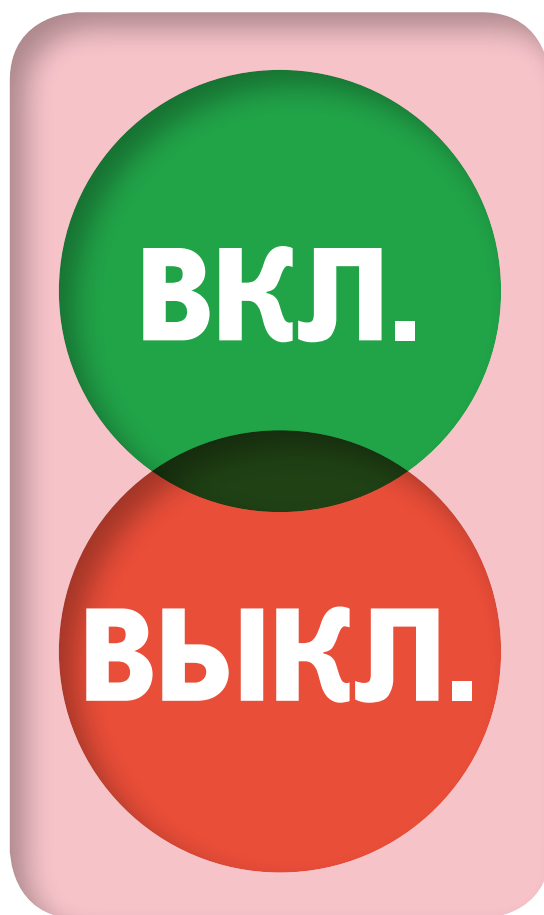


МЕДИЦИНА



ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ ГЕНОВ

Создание молекулярных переключателей, которые могут инактивировать встроенные гены, прокладывает путь к более безопасной генной терапии, нацеленной в первую очередь на борьбу с раком

Джим Козубек

ОБ АВТОРЕ

Джим Козубек (Jim Cozubek) — специалист в области вычислительной биологии, писатель. Живет в Кеймбридже, штат Массачусетс.



Человек в отличие от некоторых насекомых не линяет», — говорит мне Рэндал Керк (Randal J. Kirk). Он удачливый миллиардер с потрясающим чутьем, руководит бизнесом из Уэст-Палм-Бич на юго-востоке штата Флорида, благословенного края пеликанов и зарослей мангровых деревьев. Заработав немалые деньги на самых разных видах деятельности, он в конце концов остановился на биотехнологии и основал компанию, которая занимается разработкой технологий перевода уже известных лекарственных средств в более эффективную и безопасную форму.

Сегодня Керк стал одним из лидеров инвестиций в биотехнологию. Я позвонил ему, вовсе не ожидая услышать нечто новое о каких-нибудь букашках. Но оказалось, что процесс линьки, в ходе которого насекомое создает новый экзоскелет взамен старого, который стал ему мал, обладает рядом очень ценных особенностей, которые можно использовать в генной терапии, по большому счету еще не вышедшей за рамки эксперимента.

Встраивание в геном больного нормальной копии мутантного гена имеет своей целью устранить наследственную аномалию. Гены содержат в закодированном виде инструкции для синтеза разнообразных белков, поэтому включение в геном целевого функционального гена в принципе обеспечивает постоянную поставку в организм больного белка, ген которого несет мутацию и не функционирует надлежащим образом. Но генная терапия

сопряжена с множеством проблем, и одна из них — невозможность встроить ген в нужное место молекулы ДНК с высокой точностью и контролировать его активность (а тем самым — и количество образуемого белка). Это приводит к нежелательным последствиям, в том числе к образованию злокачественных опухолей.

Логичным решением проблемы было бы снабжение встраиваемого гена переключателем, который активировал бы и инактивировал ген по мере необходимости. «Так случилось, — говорит Керк, директор компании *Intrexon*, которая занимается разработкой новых методов генной инженерии, — что некоторые насекомые используют как раз такой переключатель для контроля линьки».

Суть вот в чем. Линька у насекомых — это не процесс, который начинается, а затем почему-либо останавливается. Она либо идет до конца, либо не происходит вообще. Пока не придет время, генетический механизм, управляющий этим процессом, должен оставаться выключенным. Ген, который использует Керк, кодирует гормон экдизон. Будучи встроенным в геном насекомого, он включает целый набор других генов, опосредующих образование нового экзоскелета. Когда линька подходит к концу, содержание экдизона падает до нуля и все участвующие в процессе гены выключаются. Очень важен с позиции специалистов *Intrexon* тот факт, что переключатель в положении «выкл.» не реагирует ни на какие воздействия, т.е. линька не начинается в отсутствие экдизона.

