



Лаборатория технологий клеточной и генной терапии

Заведующий д.м.н., профессор **Макеев О.Г.**

Макеев О.Г.

Принципы генно-клеточной терапии социально-значимых заболеваний

В настоящее время основной причиной смерти населения в развитых странах являются сердечно-сосудистые, онкологические заболевания и болезни обмена веществ. При этом решить эту проблему, несмотря на успехи фармакологии, не удастся, так как возникновение и развитие данных заболеваний генетически детерминировано.

Альтернативный подход предусматривает смену прежней парадигмы, основанной на применении средств, воздействующих исключительно на фенотипические проявления патологии. Новая парадигма направлена на разработку путей коррекции эволюционно сформированных генетических особенностей человека, то есть на патогенетическую терапию таких болезней.

Принцип реализации технологии генной терапии предусматривает применение генных конструкций, замкнутых в кольцо – плазмид, включающих последовательность ДНК, соответствующую полезному гену (например, гену фактора роста сосудов), и вспомогательные участки ДНК, обеспечивающие функционирование гена в клетке – интеграцию в клеточный геном и образование кодируемого геном белка (например, фактора роста сосудов). Последний, постоянно выделяясь из клетки в околочелюточную среду, изнутри стимулирует рост соответствующей ткани (например, образование новых микрососудов). Стабильный синтез таких продуктов обеспечивает их постоянный эффект (в отличие от вводимых извне белков, разрушаемых околочелюточными ферментами в течение минут-часов).

Исследования по данной тематике ведутся в нашей лаборатории с 2007 г. Новый импульс развитие этого направления получило благодаря трансферу из США безопасных и эффективных плазмид, полученных в рамках контрактов, заключенных с 17 ведущими научными центрами США и Европы. В настоящее время исследования находятся на разных этапах вы-

полнения доклинических и клинических испытаний.

Геномные технологии включены в перечень критических технологий Российской Федерации и являются предметом государственного регулирования в рамках Федеральных законов: ФЗ-86 от 05.07.1996 в редакции ФЗ-96 от 12.07.2000 с изменениями от 29.09.2010.

Согласно установленному порядку деятельность по изменению генетического материала человека для генной терапии в целях лечения заболеваний относится к замкнутой системе с низшим уровнем риска и не требует отдельного лицензирования.

Проблема, решение которой предусматривает данное направление

По данным ВОЗ, основными причинами смертности населения являются сосудистые (в мире – 58%, в РФ – 55,6%) и онкологические (17%, в РФ – 13,9%) заболевания, а также болезни, связанные с обменными нарушениями и, прежде всего, сахарный диабет. Последний вносит в показатели смертности как самостоятельный вклад, так и опосредованный, выступая в качестве усугубляющего фактора в отношении течения многих других заболеваний (Рис. 1).

Особую актуальность разрабатываемому направлению придает то, что бесспорные достижения современной медицины в лечении многих заболеваний не сопровождаются сколько-нибудь значимым снижением заболеваемости и смертности от означенных патологий. Напротив, если смертность от сердечно-сосудистых заболеваний за последние 30 лет в России остается на стабильно высоком уровне (колебания показателя не превышают 5% в год), то ежегодный рост онкозаболеваемости составляет около 2% в год, что за последнее десятилетие привело к увеличению числа онкобольных на 25,5% с соответствующим повышением показателя смертности. В свою очередь, число больных сахарным диабетом в мире увеличивается на 7 млн. человек в год, а в России – на 500–600 тыс., охватывая около 5% населения. При этом в нашей стране 12–13% жителей уже имеют нарушения углеводного обмена, в той или иной степени связанные с изменением толерантности к глюкозе и инсулинорезистентностью.

Для определения направлений поиска и разработки новых эффективных способов терапии социально-значимых заболеваний важно понимать того, что их объединяет общая причина.

