



ГЕННАЯ

ТЕРАПИЯ

# ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ГЕНОТЕРАПИИ

- Начало XX века – возникновение учения негативной евгеники;
- 20-е годы XX века – обнаружена зависимость степени проявления действия гена от влияния внешней среды или генотипа; Н.К. Кольцов разрабатывает новое направление – евфеника;
- 1934 г. – С.Н. Давиденков выявил гетерогенность наследственных заболеваний, т.е. одно и то же фенотипическое проявление болезни может быть обусловлено мутациями в разных генах или разными мутациями внутри одного гена;
- Годы после Второй мировой войны – дальнейшее развитие генетики, молекулярной биологии;
- 1980 г. – генетические опыты со стволовыми клетками крови на лабораторных животных;
- 1989 г. – первые опыты по генной терапии рака;
- **1995 г.** – первый случай излечения наследственной болезни (недостаточность аденозиндезаминазы) методами генной терапии

# НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

обусловлены нарушениями в процессах хранения, передачи и реализации генетической информации

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

### ГЕННЫЕ

### ХРОМОСОМНЫЕ

#### МОНОГЕННЫЕ

#### ПОЛИГЕННЫЕ

#### МУЛЬТИ ФАКТОРИАЛ Ь - НЫЕ

#### ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛА ХРОМОСОМ

А - ДОМИНИРУЮЩИЕ

А - РЕЦЕССИВНЫЕ

X - СЦЕПЛЕННЫЕ

Y - СЦЕПЛЕННЫЕ

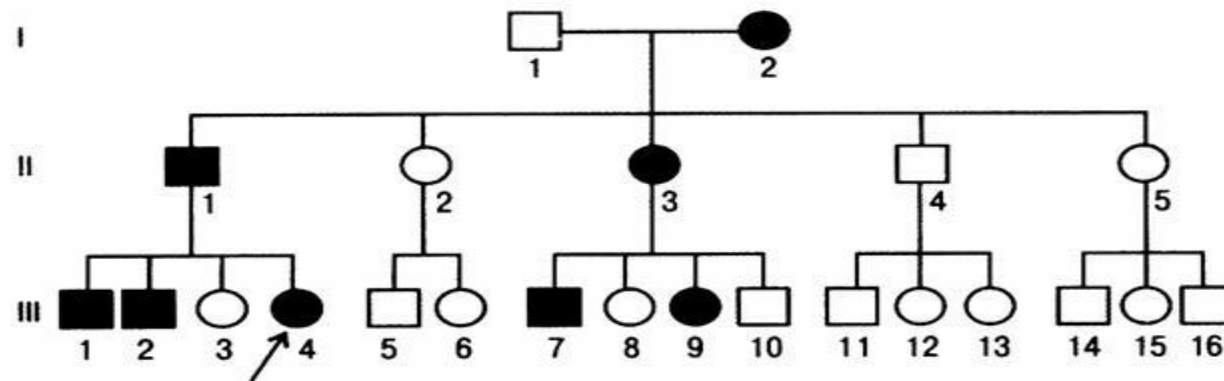
МОНОСОМИЯ

ТРИСОМИЯ

ХРОМОСОМНЫЕ  
ПЕРЕСТРОЙКИ

# ТИПЫ НАСЛЕДОВАНИЯ

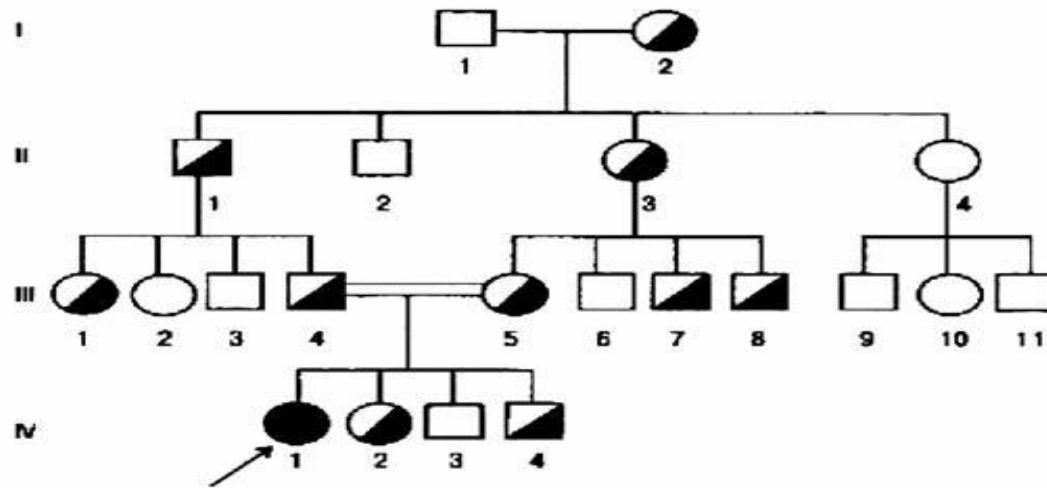
## аутосомно-доминантное



- Болезнь в каждом поколении
- Оба пола поражаются одинаково
- Болезнь у гомозигот протекает тяжелее, чем у гетерозигот
- Вероятность рождения больного ребенка, если болен один из родителей, равна 50%