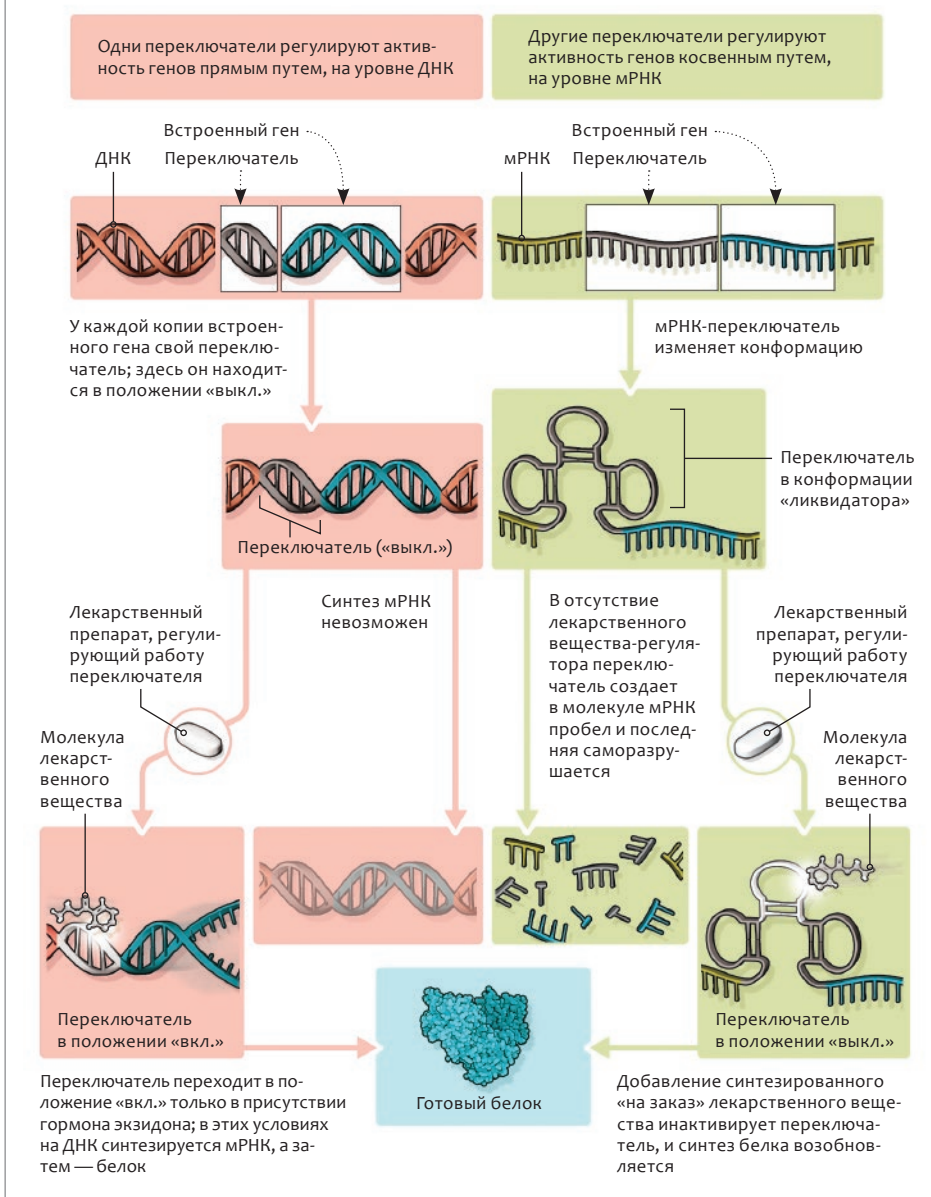
ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- Одна из основных проблем генной терапии в ее нынешнем виде — невозможность контролировать активность встроенных генов.
- Выходом из сложившейся ситуации может стать создание молекулярных переключателей, обеспечивающих тонкую настройку активности генов.
- Некоторые переключатели уже прошли проверку на безопасность в ходе клинических испытаний экспериментальной иммунотерапии.