Так, установлено, что в тканях, регенерация которых осуществляется не посредством клеточного деления, а за счет внутриклеточной регенерации (миокард, головной и спинной мозг), полное обновление микрососудистого русла реализуется замедленно – за 4–7 лет, а более чем у 70% людей генетически детерминировано отсутствие такой реакции на гипоксию, как новообразование кровеносных сосудов. Данный эволюционно закрепленный дефект обуславливает то, что периодически возникающие в сердце и мозге зоны ишемии компенсируются исключительно за счет кратковременного

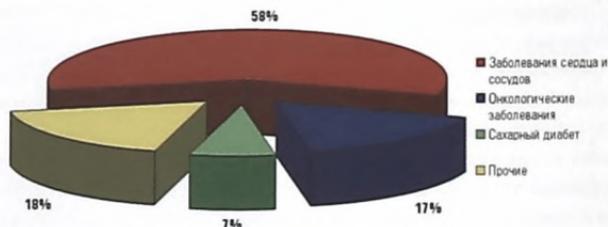


Рисунок 1. Причины смертности населения от болезней по данным ВОЗ в среднем за последние 10 лет.

усиления кровотока (срочная адаптация), но не посредством образования новых микрососудов (долговременная адаптация). Это со всей неизбежностью сопровождается расширением зон ишемии с повреждением клеток и развитием инфарктов и инсультов.

В свою очередь, основу поступательного развития канцерогенеза составляет низкая иммуногенность опухолевых клеток, препятствующая их распознаванию иммунной системой. Последняя также обусловлена генетически детерминированной сохранностью генов главного комплекса гистосовместимости у онкотрансформированных клеток, несмотря на значительное искажение их генетического профиля в других участках генома.

Возникновение сахарного диабета и инсулинорезистентности также эволюционно закреплено. Так, гормон-обусловленный выброс глюкозы и/или повышение ее концентрации в крови вызывают такие гормоны, как адреналин, норадреналин, соматотропный гормон, гормоны щитовидной железы, глюкагон, стероиды, нейромедиаторы и некоторые релизинг-факторы. Снижение уровня глюкозы обеспечивает только один сложномолекулярный гормон – инсулин, синтез и функциональная активность которого могут быть нарушены вследствие многих причин. Такая эволюционно закрепленная асимметрия связана с превалирующей востребованностью состояния гипергликемии в качестве жизнеспасающей реакции у млекопитающих (физические нагрузки, встречная агрессия и др.). В свою очередь, инсулин-чувствительные рецепторы кодируются в области генома с большим генетическим полиморфизмом (изменчивостью) по сравнению с константными участками ДНК, кодирующими последовательность других фенотипически значимых белков. Вариативность структуры инсулин-чувствительных рецепторов формирует приобретаемую невосприимчивость различных клеток к эндогенному инсулину, верифицируемую как инсулинорезистентность.

Стабильно высокая концентрация глюкозы в крови сопровождается проявлением ее «джокерной» роли с прямым повреждением чувствительных

нервных окончаний, нарушением эффективной передачи сигнала и снижением нейротрофической функции. При этом нарушение нервной трофики, наряду с диабетической ангиопатией, приводит к развитию основного инвалидизирующего осложнения диабета – нейротрофическим язвам нижних конечностей, развивающимся в течении жизни у 25% больных.

Изложенное обуславливает необходимость принятия новой парадигмы, направленной на разработку средств коррекции эволюционно сформированных генетических особенностей человека, то есть на патогенетическую терапию таких дефектов.

Принцип реализации технологии генной терапии предусматривает применение генных плазмид, представляющих собой генную конструкцию из полезного гена (например, гена фактора роста сосудов или гена главного комплекса гистосовместимости или гена рецептора к инсулину) и вспомогательных участков, обеспечивающих экспрессию гена в клетке (Рис. 2).

Аналог вводимого гена имеется в геноме клетки, но он неактивен, а вызывать его избирательную активацию (экспрессию), не затронув другие гены, невозможно без фатальных последствий для клетки. Введение плазмиды сопровождается образованием кодируемого геном продукта (например, фактора роста сосудов), который, постоянно выделяясь из клеток в околоклеточную среду, стимулирует рост соответствующих тканей (например, капилляров). Стабильный синтез таких продуктов (цитокинов) обеспечивает их постоянный эффект (в отличие от экзогенных факторов роста, разрушающихся околоклеточными ферментами в течение минут-часов).