**Болезнь Хантингтона, полидактилия, витилиго, рак молочной железы I типа**

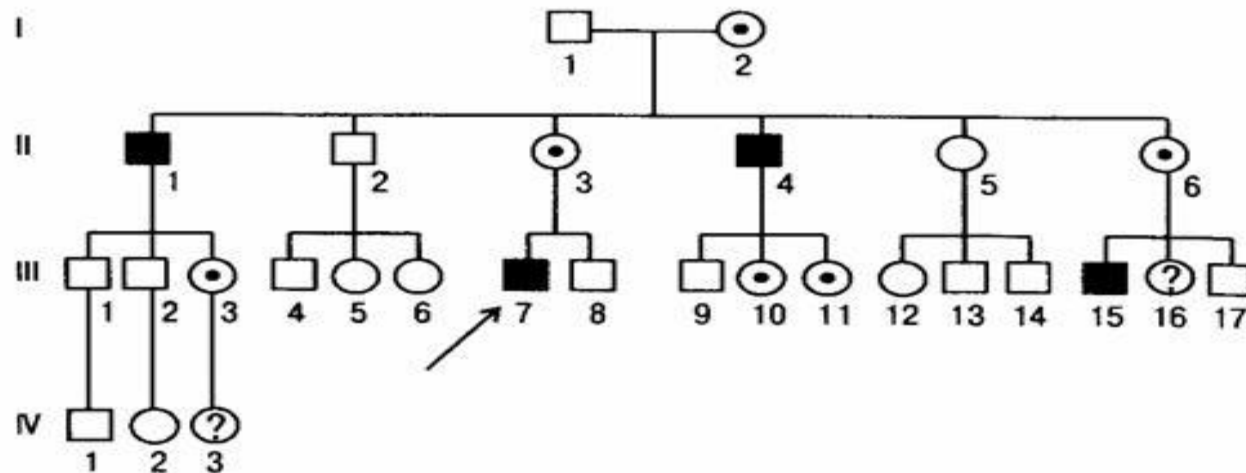
# аутосомно-рецессивное наследование



- Больной ребенок рождается у клинически здоровых родителей
- Болеют братья и сестры
- Оба пола поражаются одинаково
- Если больны оба супруга, то все дети будут больными

**Болезни обмена веществ – муковисцидоз, фенилкетонурия, гемохроматоз и др.**

# X-сцепленное наследование



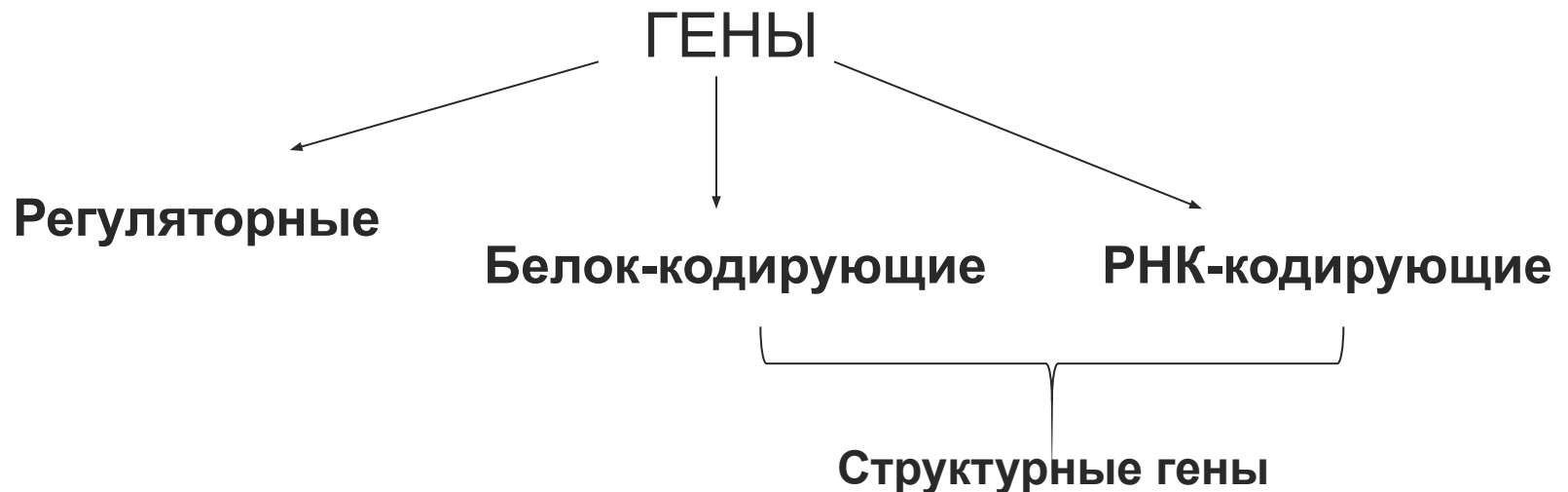
- Болеют только мальчики по линии матери (зависит от наследования)
- Больной мужчина не передает заболевание, но все его дочери являются носительницами
- В браке женщины-носительницы с больным мужчиной 50% дочерей и 50% сыновей больны

