

ИННОВАЦИОННЫЙ ПРОЕКТ «НАНОКОМПЛЕКС ДНК-ПЭГ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНЫХ ТКАНЕЙ»

С.А. Помогаев, И.А. Иванов, А.О. Пятибрат, В.В. Лесничий, Ю.П. Чеснович, А.М. Фукс, С.П. Фалеев

Удивительные терапевтические свойства наноразмерных комплексов (НК) плазмидной ДНК в полиэтиленгликоле (ПЭГ), актуальность производства НК ДНК-ПЭГ – тема настоящей работы. Ее цель – привлечь внимание и ресурсы заинтересованных лиц к эффективному применению этих наноразмерных комплексов для генной терапии нервных тканей пациентов, подвергшихся неблагоприятным воздействиям.

На протяжении последних десятилетий отмечается неуклонный рост числа патологий нервной системы. Значительная часть этих патологий формируется под влиянием экзогенных и эндогенных факторов, таких как черепно-мозговая травма, повреждения спинного мозга и периферической нервной системы, нейроинфекция, психогенный стресс, соматические заболевания. Повреждения нервных тканей – актуальная проблема для военной медицины и спорта.

Ежегодно в России отмечается в среднем 1 500 000 случаев заболеваний нервной системы различной этиологии, включая травматические повреждения. В лечении поражений нервной системы большой удельный вес занимает медикаментозная терапия. К сожалению, применение ряда медикаментов ограничено или невозможно вследствие низкой эффективности, наличия побочных эффектов, непредсказуемости воздействия на организм и т. д. Эта проблема решается созданием новых лекарственных средств. Для лечения значительной части патологии требуются препараты для регенерации нервных тканей.

В настоящее время представления о том, что «нервные клетки не восстанавливаются», ушли в прошлое. Описанные отдельные результаты доказывают существование механизмов регенерации нервной ткани (Guld 2005, Science). Существуют белковые факторы, повышение экспрессии которых стимулирует процессы регенерации мозга (обзор: Cramer, Chopp, 2000). Таким образом, возможна стимуляция нейрогенеза посредством этих белковых факторов, что имеет важнейшее значение для лечения больных.

Предлагаемый медицинский препарат будет иметь в своей основе смесь векторных молекул ДНК, несущих гены нескольких пептидных факторов роста человека. Данные факторы роста представляют собой низкомолекулярные белки человека и влияют на разные стороны регенераторных процессов в зоне повреждений. Применение препарата осуществляется инъекцией в поврежденные области тканей.

В настоящее время в мире опубликовано более 30 тыс. работ по генной терапии (PubMed). В этой области проходят клинические испытания около 1309 препаратов. В ходе этих клинических испытаний с 14 сентября 1990 г. в мире уже многие тысячи людей с различными заболеваниями подверглись процедуре генной терапии. Публикуемые материалы в основном свидетельствуют о безопасности такой терапии и низкой токсичности. Данные об эффективности терапии варьируются в широком диапазоне. Также широк спектр заболеваний, при которых применяется генная терапия. Наиболее полно исследуются ее возможности по лечению онкологических, сердечно-сосудистых, инфекционных заболеваний.

Хотя способность ДНК инициировать синтез соответствующих белков после проникновения в клетку известна давно, только сравнительно недавно были осознаны возможности данной технологии применительно к медицине. После разработки соответствующих векторных систем, изучения механизма доставки нуклеиновых кислот в ткани, обнаружения экспрессии чужеродной ДНК в трансформированных клетках *in vitro* и *in vivo*, стал ясен потенциал этой технологии в генной терапии и создании медицинских препаратов.

Оказалось, что ввести ДНК в организм можно очень простыми способами. Было показано (Wolf J.A. et al. // *Science*. 1990. V. 237. P. 1465–1468), что инъекция плазмидной ДНК в физиологическом растворе в мышцу приводит к поглощению этой ДНК клетками и к экспрессии кодируемой плазмидой гена. Исследования в данной области нарастали лавинообразно. Новый подход удивительно прост, дешев, а главное, дает возможность унификации методик. Для некоторых районов мира важно даже то, что ДНК, в отличие от белка, стабильна при комнатной температуре. Преимущества перед непосредственным введением белков также заключаются и в возможности длительной экспрессии, сохранении возможности естественного посттрансляционного процессинга белков (меристиление, гликозилирование, образование дисульфидных связей и др.), в обеспечении правильного фолдинга (конформации) белков за счет клеточных шаперонов. Все эти модификации очень трудно достижимы при производстве белков, что может драматически сказаться на ряде функций этих белков. Так, например, показано, что некоторые белковые вакцины (gp120 HIV), произведенные в клетках *E. coli*, дрожжах (*P. pastoris*), имеют неправильную посттрансляционную модификацию, вследствие чего теряют свои функции. Механизм поглощения ДНК клетками организма не совсем ясен.

После включения ДНК в клетку наблюдается синтез кодируемого ею белка. В скелетных мышцах эта продолжительность варьируется от 14 дней до 3 месяцев, в зависимости от использованного промотора в составе плазмиды, контролирующего экспрессию гена (Kitsis, R.N. et al. // *Methods Mol. Genet*. 1993. V.1. P. 374–392). Этот аспект особенно важен при терапии эндокринных заболеваний.