В сердце и центральной нервной системе медленный рост и обновление микрососудистого русла генетически детерминированы и мало поддаются коррекции консервативными методами. Поэтому с целью восстановления перфузии органов и тканей применяются хирургические подходы, такие как ангиопластика, шунтирование, стентирование и т.п. Однако в отношении их применения существует целый ряд противопоказаний, а достигаемый результат не всегда продолжителен.

Альтернативой считается введение факторов роста белковой природы, стимулирующих новообразование сосудов в поврежденных тканях *de novo*. Проведенные клинические испытания показали низкую эффективность таких факторов ввиду их быстрого распада и элиминации из организма пациента.

Разрабатываемый нами препарат направлен на создание средства, способного эффективно инициировать неоангиогенез в зоне ишемии миокарда, и на модели лабораторных животных показал способность восстанавливать сократительную функцию миокарда и снижать риск развития повторных ишемических инфарктов миокарда.

Разрабатываемый препарат содержит не менее 90% ДНК специфическо-



Рисунок 2. Схема плазмиды с встроенным полезным геном

го действующего начала (плазмиды, кодирующие факторы роста сосудов) от общего количества ДНК.

Препарат не имеет в своем составе инфекционных агентов или их компонентов, а также веществ, способных вызвать злокачественную трансформацию клеток.

В настоящее время проводятся клинические испытания различных препаратов – как собственно факторов, стимулирующих неоангиогенез, так и генных конструкторов, обеспечивающих синтез факторов роста. Полученные результаты неоднозначны. Так, например, препарат «Неоваскулин», зарегистрированный ОАО «Институт стволовых клеток человека», позволяет улучшить гемодинамику у пациентов, однако эффект у 40–50% пациентов оценивается от «умеренного» до «минимального».

Сходные результаты получены исследовательскими группами из Института биологии гена РАН, NHLBI USA, Whitehead Institute for Biomedical Research, USA.

Причина невысокого клинического эффекта заключается в том, что белок, кодируемый геном VEGF165, не является единственно необходимым для развития и поддержания процесса неоангиогенеза.

Нами одновременно используется несколько генов, контролирующих различные этапы неоангиогенеза, что в экспериментальных условиях уже позволило получить результаты, превосходящие таковые у отечественных и зарубежных аналогов.

По результатам доклинических испытаний нами получен Патент №2444378 «Способ лечения коронарной недостаточности при моделируе-

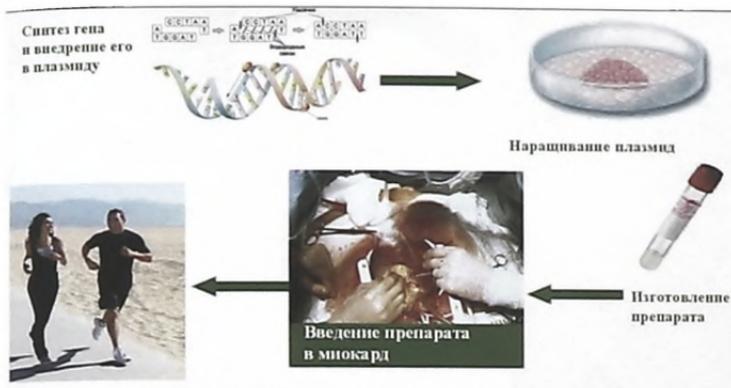


Рисунок 3. Схема реализации способа терапии коронарной недостаточности

мой ишемии миокарда». Кроме того, проект вошел в четыре лучших инновационных проекта Российской Федерации (по президентской программе «Зворыкинская премия», Сколково), стал лучшим медицинским проектом России в 2010 году в номинации «Инновационная идея» и был удостоен Золотой медали и диплома центральной Российской биотехнологической выставки «РосБиоТех 2011» (Экспоцентр, Москва).

Следующей проблемой является создание противоопухолевой вакцины как средства лечения онкологических заболеваний.

Угнетение иммунной системы, ответственной за противораковый иммунитет, рассматриваемое в настоящее время в качестве основной причины развития онкопатологии, еще более усугубляется применением известных методов терапии опухолевых заболеваний, основанных на подавлении роста быстро пролиферирующих, в том числе иммунных клеток.

Альтернативный подход к лечению онкопатологии – преодоление феномена иммунологической толерантности злокачественных опухолей. Разрабатываемая технология позволит решить эту задачу.