**Гемофилия, дальтонизм, недостаточность Г-6-ФД, мукополисахаридоз II типа**

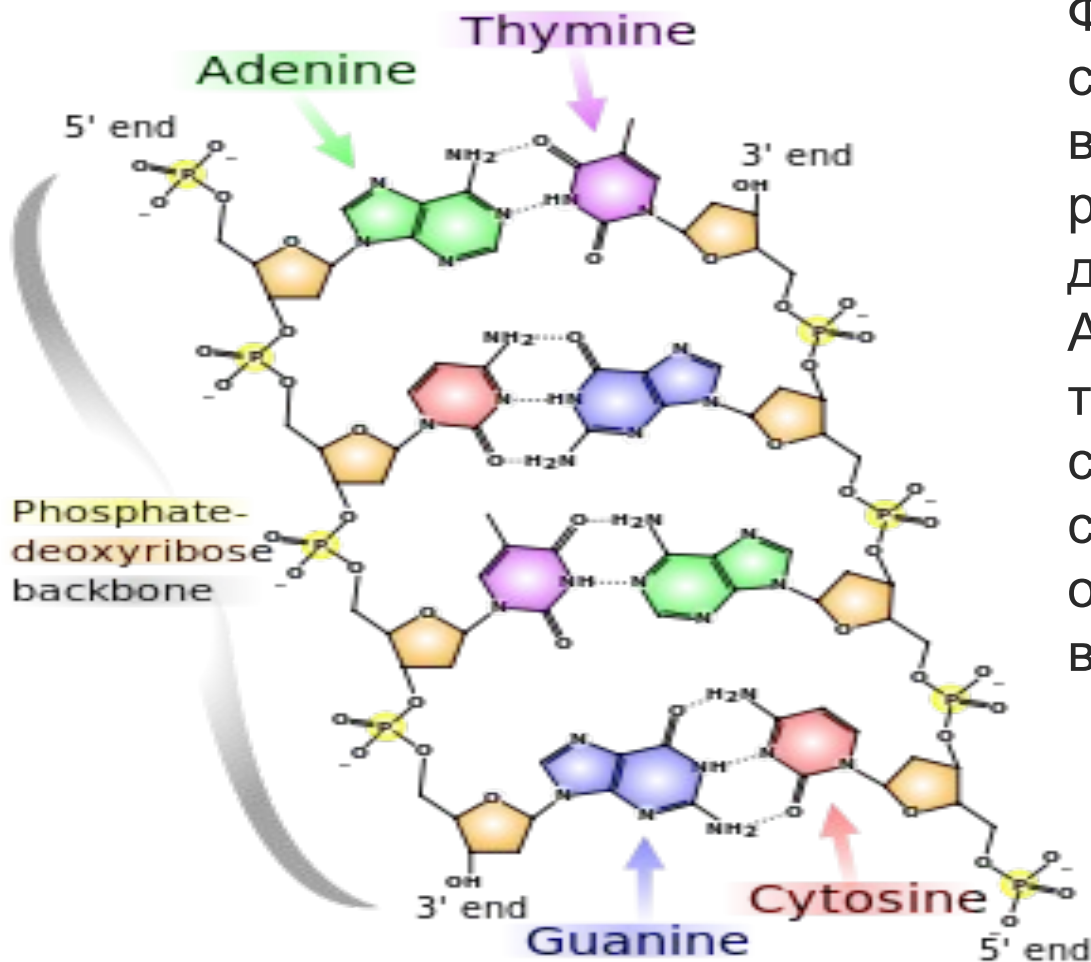
# ПОНЯТИЕ ГЕНА

**ГЕН** - это ограниченный участок геномной ДНК (или РНК для некоторых вирусов), отвечающий за определенную и специфическую функцию

**ГЕН** - наследуемая часть генома, оказывающая влияние на какой-либо фенотипический признак



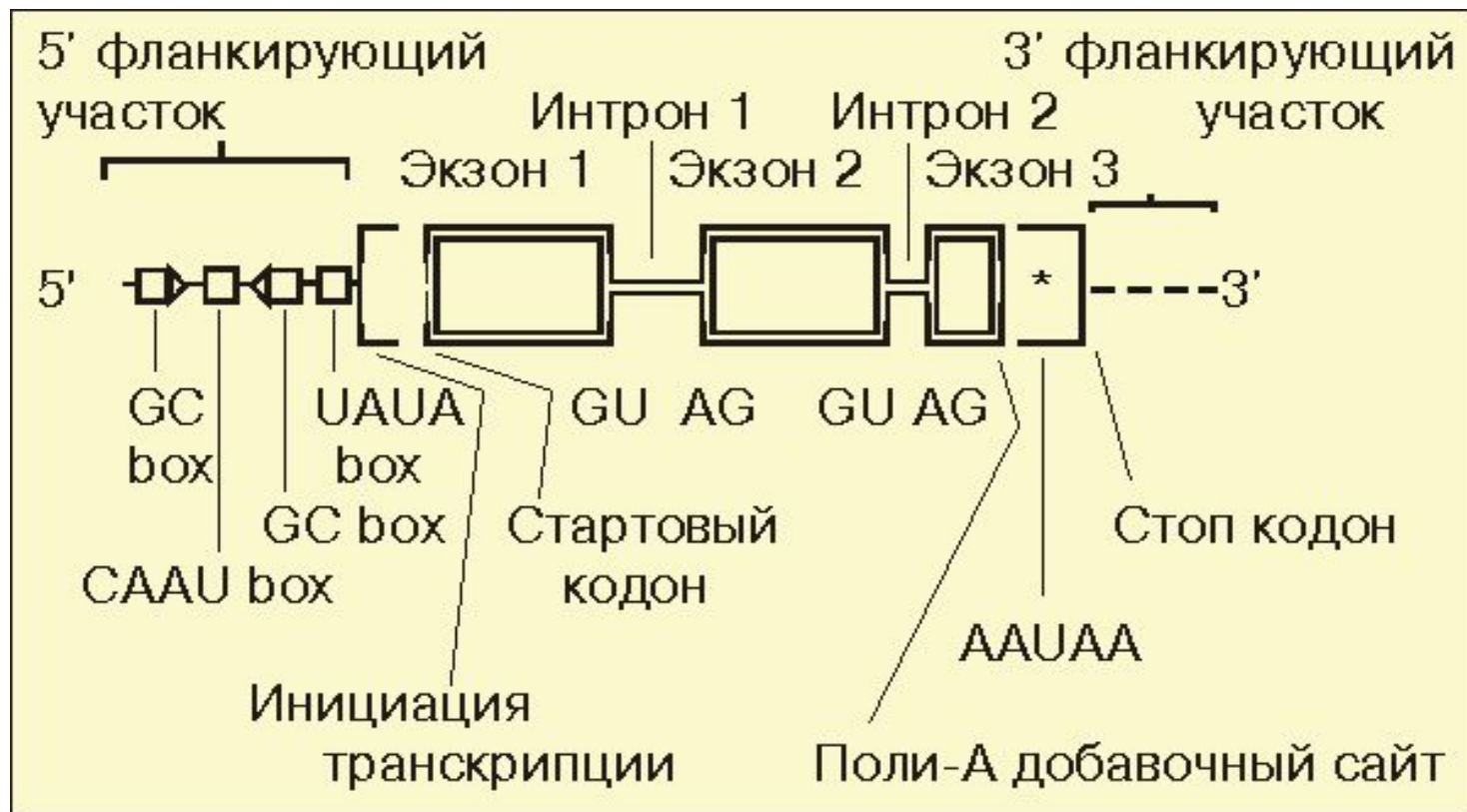
# СТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК



Формирование двойной спирали происходит за счет водородных связей расположенных друг против друга оснований. Аденин взаимодействует с тиминном образуя "слабую связь" (две водородных связи), а гуанин с цитозином образуя "сильную связь" (три водородных связи).

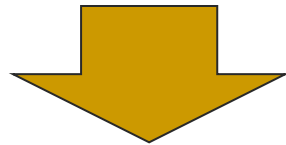


# СХЕМА ГЕНА ЭУКАРИОТ



## ЛЕЧЕНИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

- Симптоматическое лечение проявлений болезни (*диета при фенилкетонурии*)
- Замещающая терапия (*введение белка свертываемости крови при гемофилии*)
- Трансплантация органов и тканей
- Хирургическое вмешательство
- И др.