На данный момент в мире разрабатывается множество систем доставки ДНК в клетки-мишени, например, липосомы или различные вирусные системы. Было показано, что с повышением эффективности доставки падает ее специфичность. Так, липосомы доставляют ДНК в различные органы, включая сердце, печень, селезенку, легкие и т. д. (Thierry A.R. et al. // *Ferns Immunol. Med. Microbiol*. 1996. V.14. P. 221–230). Вирусные векторы имеют ряд недостатков – они дорогостоящи и часто обладают ограниченной клонирующей емкостью, что не позволяет регулировать экспрессию «терапевтического гена» с помощью тканеспецифичных последовательностей. Кроме того, вирусные белки могут вызывать воспалительную реакцию, что исключает повторное введение вектора. Существуют и другие опасности применения вирусных векторов.

В предлагаемом проекте плазмидная ДНК в составе препарата будет инкапсулирована в наночастицы с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ). В результате будет получен в органическом растворителе наноконкомплекс ДНК-ПЭГ, имеющий диаметр менее 100 нм. Контроль формирования комплекса осуществляется методом электронной микроскопии. Полученный комплекс способен проникать в эукариотические клетки более эффективно, чем свободная плазмидная ДНК.

Установлено, что лучше всего ДНК поглощается клетками поперечно-полосатых мышц. При инъекции ДНК в мышцы трансформируется от 0,01 до 1 % фибрилл. Из всего количества введенной плазмидной ДНК в процессе трансформации клеток участвует 0,1–1 % плазмид. Остальное количество подвергается деградации под действием различных нуклеаз, присутствующих в биологических жидкостях организма. Определенным «недостатком» является отсутствие способности к репликации плазмидной ДНК в клетках млекопитающих. Данные о времени существования плазмидной ДНК в клетках, полученные разными авторами, различаются и в среднем составляют несколько недель.

Возвращаясь к вопросу о безопасности, необходимо отметить, что введенная ДНК не встраивается в геном, а длительное время существует как эписома (Дебабов В. Г., 1997). Таким образом, этот способ считается безопасным для организма с точки зрения мутагенеза.

В таблице представлены различные типы генов, преимущественно используемых в настоящее время для генной терапии.

В России возможность проведения исследований в области генной терапии и ее использования законодательно закреплены. Действует закон «О внесении изменений и дополнений в Федеральный закон № 96-ФЗ “О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности”» (принят Государственной Думой 21 июня 2000 г., одобрен Советом Федерации 28 июня 2000 г., подписан Президентом Российской Федерации 12 июля 2000 г.), который легализует применение генной терапии на территории России.

Использование различных типов генов при создании препаратов для генотерапии и генопрофилактики, проходивших на начало 2005 г. клинические испытания (мировая статистика)

Тип экспрессируемого белкового продукта	В процентах от всех препаратов	Количество препаратов, проходящих клинические испытания
Цитокины	24	256
Антигены	14	142
Опухолевые супрессоры	12	121
Суицидальные гены	7,5	77
Замещающие гены	6,9	68
Гены устойчивости	5,7	56
Рецепторы	3,2	32
Ингибиторы репликации	2,7	32
Другие	13	135

Таким образом, генная терапия стоит на пороге широкого внедрения в практику здравоохранения, имея ряд важных преимуществ перед классическими фармакологическими препаратами, хотя, конечно, не заменяет их полностью.

Все это позволяет сделать вывод о перспективности генотерапевтического подхода для лечения заболеваний нервной ткани при использовании генов, кодирующих ростовые факторы. Представляемый препарат является новым, как в России, так и за рубежом. Новизна определяется:

- инкапсулированием плазмидной ДНК и составом наносфер;
- уникальной комбинацией терапевтических генов, кодирующих факторы роста, в результате чего возможно ускорение регенерации в 2–3 раза;
- использованием синтетических генов собственной разработки.

Основные преимущества препарата:

- инкапсулирование плазмидной ДНК в составе препарата в наносферы для повышения возможностей трансформации клеток;
- уникальная комбинация терапевтических генов, кодирующих факторы роста, в результате чего возможно ускорение регенерации в 2–3 раза;
- использование синтетических генов, обеспечивающих повышение эффективности трансляции с результирующим увеличением синтеза белка до 300 раз, по сравнению со стандартными генно-инженерными конструкциями. Это позволит снизить количество вводимой

векторной ДНК (в 10–300 раз) по сравнению с дозами, используемыми в настоящее время в отечественной и мировой генно-терапевтической практике;

– длительность действия препарата после однократного использования. При попадании генно-терапевтических конструкций в клетку они могут обеспечивать экспрессию терапевтического гена (кодирующего антитело) от нескольких дней до нескольких недель;

– локальное действие при введении в отличие от белков, пептидов и других фармакологических препаратов, что значительно снижает побочные воздействия;

– в отличие от обычных белковых препаратов, предлагаемый препарат будет содержать значительно меньше примесей белков микроорганизмов или других клеток, в которых они нарабатываются.

Основные результаты проекта:

– получение новых фундаментальных знаний о процессах регенерации нервной системы;

– разработка и внедрение в медицинскую практику препарата для лечения повреждений и заболеваний нервных тканей различной этиологии;

– коммерческий эффект проекта – с момента начала производства планируется достижение объема производства в размере многих тысяч доз препарата в год. При обеспечении заказов возможно удвоение производства в течение первого года; на второй год производства (четвертый год с момента начала проекта) планируется расширение производства с целью удовлетворения рынка на 25 %.