Придание клеткам опухоли дополнительных иммуногенных свойств и сокультивирование их с иммунокомпетентными клетками организма предполагает возникновение у последних антиканцерогенных свойств, в результате чего сам организм при трансплантации данных клеток атакует опухоль.

Терапевтическая вакцина должна обеспечивать достоверное повышение средней продолжительности жизни пациентов с клинически подтвержденными злокачественными новообразованиями и выраженным метастазированием, в течение 3-х летнего периода не менее, чем на 35% по сравнению с существующими методами лечения.

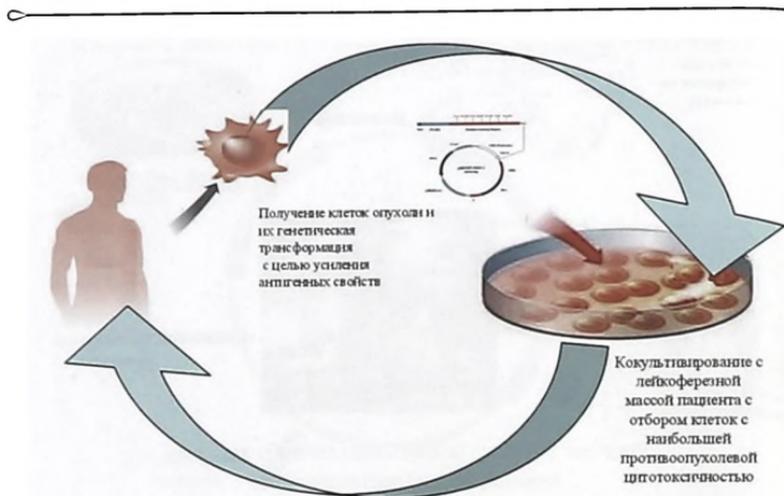


Рисунок 4. Этапы технологии получения противоопухолевой вакцины

В настоящее время за рубежом этап клинических испытаний проходят технологически сходные разработки. В частности, в настоящее время FDA (США) разрешен к ограниченному применению в ходе IV стадии клинических испытаний препарат PROVENGE[®] (Sipuleucel-T), производства Dendreon, USA. В ходе этих испытаний клиническая эффективность остается невысокой (в среднем у 8% пациентов наблюдается полная регрессия опухоли, а у 10% – частичная регрессия). У 2–5% отмечается развитие аутоиммунных заболеваний в связи с перекрестным иммунитетом к антигенам нормальной ткани. Разрабатываемая технология будет лишена подобных недостатков, так как клетки опухоли пациента, перед их культивированием с лейкоцитарной массой, подвергаются генетической модификации, повышающей как «аффинность», так и «селективность» образующихся клеток-киллеров.

Место проведения – NCI, Bethesda, MD USA. Рентгенограммы молочной железы в двух проекциях до начала лечения противоопухолевой вакциной и через 6 месяцев после курса терапии

Предварительные наработки запатентованы: Патент РФ №2287336 «Способ лечения онкологических больных», а система контроля безопасности трансфекции культивируемых клеток генами, разработанная для выполнения темы, удостоена Золотой медали на Международной выставке инноваций (Женева, Швейцария, 2011).

На рисунке 5 представлены результаты pilot trial практического применения заявляемой технологии.

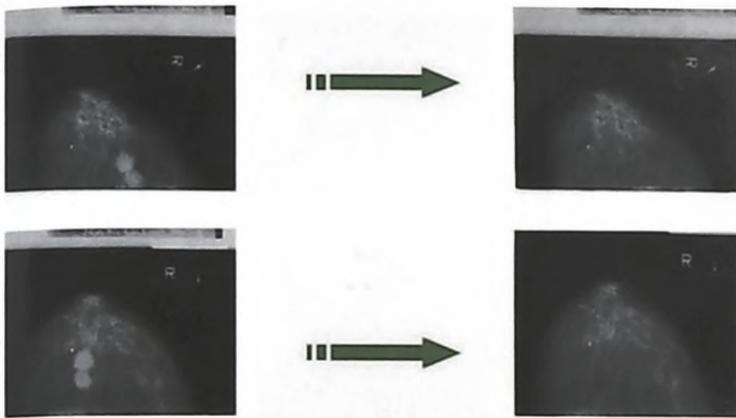


Рисунок 5. Вариант практического использования заявляемой технологии. Больная К., 56 лет, Екатеринбург, РФ.