**МНОГОКРАТНОЕ ДОРОГОЕ  
СИМПТОМАТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ  
МАЛОЭФФЕКТИВНО!**

# КОНЦЕПЦИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Наиболее радикальный способ борьбы с разного рода заболеваниями, вызываемыми изменениями генетического содержания клеток - **исправление или уничтожение самой генетической причины заболевания, а не ее следствий**

*Причины генетических заболеваний:*

- **мутация** в зародышевой линии клеток, которая передается по наследству при наследственных заболеваниях,
- соматическая **мутация**, которая вызывает, например, рак,
- появления в клетке **чужеродного генетического материала**, например, в результате вирусной инфекции.

*Способ борьбы с генетическими изменениями:*

**искусственное введение** в пострадавшую клетку новой генетической информации, призванной поправить ту, с которой связана болезнь

# ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ: подходы

- **фетальная генотерапия:**  
чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития; при этом ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению)
- **соматическая генотерапия:**  
генетический материал вводят только в соматические клетки и он не передается половым клеткам.

# МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

- Технология **in vivo** – локальное введение генетической информации
- Технология **ex vivo** – трансплантация собственных клеток организма:



# ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

## Основные методы доставки новых генов:

1. Биологические (на основе векторных систем)
2. Химические
3. Физические (безвекторный перенос).

### ВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ

Аденовирусные векторы

Ретровирусные векторы

Герпесвирусные векторы

### ФИЗИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Баллистическая трансфекция комплексом ДНК-вольфрам/золото

Электротрансфекция ДНК

### НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ

ДНК-белок

ДНК в составе липосом

Чистая ДНК

ДНК в плазмиде

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

## Аденовирусные векторы

### ПЛЮСЫ

- эффективно переносят гены как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки
- не встраиваются в геном, обеспечивают высокие титры рекомбинантного вируса и высокий уровень экспрессии вводимых генов

### МИНУСЫ

- вызывают неспецифическое воспаление и противовирусную реакцию клеточного иммунитета, что сокращает длительность экспрессии до недель или месяцев

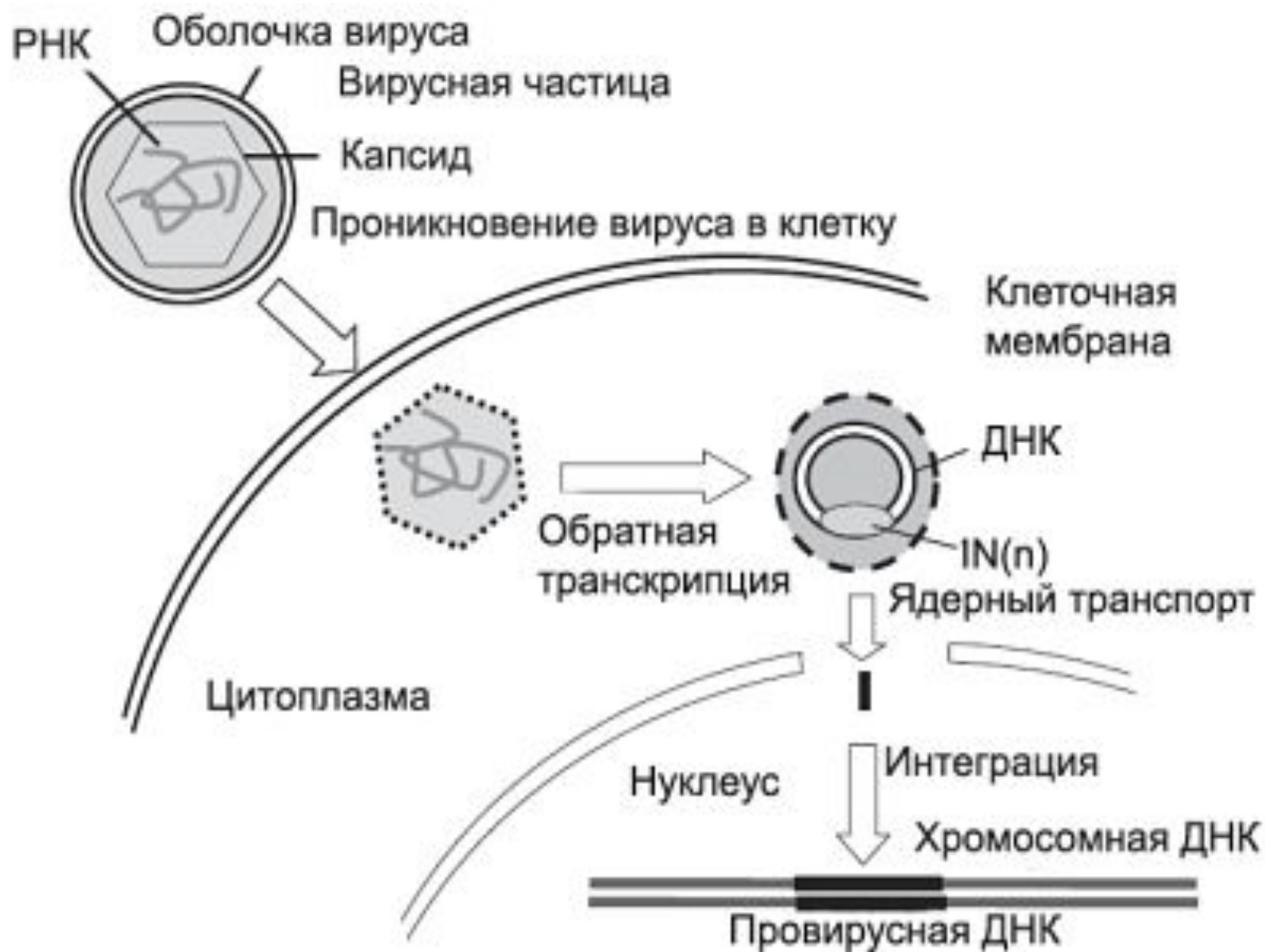
## Ретровирусные векторы

### ПЛЮСЫ

- эффективное встраивание чужеродной ДНК в геном и постоянство генетических изменений

