноме которой идентифицировали области с неизвестной функцией³³. В процессе изучения оказалось, что это весьма **оригинальная система** защиты бактерий от угрожающих им фагов и плазмид.

Когда в клетку **впервые попадает** чужой генетический материал, специальные ферменты, известные как нуклеазы (Cas), разрезают его на кусочки и разрывают ДНК хозяина в **нужных местах** — для погружения в собственный генетический код клетки привнесённых агрессором нуклеотидов. После этого происходит сшивание молекулы ДНК в **единую структуру**. Если в следующий раз бактерии попадается тот же «враг» — эта конкретная клетка уже готова к борьбе с непрошеным агентом: она быстро распознаёт и уничтожает «знакомые» нуклеиновые кислоты.

На основе изученного природного механизма учёные разработали технологию **CRISPR/Cas9**. Она выполняет аналогичную операцию для любых клеток (в том числе человека), а сам подход быстро стал **наиболее популярным** инструментом редактирования³⁴. Система способна инактивировать нужные участки. При этом она гораздо проще, а **главное — надёжнее**, чем существовавшие ранее методы¹⁹.

Важно отметить, что молекула ДНК крайне чувствительна к повреждениям. При возникновении разрывов клетка запускает механизм восстановления, который может происходить двумя путями⁴².

- **Негомологичный вариант** — место разрыва восстанавливается с «ошибками». В результате возможны небольшие вставки или **утраты фрагментов**. Генетический код состоит из триплетов, где каждые три нуклеотида кодируют одну аминокислоту. Если удалить два или добавить четыре нуклеотида, может возникнуть нарушение последовательности, что ведёт к сдвигу рамки считывания. В таком случае происходит так называемый **«снокаут гена»**, то есть этот участок теряет способность выполнять свою функцию, поскольку клетка не сможет использовать информацию для синтеза функционального белка.

- **Гомологичная рекомбинация**. В клетках животных присутствуют минимум две копии каждой хромосомы. При разрыве клетка имеет возможность **задействовать вторую хромосому** для восстановления нужного участка, копируя его в повреждённую хромосому. В этой ситуации возможно «обмануть» клетку, предоставив ей вместо второй хромосомы **схожий фрагмент ДНК с мутацией**. В результате клетка сможет восстановить разрыв, интегрировав именно предложенный участок. Обычно гомологичная рекомбинация в клетке протекает редко, но использование CRISPR/Cas9 позволяет **увеличить вероятность** её проведения в несколько раз⁴³.

Таким образом, использование технологии CRISPR/Cas9 способно эффективно **корректировать повреждённые гены**, в том числе участвующие в канцерогенезе. Доклинические исследования показывают, что возможно исправление **онкогенных мутаций**, а также увеличение чувствительности опухолей к существующим методам терапии^{7,8}. Также следует отметить, что редактирование генома способно преодолеть ограничения традиционных методов лечения, такие как **химиорезистентность** и рецидивы новообразований.

Однако, несмотря на значительные успехи в понимании работы системы

[Для полноценного внедрения CRISPR/Cas9 в клиническую практику необходимо минимизировать риск побочных реакций и разработать новые эффективные подходы для доставки компонентов в целевые ткани.]



© Olga Borzhuk / Komexupr/Stock

CRISPR/Cas9, сохраняются **опасения** относительно нецелевых эффектов: в ряде случаев инструмент всё же разрезает ДНК в **ненужных местах**, а также незапланированно действует на РНК^{44,45}. Ещё одно ограничение состоит в том, что CRISPR/Cas9 **только «расщепляет» ДНК**, а доставку гена для интеграции всё равно осуществляет вирусная платформа, то есть не исключены осложнения, обусловленные этим вектором. Кроме того, исследователи озабочены **иммуногенностью** нуклеазы Cas9, относящейся к бактериальным белкам⁴⁶. Наконец, ещё одна проблема, которая пока не до конца решена: в процессе редактирования при повреждении ДНК происходит **транзиторная остановка** клеточного цикла, что негативно влияет на любые ткани, особенно на плюрипотентные стволовые клетки⁴⁷.

Поэтому для внедрения CRISPR/Cas9 в клиническую практику необходимо **оптимизировать процесс** редактирования в клетки-мишени *in vivo*,

минимизировать риск побочных реакций и разработать новые эффективные подходы для доставки компонентов в целевые ткани.



Неизвестно, что ждёт нас в будущем, но, безусловно, терапевтические **инновации** уже сегодня **перепишивают правила игры**. Опыт прошлого вдохновляет на смелые шаги вперёд, заставляя задуматься о том, **как далеко может зайти медицина**. Гены перестали быть лишь материалом для исследований и превратились в прямой инструмент лечения, что ставит перед обществом множество этических и практических вопросов. А значит, редактирование генома ждёт непременно своего часа в обыденной клинической практике, **меняя мир** задолго до того, как мы сможем это осознать. **SP**

Библиографию см. на с. 82–86.