Разработка генно-клеточной терапии сахарного диабета

Сахарный диабет представляет собой серьезную медико-социальную проблему, что обусловлено его высокой распространенностью, сохраняющейся тенденцией к росту числа больных, хроническим течением, определяющим кумулятивный характер заболевания, высокой инвалидизацией больных и необходимостью создания системы специализированной помощи. Сахарный диабет (СД) занимает третье место среди непосредственных причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, поэтому решение вопросов, связанных с проблемой сахарного диабета, поставлено во многих странах на государственный уровень. По определению экспертов ВОЗ, «сахарный диабет является проблемой всех возрастов и всех стран». При этом в структуре заболеваемости доминирует сахарный диабет II типа, составляя 80–90% от всей популяции больных, страдающих данным заболеванием.

Развитие сахарного диабета II типа в большинстве случаев связано с утратой чувствительности рецепторов к инсулину. Разрабатываемый препарат восстанавливает чувствительность клеток к инсулину.

Основу составляет применение генной плазмиды, кодирующей белок, ответственный за восстановление чувствительности к инсулину.

В настоящее время известен целый ряд препаратов, позволяющих снизить уровень глюкозы в крови.

Однако, в ходе крупнейшего пятилетнего мультицентрового исследования ADOPT [Giancarlo Viberti, Steven E. Kahn, Douglas A. Greene, et all A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT) An international multicenter study of the comparative efficacy of rosiglitazone, glyburide, and metformin in recently diagnosed type 2 diabetes//Diabetes Care October 2002 vol. 25 no. 10 1737-1743] оказалось, что данные препараты (росиглитазон, глибенкламид, метформин) обеспечива-

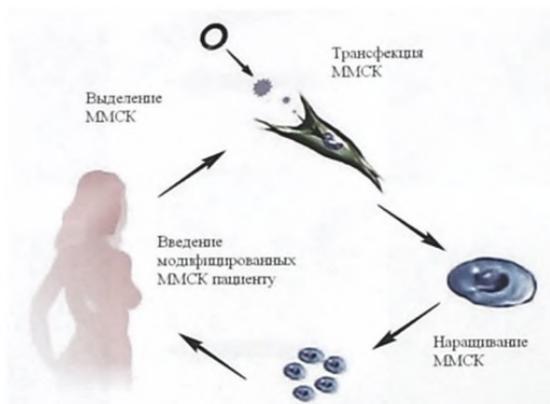


Рисунок 6. Этапы создания препарата для лечения сахарного диабета

ют успешный целевой контроль СД 2 типа, по уровню HbA_{1c}, только на протяжении незначительного времени (3–5 лет), подавляя при этом секреторную активность β -клеток и их чувствительность к глюкозному стимулу. Следует подчеркнуть, что именно этот дефект рассматривается в качестве ключевой причины прогрессирования СД 2 типа и усиления гипергликемии на фоне терапии данными препаратами. В ходе исследования был сделан вывод, что возможность обеспечения долгосрочного контроля уровня глюкозы в крови на должном уровне ограничена, и поставлена задача поиска новых подходов к терапии.

Разработка способа терапии нейротрофических язв нижних конечностей при сахарном диабете

Основным инвалидирующим осложнением сахарного диабета в настоящее время является развитие нейротрофических язв нижних конечностей вследствие поражения сосудов и нарушения нервной трофики. В этих условиях для повышения жизнеспособности клеток нами применяется их предварительная трансфекция плазмидами, несущими ген теломеразы.

В части терапии нейротрофических язв нижних конечностей начаты клинические испытания, показавшие результат, превосходящий зарубежные аналоги (Рис. 7).

В результате данных исследований получены патенты РФ №2401114 «Способ лечения и профилактики осложнений у больных сахарным диабетом второго типа» и №2446811 «Способ лечения нейротрофических язв конечностей».

Проект удостоен Золотой медали и диплома центральной Российской биотехнологической выставки «РосБиоТех 2011» (Экспоцентр, Москва).



