

УДК 615.31; 57.089

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ34092>

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ СОВРЕМЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Е.Г. Богомолова¹, П.М. Копейкин¹, А.А. Тагаев²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва

Для цитирования: Богомолова Е.Г., Копейкин П.М., Тагаев А.А. Генно-инженерные подходы к разработке современных лекарственных препаратов // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – № 3. – С. 49–60. <https://doi.org/10.17816/MAJ34092>

Поступила: 18.05.2020

Одобрена: 02.07.2020

Принята: 07.09.2020

Классический способ получения белковых молекул, активных компонентов ряда лекарственных препаратов, заключался в их выделении из природных источников. Данный способ был сопряжен с рядом трудностей, таких как сбор источника препарата, выделение и очистка белка, его стандартизация. С появлением технологии рекомбинантной ДНК стало возможным получение больших количеств стандартизованных белковых препаратов, лишенных нежелательных примесей. Так, инсулин человека является первым коммерческим терапевтическим препаратом, созданным с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Благодаря быстрому развитию технологий генной инженерии в последние годы большое количество белков было получено в клетках *Escherichia coli*, а также в других продуцентах. В настоящее время все активнее развивается направление разработки препаратов на основе молекул ДНК, содержащих гены, кодирующие белки, входящие в состав терапевтических препаратов. Многие ученые отмечают перспективность ДНК-вакцин. Простота производства, стабильность, способность имитировать естественные инфекции и вызывать соответствующие иммунные ответы делают эту платформу для производства вакцин чрезвычайно привлекательной. Обеспечение адресной доставки и нацеливания на иммунологически релевантные клетки — основные задачи на пути достижения максимальной эффективности ДНК-вакцин. Новейшим подходом к разработке лекарственных препаратов, в том числе вакцинных, является технология рекомбинантной РНК. В данном обзоре обсуждены основные варианты профилактических РНК-вакцин, способы доставки РНК в клетку и способы увеличения эффективности РНК-вакцин. Лекарственные средства, созданные на базе нуклеиновых кислот, обладают рядом неоспоримых преимуществ. Применение терапевтических препаратов на основе белковых молекул и низкомолекулярных соединений осложнено тем, что они не могут быть нацелены на конкретный ген или его белковый продукт, ответственные за возникновение заболевания. Действие молекул нуклеиновых кислот может быть направлено на определенный участок ДНК с целью редактирования его нуклеотидной последовательности. Данный способ позволяет корректировать генетический дефект, устраняя причину заболевания, а не просто лечить его последствия. В обзоре представлены принципы генной терапии, суммированы современные достижения в области разработки препаратов на основе рекомбинантных белков и нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: технология рекомбинантной ДНК; рекомбинантные белки; ДНК; РНК; лекарственные препараты; вакцины.

GENETIC ENGINEERING APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF MODERN THERAPEUTICS

E.G. Bogomolova¹, P.M. Kopeykin¹, A.A. Tagaev²

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

For citation: Bogomolova EG, Kopeykin PM, Tagaev AA. Genetic engineering approaches to the development of modern therapeutics. *Medical Academic Journal*. 2020;20(3):49-60. <https://doi.org/10.17816/MAJ34092>

Received: May 18, 2020

Revised: July 2, 2020

Accepted: September 7, 2020

The classic approach to production of protein-based therapeutics is their isolation from natural sources. This approach was associated with a number of difficulties, such as collecting the primary material from natural sources, isolating and purifying the protein, and its standardizing. With the development of recombinant DNA technology,

Список сокращений

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота; мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота; нкРНК — некодирующая рибонуклеиновая кислота; FDA — Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (от англ. Food and Drug Administration — FDA).

it became possible to obtain large quantities of protein preparations lacking any contaminations. Human insulin produced using recombinant DNA technology is the first commercial therapeutic obtained by this way. Due to the rapid development of genetic engineering technologies, a large number of proteins have been obtained in *Escherichia coli* cells. In recent years, the approach for the development of drugs based on DNA molecules containing genes encoding therapeutic proteins has been developing more actively. Today, many scientists believe in the prospects of application of DNA vaccines. The ease of production, stability, the ability to mimic natural infections and elicit appropriate immune responses make this vaccine platform extremely attractive. Delivery and targeting of immunologically relevant cells are major tasks for maximizing the immunogenicity of DNA vaccines. Several different approaches that are currently being used to achieve this goal are discussed in this review. Pharmaceuticals based on nucleic acids have a number of undeniable advantages. The main options for prophylactic RNA vaccines, the methods used to deliver RNA to the cell, and methods for increasing the effectiveness of RNA vaccines are discussed. Usage of therapeutic drugs based on protein molecules and low molecular weight compounds is complicated by the fact that they cannot be targeted at a specific gene or its protein product, responsible for the occurrence of the disease. Action of nucleic acids can be directly directed to a particular DNA region in order to edit its nucleotide sequence. This method allows to correct a genetic defect, eliminating the cause of the disease. The principles of gene therapy and the successes achieved in this area are discussed. This review summarizes current achievements in the development of drugs based on recombinant proteins and nucleic acids.

Keywords: recombinant DNA technology; recombinant proteins; DNA; RNA; therapeutics; vaccines.