КАК ЭТО РАБОТАЕТ

Две стратегии регуляции активности генов с помощью лекарственных средств

Одно из основных требований, предъявляемых к генной терапии, — обеспечение оптимальной активности встроенных генов. Если это условие не соблюдается и ген чрезмерно активен, может возникнуть рак. Гены, входящие в состав ДНК, содержат инструкции для синтеза других биомолекул, несущих генетическую информацию, а именно молекул РНК. На одном из видов РНК — матричной — синтезируются белки. Биологические переключатели, над созданием которых работают разные коллективы ученых, апробирующие различные подходы (два из них представлены на рис.), позволят регулировать активность соответствующих генов (и тем самым — количество кодируемых ими белков) либо полностью выключать эти гены.



Ученые из компании *Intrexon* взяли на вооружение эти особенности, чтобы с их помощью попробовать осуществить строгий контроль активности любых генов, включаемых в геном человека. Предположим, что каждый встраиваемый ген снабжен биологическим переключателем, который срабатывает и тем самым активирует терапевтический ген только в присутствии лиганда — экдизона, адаптируемого к физиологическим особенностям человеческого организма. У пациента, получившего препарат-активатор в низкой дозе, активируется лишь небольшое число копий встроеного гена и кодируемый белок синтезируется тоже в небольшом количестве. Если же дозу активатора повысить, то и число активированных генов возрастет, а вместе с этим образуется больше продукта. Чтобы предотвратить всякие неожиданности, предусматривается, что отсоединение лиганда блокирует процесс. Нет экдизона — нет и активации. Кроме того, экдизон не должен влиять на работу других генов, поскольку в норме этот гормон не нужен организму для регуляции генной активности.

В течение последних восьми лет ученые *Intrexon* апробировали свой переключатель на тысячах генов человека и показали, что в лабораторных условиях практически любой из них можно поставить под гормональный контроль с помощью экдизона. Помимо этого группа Керка добавила еще один контрольный механизм, используя промоторы, каждый из которых специфичен для клеток определенного типа.

В результате целевой ген экспрессировался либо только в специфических клетках — нейронах, клетках крови или печени и т.д., либо при заданных условиях, например в окружающих опухоль тканях, обедненных кислородом. Привлечение

дополнительных молекулярных «стражников» снижало вероятность нежелательных воздействий на нецелевые ткани.

Тем временем другая группа биологов взяла на вооружение отличные от описанного выше природные биологические процессы, для того чтобы создать свои генные переключатели и контрольные механизмы. В конце концов возможность встраивания в геном сразу нескольких искусственно контролируемых генов, каждый из которых подчиняется своим командам, приведет к тому, что генная терапия станет высокоэффективной и совершенно безопасной, заняв лидирующее положение в медицине. Предварительные испытания на людях показали, что генный переключатель работает как положено. Пока его применяют в основном в опытах на раковых клетках, и, по-видимому, здесь этот метод и проявит себя в полной мере.

для борьбы с раком. Предполагается, что уничтожать все точки опухолевого роста нет необходимости: если иммунная система расправляется с одной из них, она отыскивает другие уже самостоятельно.

Цитокины запускают широкий спектр физиологических реакций — от расширения кровеносных сосудов, обеспечивающих доступ иммунных клеток к инфицированной ткани, до активации киллерных *T*-клеток, которые помимо всего прочего разрушают раковые клетки. Но пока достичь успеха в использовании в подобной иммунотерапии наиболее мощных цитокинов, таких как интерлейкин-12 (*IL-12*), не удастся.

Неудача связана отчасти со склонностью *IL-12* вызывать «цитокиновый шторм», при котором иммунная система направляет всю свою мощь на сам организм: у больных резко падает артериальное давление, нарушается работа легких, возникают



Займствовано у природы: гормон экзидон регулирует процесс линьки у многих насекомых, например у бабочек; одна из биотехнологических фирм использует этот гормон в генной терапии для повышения ее безопасности и эффективности

Первые испытания

Генные переключатели интересуют биологов в первую очередь как инструмент для снижения тяжести последствий противораковой иммунотерапии. Последнюю применяют для усиления ответной реакции организма на химические сигналы, посылаемые опухолью, или для запуска совершенно нового иммунного ответа, более мощного, чем возникающий у пациента естественным путем. Опасность применения этого метода связана с тем, что гиперактивная иммунная система легко выходит из-под контроля, вызывая опасные для жизни воспалительные процессы и потенциально летальное скопление жидкости по всему телу.