Рисунок 7. Результаты применения технологии для лечения нейротрофических язв

Литература

1. Герасимов М.Ю., Зверева А.Е. «Культивирование клеток роговицы человека на поверхности силикон-гидрогелевых контактных линз» // Тезисы Международной научной школы для молодежи «Инновационные технологии в здравоохранении: молекулярная медицина, клеточная терапия, трансплантология, реаниматология, нанотехнологии» – Екатеринбург, 2009. – С. 61-62.
2. Герасимов М.Ю., Зверева А.Е., Рахматуллин Р.Р., Князева Е.С., Макеев О.Г., Коротких С.А. Новые биотехнологические подходы к получению тканеинженерной конструкции эпителия роговицы. // Цитология, 2011, Том 53, №9, С. 729-730.
3. Герасимов М.Ю., Зверева А.Е., Рахматуллин Р.Р., Князева Е.С., Макеев О.Г., Коротких С.А. Новые биотехнологические подходы к получению тканеинженерной конструкции эпителия роговицы. // Цитология, 2011, Том 53, № 9, С. 729-730.
4. Герасимов М.Ю., Коротких С.А., Князева Е.С. «Способ биопсии роговицы». Патент РФ № 2428959.
5. Коротких С.А., Макеев О.Г., Герасимов М.Ю., Шамкин А.С., Зверева А.Е., Коротких В.С. Сравнительный опыт применения силикон-гидрогелевых линз у пациентов после эксимерлазерной коррекции методом LASEK // Сборник научных трудов научной-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием «Восток-Запад». – Уфа, 2011. – С. 81-83.
6. Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И., Измайлов И.Х., Медведева С.Ю., Костокова С.В., Куликов Е.С., Ястребов А.П. Перспективы применения аутогенных клеток для коррекции возрастных изменений кожи. // Вестник УГМА, 2006, № 15. С. 22-38
7. Макеев О.Г., Коротких С.А., Князева Е.С., Герасимов М.Ю., Зверева А.Е. «Применение мягких контактных линз для создания тканеинженерной конструкции роговицы человека» // Материалы Всероссийской научной школы-конференции для молодежи "Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования" – Москва, 2009. – С. 17.
8. Макеев О.Г., Коротких С.А., Рахматуллин Р.Р., Бурулцкая О.И., Зверева А.Е., Герасимов М.Ю. Перспективная биосовместимая матрица для создания тканеинженерной конструкции эпителия роговицы человека. // Врач, 2011, №14, С. 25-27.
9. Макеев О. Г., Коротких С. А., Рахматуллин Р. Р., Бурулцкая О. И., Зверева А. Е., Герасимов М.Ю. Перспективная биосовместимая матрица для создания тканеинженерной конструк-

щи эпителия роговицы человека. // Врач, 2011, №14, С. 25-27.

10. Макеев О. Г., Коротких С. А., Рахматуллин Р. Р., Князева Е. С., Герасимов М. Ю., Зверева А. Е. Новые технологии создания тканеинженерных конструкций эпителия роговицы. // Материалы I Международной научно-практической конференции "Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий" – Екатеринбург, 2011. – С. 174 - 176.

11. Макеев О.Г., Пономарев А.И., Коротков А.В. Применение клатратобразующего газа для криоконсервации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. // Вестник уральской медицинской академической науки, 2010, №1, С. 3-6.

12. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Измайлов И.Х., Медведева С.Ю., Костюкова С.В., Буханцев В.А., Куликов Е.С., Ястребов А.П. Коррекция изменений кожи лица с использованием аутогенных дермальных клеток. // Госпитальный вестник, 2006. №2. С. 2-11.

13. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г. Использование аутологичных культивируемых дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. // Вестник эстетической медицины, 2008. №2. С. 4-19

14. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г. Отчет о трехлетних испытаниях аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2008 №4. С. 63-70

15. Способ получения культуры клеток кожи. Патент РФ №2345781. Бюл. изобр. РФ №4, 10.02.2009. Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И.

16. Makeev O.G., Koroťkih S.A., Knyazeva E.S., Gerasimov M.Y., Zvereva A.E. "Cultivation of human cornea cells on the surface of siloxan-gidrogel contact lenses". World Ophthalmology Congress 2010 (WOC*2010). – Berlin, Germany, 2010. E-poster P-SU-181.