### МИНУСЫ

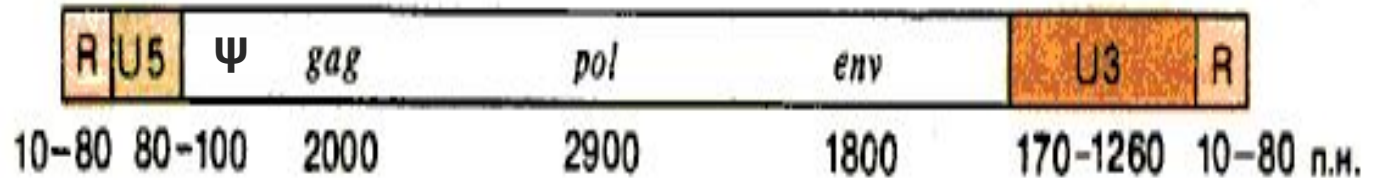
- встраиваются только в делящиеся клетки
- могут вызывать инсерционные мутации
- дают сравнительно низкие титры рекомбинантного вируса, а экспрессия встроенного гена часто уменьшается до очень низкого уровня через несколько месяцев





# ГЕНОМ РЕТРОВИРУСОВ

РНК вируса



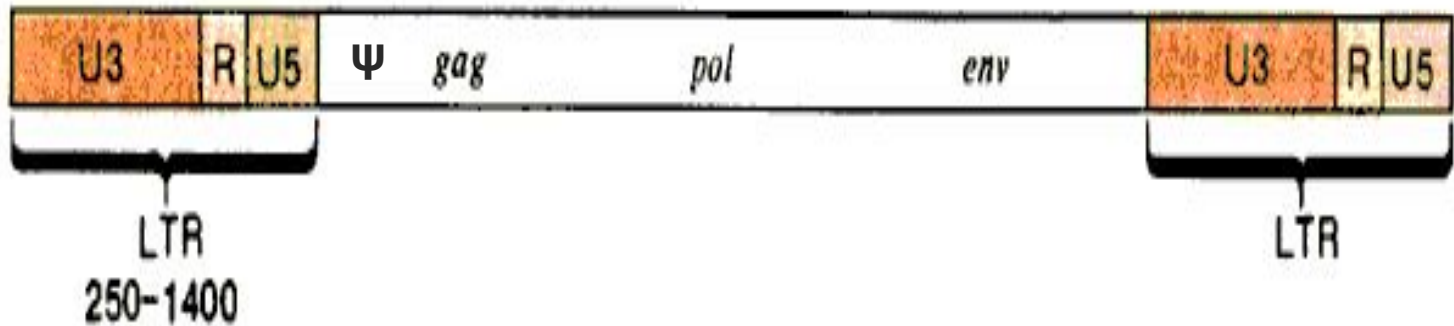
Компоненты  
начала сборки  
вируса

Компоненты  
"сердцевины"  
вируса

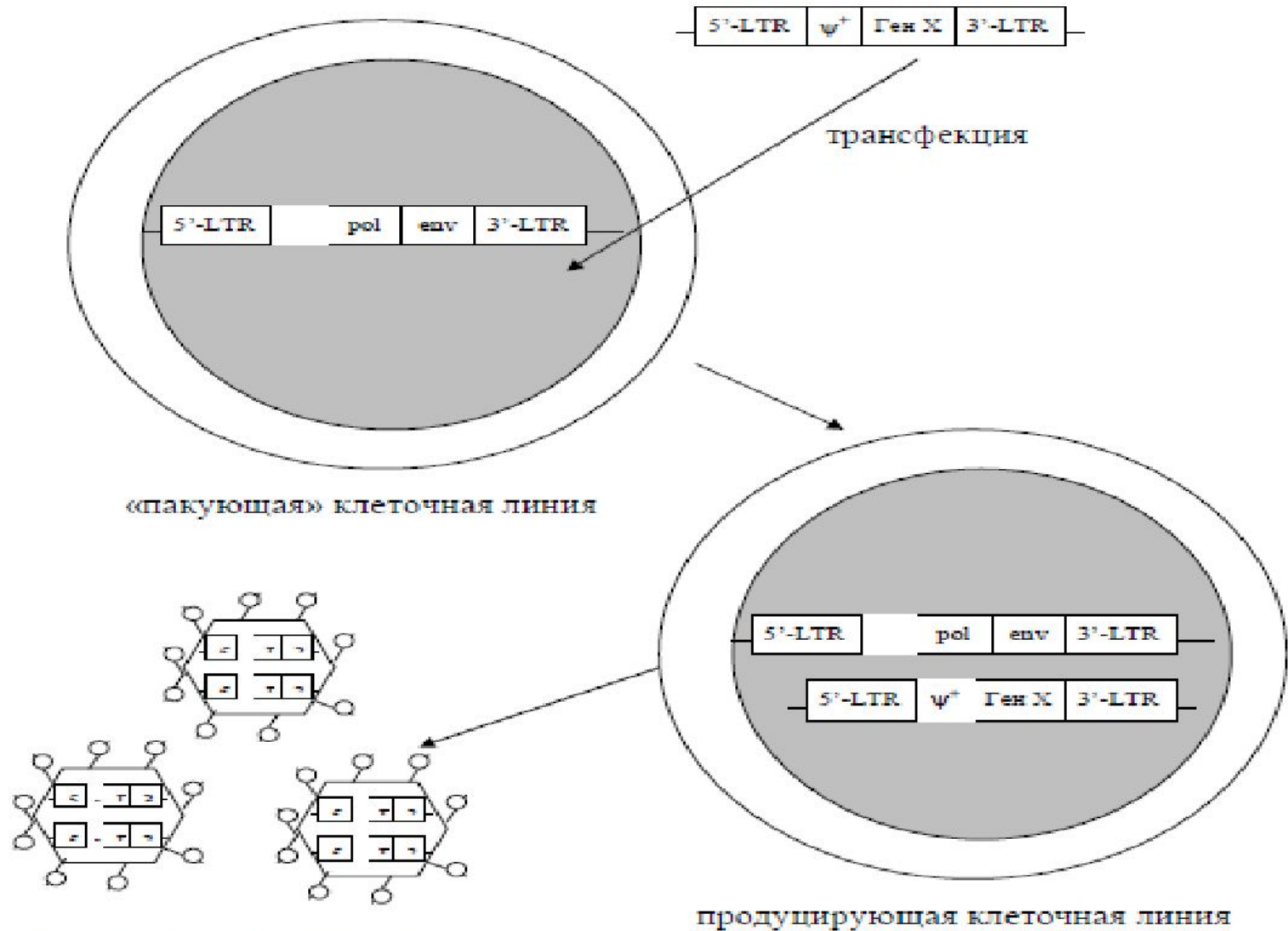
Обратная  
транскриптаза

Компоненты  
оболочки  
вируса

Линейная  
ДНК



# «ПАКУЮЩИЕ ЛИНИИ»



химерные вирусы, содержащие терапевтический ген

# Создание векторной конструкции

1. Выделение терапевтического гена в контексте регуляторных последовательностей с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).
2. Выбор или создание векторной ДНК, удовлетворяющей поставленной цели.