Генные переключатели опробованы на небольшом числе тщательно отобранных пациентов с рецидивирующей меланомой. Больному вводят в одну или две опухоли гены, продукты которых ускоряют образование цитокинов — сигнальных молекул (интерферона или различных интерлекинов), которые используются иммунной системой

проблемы в сердечно-сосудистой системе — и все вместе нередко приводит к повреждению органов и смерти. При этом, по словам Лоренса Коупера (Laurence Cooper), врача-исследователя из Онкологического центра М.Д. Андерсона при Техасском университете и руководителя компании *Ziopharm Oncology*, «тонны научных статей свидетельствуют о его воздействии на микроокружение опухолей. *IL-12* — это чаша Грааля для иммунологии». Таким образом, в единичную опухоль следует вводить как можно больше *IL-12*, но не настолько много, чтобы спровоцировать «цитокиновый шторм». Здесь и может проявиться во всей полноте потенциал генного переключателя.

Введенные в опухоль *IL-12*-гены, снабженные переключателем, распространяются по многим ее клеткам, в том числе и уже имеющимся там клеткам иммунной системы, «подхлестывая» их. Поскольку переключатель активируется только в присутствии соответствующего лиганда, можно повышать уровень цитокина в опухоли, осторожно

увеличивая количество вводимого лекарственного вещества. При первых признаках приближающегося «цитокинового шторма» можно пропустить следующую дозу, устранив тем самым опасность.

Ziopharm, сотрудничающая с *Intrexon* в разработке методики цитокиновой терапии, пока довольна полученными результатами. Керк сообщил, что его группа собирается апробировать новый подход на белках немного меньшего размера, чем *IL-12*, надеясь избежать нежелательных последствий малейших отклонений от схемы. «Мы выбрали один из самых "стойких" генов, желая испытать переключатель на прочность». Другими словами, Керк с сотрудниками хотят проверить, действительно ли переключатель, переведенный в состояние «выкл.», остается полностью выключенным.

Результаты двух испытаний на безопасность, проведенных в нескольких медицинских центрах (с участием в общей сложности 40 пациентов), дают основания надеяться на положительный ответ. К сожалению, ни один из участников испытаний не выздоровел, однако нельзя отрицать их пользу: безопасность метода была доказана. Как и ожидалось, у небольшого числа больных появились признаки опасной гиперреактивности, но они исчезли, как только пациенты перестали получать экдизон.

Обнаружились и некоторые свидетельства эффективности методики. В одном из двух испытаний 12 участницам, страдающим раком молочной железы, инъецировали терапевтический ген. Каждая из них перед этим прошла в среднем восемь курсов противораковой терапии, и надежды на излечение оставалось все меньше. По разным причинам оценить эффективность метода удалось лишь для семи пациенток. У четырех из них размеры опухоли уменьшились, а у трех остальных процесс стабилизировался — по крайней мере на время испытаний. Во втором испытании на безопасность с участием 26 пациентов с метастазирующей меланомой, прошедших в среднем по шесть курсов терапии, отмечалось повышение уровня цитокинов и других противораковых агентов. В мае 2015 г. *Ziopharm* приступила к тестированию метода на больных с полиформной глиобластомой, наиболее агрессивной формой опухоли головного мозга.

Рибопереключатели

Ричард Маллиган (Richard Mulligan) из Гарвардской медицинской школы занимается созданием переключателя другого рода: его подход основан на использовании природных молекул —

небольших РНК под названием «рибозимы». Эти необычные биомолекулы были открыты в 1980-х гг.; как и обычные ферменты, они катализируют различные биохимические реакции. Но большинство ферментов — это белки, а рибозимы — молекулы РНК. Особую ценность для обсуждаемого здесь круга вопросов представляет то, что некоторые рибозимы катализируют расщепление самих себя и побуждают к этому же молекулы, с которыми они связаны.

В конструкциях Маллигана рибозим соединен не с самим целевым геном, а с его мРНК-копией, молекулой, на которой синтезируется соответствующий белок. Вначале Маллиган синтезирует сегмент ДНК, который кодирует саморасщепляющийся рибозим, а затем инъецирует больному эту ДНК и терапевтический белок. В клетке синтетическая ДНК транскрибируется в мРНК; от нее в автономном режиме отщепляется участок, представляющий собой рибозим. Оставшийся сегмент мРНК

Возможность встраивания в геном сразу нескольких искусственно контролируемых генов, каждый из которых подчиняется своим командам, приведет к тому, что геновая терапия станет высокоэффективной и совершенно безопасной, заняв лидирующее положение в медицине

отсоединяется клеточными ферментами, и дальнейший его синтез прекращается. Все выглядит так, будто ген соответствующего белка выключается.

В 2000 г. Роналд Брейкер (Ronald R. Breaker) с коллегами из Йельского университета показал, как защитить оставшуюся часть мРНК и при этом в случае необходимости выключить синтез белка. Для этого нужно присоединить к рибозиму некую молекулу под названием «аптамер» — своего рода сенсор, активируемый лекарственным веществом. Только в его присутствии сенсор изменяет свою конформацию так, что рибозим утрачивает способность расщеплять мРНК. И тогда на полноразмерной интактной мРНК синтезируется белок. В отсутствие лекарственного вещества, влияющего на сенсор, рибозим и мРНК саморазрушаются.

К 2004 г. Маллиган с коллегами провели множество экспериментов с применением рибозимов-переключателей и тщательно подобранных сенсоров

и продолжают совершенствовать свою методику. Сенсоры можно наделять чрезвычайно высокой специфичностью, последовательно уменьшая частоту нежелательных побочных эффектов. Как и в случае с экдизоном, на мРНК, к которой присоединен рибопереключател, белок синтезируется только тогда, когда пациент принимает соответствующее лекарство.

Многопрофильные переключатели

Несмотря на то что переключатели единичных генов далеко не совершенны, биологи считают, что недалеко то время, когда рутинными станут многопрофильные переключатели, благодаря которым точность регуляции генной терапии существенно

Когда-нибудь вместо лекарственных препаратов пациентам будут прописывать молекулярные переключатели различных встроенных генов, срабатывающие в нужном месте в нужное время, вместо того чтобы заполнять весь организм без всякой пользы, а нередко и вызывать серьезные побочные эффекты

возрастет. Весьма плодотворной может стать комбинация генной терапии с использованием переключателей, с одной стороны, и другими противораковыми инструментами — с другой.

Так, Купер из центра Андерсона работает над созданием методики, в которой пара генов с переключателями совмещается с клеточной противораковой терапией. Гены кодируют два вида интерлейкинов, 12 и 15. Как показывают лабораторные испытания, в присутствии *IL-15* мобилизующее действие второго интерлейкина на иммунные клетки усиливается. Третий участник этой схемы — группа генетически модифицированных иммунных клеток, называемых *CART*-клетками. Они превосходят природные компоненты иммунной системы по нацеленности всей своей мощи на опухолевые клетки. Объединив все это в единое целое, Купер существенно повысил прицельность и эффективность терапии. Поскольку переключатели

и их активаторы позволяют подбирать нужную концентрацию *IL-12* и *IL-15* независимо, можно тонко настраивать ход лечения для достижения оптимального результата при минимальном количестве *IL-12*, что уменьшает вероятность «цитокинового шторма». По словам Купера, при небольшой доле фантазии это новое устройство можно назвать машиной с дистанционным управлением.

Новая технология далека от совершенства, но об ее огромном потенциале можно говорить уже сейчас. Если простое встраивание чужеродных генов, начало которому было положено в 1990-х гг., можно назвать генной инженерией 1.0, то встраивание с переключателем — это генная инженерия 2.0. Когда-нибудь вместо лекарственных препаратов пациентам будут прописывать молекулярные переключатели различных встроенных генов, срабатывающие в нужном месте в нужное время, вместо того чтобы заполнять весь организм без всякой пользы, а нередко и вызывать серьезные побочные эффекты. Сами препараты не будут вырабатываться в гигантских биореакторах на фармацевтических предприятиях. Лекарственное вещество поступит в организм пациента только тогда, когда это нужно, и попадет в нужное место. ■

Перевод: Н.Н. Шафрановская

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Баррик Дж., Брейкер Р. Древние генетические переключатели // *ВМН*, № 6. 2007.
- Semi-Synthetic Ecdysteroids as Gene-Switch Actuators: Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Prospective ADME Properties. Silvia Lapenna et al. in *ChemMedChem*, Vol. 4, No. 1, pages 55–68; January 2009.
- Small Self-Cleaving Ribozymes. Adrian R. Ferré-D’Amaré and William G. Scott in *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 2, No. 10, Article No. a003574; October 2010. <http://cshperspectives.cshlp.org/content/2/10/a003574.long>
- The War on Cancer Is Evolving. Video featuring Laurence Cooper. October 15, 2013. www.acgftfoundation.org/video/dr-laurence-cooper-war-cancer-evolving
- Дополнительную информацию о создании комбинаций переключателей с экспериментальными лекарственными агентами см. по адресу: ScientificAmerican.com/jan2015/gene-switches