3. Выделение или искусственный синтез регуляторных элементов.
4. Лигирование фрагментов ДНК (ДНК вектора, гена, регуляторных элементов, маркерных участков) в нужной последовательности и ориентации.
5. Клонирование конструкции в оптимальных клетках и отбор рекомбинантных клонов.
6. Проверка эффективности экспрессии гена и свойств его продукта.

# НЕДОСТАТКИ ВИРУСНЫХ СИСТЕМ

- Малое количество псевдовиральных частиц
- Проникновение ретровируса в клетку носит строго рецепторное взаимодействие
- Зависимость экспрессии генов от положения в клетке

# ЛИПОСОМЫ

- Комплексы липосома-ДНК положительно заряжены
- Облегченное проникновение через билипидный слой

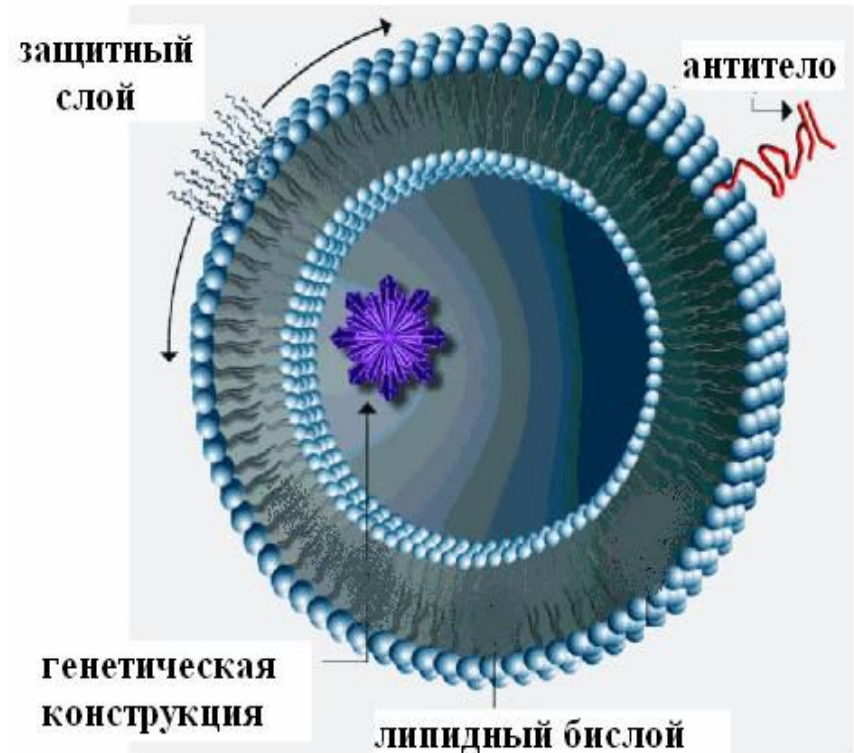
**Но!**

В частицах не содержится информации,

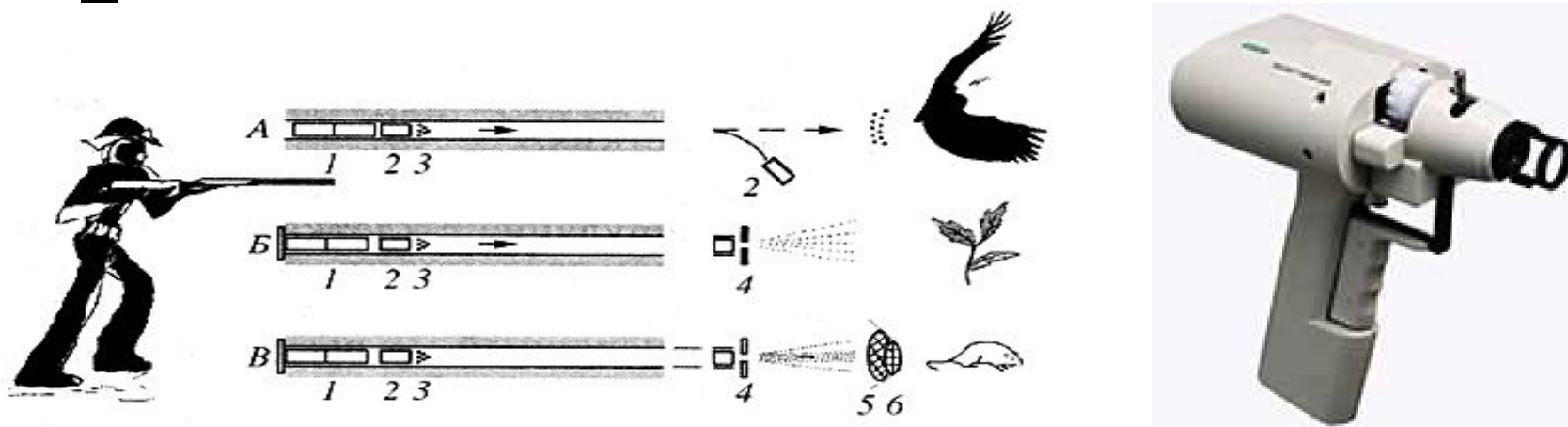
направляющей их напрямик в ядро

ПУТИ РЕШЕНИЯ:

- Конъюгация липосом с антителами или лигандами (например, с трансферрином)
- Конъюгация липосом с вирусными частицами (например, вирус Сендай)
- Создание «суперлипосом» (комплекс липосома-антитела-вирус)
- Создание вирусом (вирусные частицы, содержащие векторные молекулы нуклеиновых кислот, целиком заключенные в липосомы разнообразной структуры )



# ПРЯМОЕ ВВЕДЕНИЕ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ: БАЛЛИСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФЕКЦИЯ



**А** - дробовое ружье: 1 - пороховой заряд, 2 - войлочный пыж, 3 - дробь;

**Б** - пороховой ускоритель Клейна и Стэнфорда: 1 - пороховой заряд, 2 - макроноситель (аналог пыжа), 3 - микрочастицы вольфрама, несущие вводимую ДНК, 4 - стопорная диафрагма для остановки микрочастиц;

**В** - ускоритель Колесникова: 1 - заряд гремучей ртути, 2 - макроноситель, 3 - смесь микрочастиц золота и вольфрама, покрытых вводимой ДНК, 4 - стопорная диафрагма для остановки микрочастиц, 5, 6 - сетчатые диафрагмы для удаления частей разрушенного макроносителя и дезинтеграции конгломерата микрочастиц соответственно

# КЛЕТКИ - СРЕДСТВА ДОСТАВКИ

- Гематопозитические стволовые клетки – клетки-предшественники зрелых клеток крови;
- Гепатоциты - дифференцированные и неделящиеся (в обычных условиях) клетки печени;
- Астроциты – первичные клетки нервной системы;
- Фибробласты – первичные клетки кожи;
- Фетальные стволовые клетки

# ТРИ СТРАТЕГИИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Коррекция дефекта клетки генными модификациями этой же клетки путем

**1. Восстановление функции «больного» гена**

**2. Подавление функции «больного» гена**

Модификация гена с целью усиления иммунного ответа организма путем

**3. Повышения иммунного ответа**

**(иммунизация антигенов или аутологических клеток)**

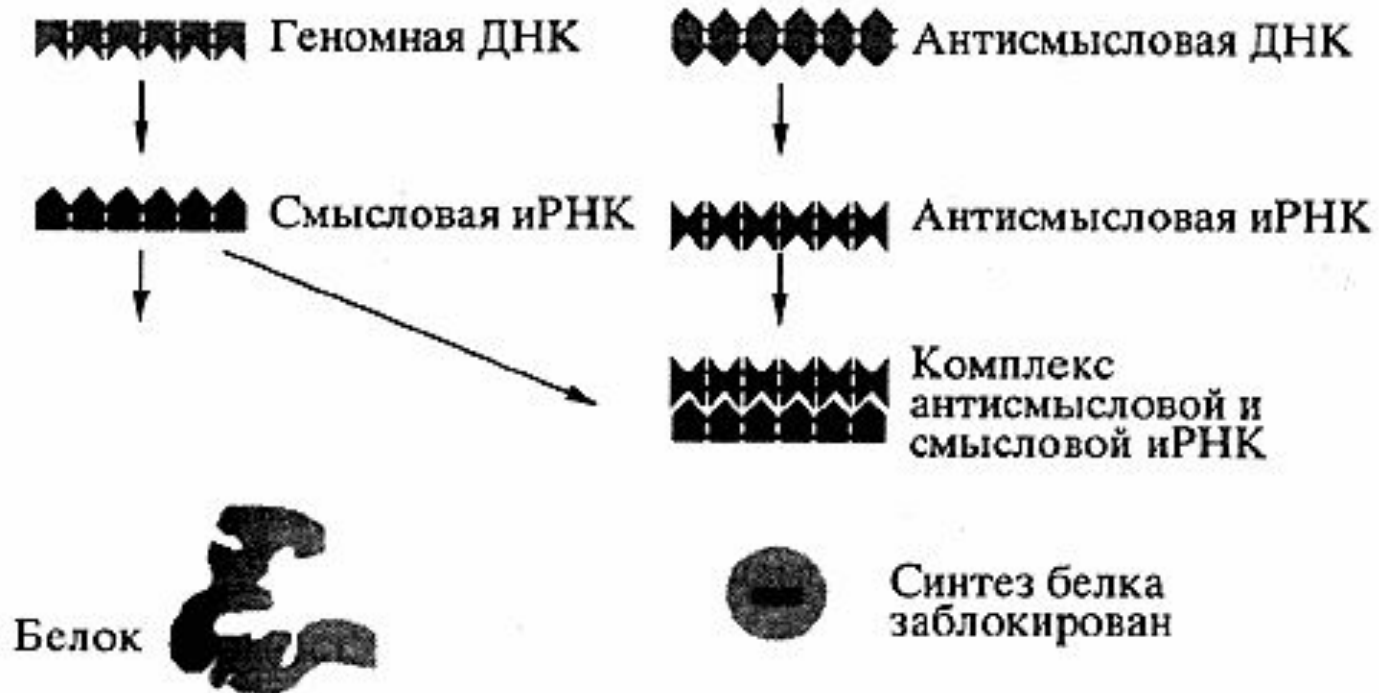


# 1-я стратегия – ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ГЕНА

- **Таргетинг** - встраивание генотерапевтической конструкции в определенное место генома
- **Пополняющая генная терапия** - введение здоровых генов при условии сохранения в клетке больного гена
- **Использование одноцепочечных олигонуклеотидов** – создание дополнительных водородных связей обуславливает способность ингибировать транскрипцию за счет перекрывания сайтов связывания транскрипционных факторов

# 2 стратегия – ПОДАВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ГЕНА

**Антисмысловая РНК** - получаемый искусственно или природный полирибонуклеотид, комплементарный определенной мРНК и подавляющий ее биологическую активность за счет образования с ней дуплекса, что препятствует трансляции мРНК на рибосомах



# РИБОЗИМЫ

содержат внутри себя антисмысловые участки и участки, осуществляющие ферментативную реакцию



# АПТАМЕРЫ

небольшие молекулы нуклеиновых кислот, которые могут выполнять функции высокоспецифичных рецепторов низкомолекулярных органических соединений

# 3-я стратегия – ИММУНИЗАЦИЯ

## Генная терапия опухолей. Потенциальные стратегии борьбы с раком:

- Увеличение иммуногенности опухолевых клеток путем введения генов, кодирующих чужеродный для этих клеток антиген (цитокиновых генов, генов, кодирующих главный комплекс гистосовместимости, лимфоцитарных лигандов)
- Поощрение клеток иммунной системы для увеличения их антиопухолевой активности, путем внесения в опухолевые клетки генов цитокинов.
- Введение в опухолевые клетки генов-убийц, которые синтезируют продукт, приводящий в определенных условиях к гибели опухолевых клеток
- Блокирование экспрессии онкогенов с помощью внутриклеточной иммунизации путем введения в клетки конструкций, программирующих синтез антисмысловых РНК или антител к онкобелкам
- Введение в опухолевые клетки генов-супрессоров (p53)
- Предохранение стволовых клеток от токсических эффектов химиотерапии путем введения в них генов устойчивости к лекарствам (MDR-1)
- Блокирование механизмов, с помощью которых опухолевые клетки избегают уничтожения иммунной системой путем введения генов, кодирующих РНК антисмысловую по отношению к IGF-1
- Направленное убийство опухолевых клеток введением генов, кодирующих токсины под контролем промоторов, специфически экспрессирующихся в опухолевых клетках

# ГЕНО-ИНЖЕНЕРНАЯ МОДИФИКАЦИЯ

## Т-ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ РАКА

- Забор т-лимфоцитов, инфильтрующихся в опухоль (TIL)
- Модификация с помощью ретровирусного вектора
- Выращивание TIL в культуре с фактором роста интерлейкином-2
- Введение обратно пациенту

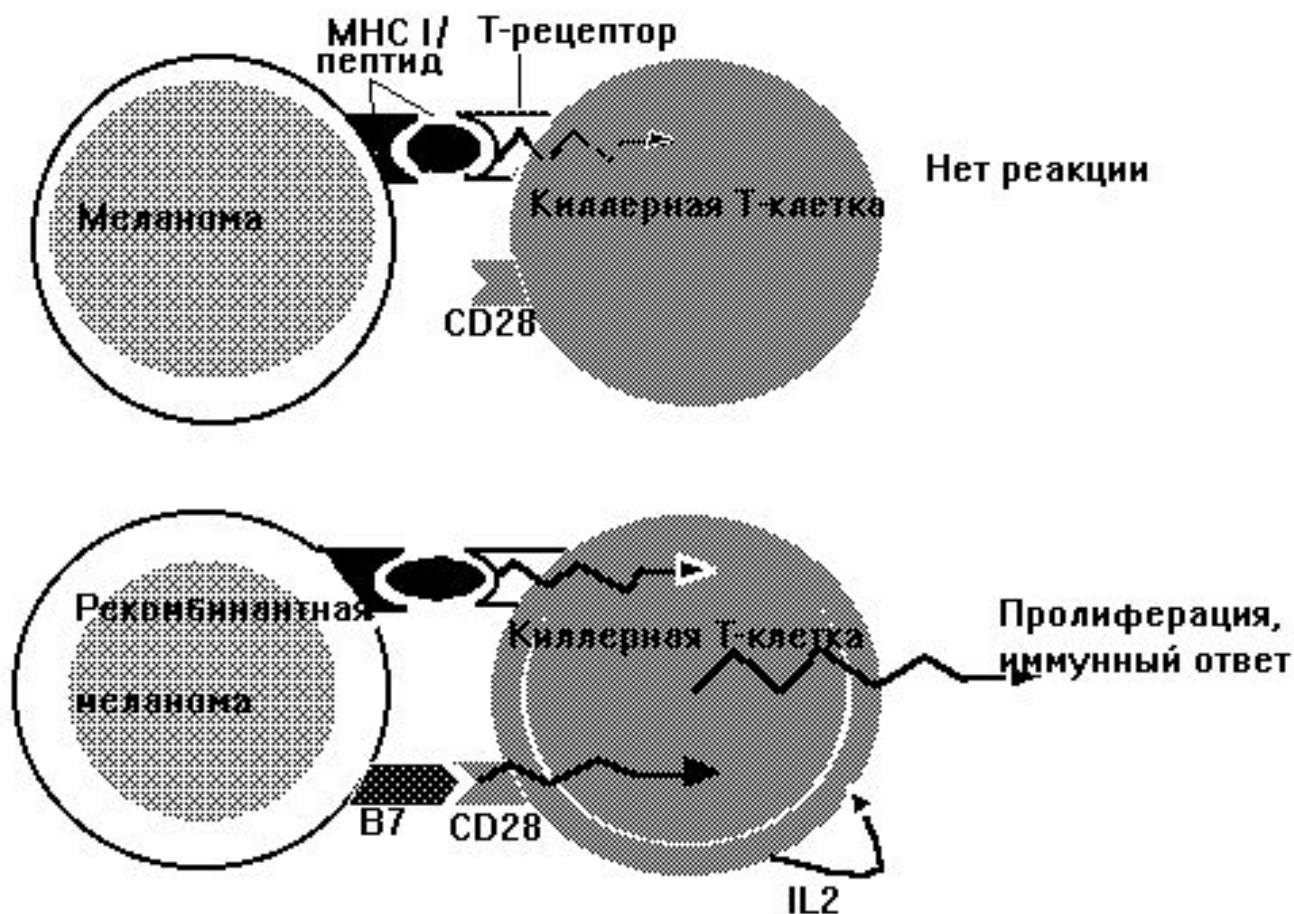
### ПЛЮСЫ

1. Доставка Т-лимфоцитов непосредственно в опухоль
2. Отсутствие побочных эффектов

### МИНУСЫ

1. Сложности с трансформацией
2. Низкая экспрессия цитокинов

# ПОВЫШЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА



Молекулы B7 экспрессируются на мембране антигенпрезентирующих клеток. Связываясь с белком CD28 на поверхности презентирющей T-клетки, обеспечивает начало пролиферации T-клеток и иммунный ответ