Введение

Быстрое развитие технологии рекомбинантной ДНК и методов секвенирования ДНК и РНК привело к появлению инструментов для изучения и терапии заболеваний на молекулярном уровне. Клонирование генов позволяет производить высокоочищенный белковый продукт в неограниченном количестве. Инсулин человека [1], гормон роста [2], интерферон [3] и фактор VIII [4], получаемые методами генной инженерии в прокариотических системах экспрессии, успешно используют в клинической практике для терапии при сахарном диабете, дефиците гормона роста, гемофилии и других заболеваниях. Благодаря производству в больших количествах белков, таких как соматостатин или интерферон, которые обычно присутствуют в незначительных количествах в живом организме, удалось детально изучить их биологические функции. С помощью ДНК-технологии были расшифрованы молекулярные основы многих заболеваний человека, таких как серповидноклеточная анемия, талассемия и некоторые виды онкологических заболеваний [5]. На сегодняшний день доступны разнообразные системы экспрессии на основе прокариотических и эукариотических клеток. Среди прокариотических систем экспрессии наибольшее предпочтение отдают продуцентам на основе клеток *Escherichia coli* в силу их короткого жизненного цикла, хорошо изученных генетических особенностей, высокой продуктивности и, соответственно, относительно небольшой стоимости производства лекарственных препаратов.

В последние годы все активнее развивается направление разработки препаратов на основе молекул плазмидной ДНК, содержащих гены, кодирующие терапевтические белки. Конкурентные преимущества ДНК-препаратов

состоят в относительной простоте их производства, стабильности при комнатной температуре, что облегчает их хранение и транспортировку. Способность имитировать естественные инфекции и вызывать соответствующий иммунный ответ делают эту платформу для вакцин чрезвычайно привлекательной. Пока ни одна из разрабатываемых ДНК-вакцин для человека еще не прошла лицензирование, но регистрация и лицензирование нескольких ветеринарных вакцин свидетельствуют о перспективности такого рода препаратов. Основное препятствие в достижении максимальной иммуногенности ДНК-вакцин заключается в их адресной доставке к иммунологически релевантным клеткам [6, 7].

Применение терапевтических препаратов на основе белковых молекул и низкомолекулярных соединений осложнено тем, что они не могут быть нацелены на конкретный ген или его белковый продукт, ответственные за развитие патологического процесса. Действие молекул нуклеиновых кислот может быть направлено на определенный участок ДНК с целью редактирования его нуклеотидной последовательности. Данный способ позволяет корректировать генетический дефект, устраняя причину заболевания, а не просто лечить его последствия.

За последние несколько десятилетий появились кандидатные РНК-препараты для коррекции патологии на уровне генов и РНК. Некодирующие РНК могут проявлять терапевтический эффект при различных заболеваниях путем расщепления матричной РНК (мРНК) благодаря присутствию в их составе последовательности антисмысловых олигонуклеотидов, формирования дуплексов с ДНК, альтернативного сплайсинга, редактирования РНК, модификации хроматина, модуляции транскрипции, трансляции, маскирования РНК, сайленсинга

генов. На основе мРНК разрабатывают вакцинные препараты, нацеленные на защиту от патогенов, а также борьбу с опухолевыми клетками. Несмотря на то что еще с 1990 г. было известно, что нуклеиновые кислоты могут быть использованы для модуляции синтеза белка *in vivo* [8], применение РНК в терапии было ограничено рядом факторов. Одноцепочечная РНК подвержена деградации нуклеазами, может вызывать иммунный ответ, имеет отрицательный заряд молекулы и слишком велика, чтобы пассивно проходить через клеточную мембрану, в связи с чем необходимо обеспечить ее транспорт в цитоплазму клетки [9]. Эта проблема решается путем разработки различных способов доставки с использованием молекул-переносчиков.

Технологии рекомбинантной ДНК для получения белковых препаратов

Для применения белковых лекарственных препаратов обычно необходимо получить терапевтические белки в больших количествах. Эту задачу можно решить путем производства рекомбинантных белков, для чего используют системы экспрессии на основе прокариотических и эукариотических клеток. Эти системы обладают как преимуществами, так и недостатками. Производство эукариотических белков в эукариотических клетках-продуцентах привлекательно тем, что получаемый белок

не содержит в своем составе примесей, характерных для прокариотических клеток, что упрощает его очистку. Вместе с этим технология производства рекомбинантных белков в эукариотических клетках, особенно в клетках высших эукариот, представляет долгий, трудоемкий и дорогостоящий процесс. В связи с этим многие исследователи отдают предпочтение прокариотическим системам экспрессии. *Escherichia coli* является одной из наиболее популярных систем экспрессии благодаря высокой скорости роста клеток, простоте генетических манипуляций и большому количеству получаемых рекомбинантных белков [10]. Возможность производства белков в клетках *E. coli* основана на способности бактерий воспроизводить плазмидные ДНК, присутствующие в их клетках. При этом экспрессионные векторы содержат в своем составе все необходимые элементы для синтеза белка ферментативным аппаратом клетки кишечной палочки. В целом схема получения рекомбинантного белка в клетках *Escherichia coli* представлена на рис. 1.

Рекомбинантный белок в клетках *E. coli* получают в несколько этапов: химический синтез последовательности гена, кодирующего рекомбинантный белок; создание экспрессионной плазмиды путем клонирования гена в плазмидном векторе; трансформация компетентных клеток *E. coli* для создания штамма — продуцента рекомбинантного белка; отбор успешно

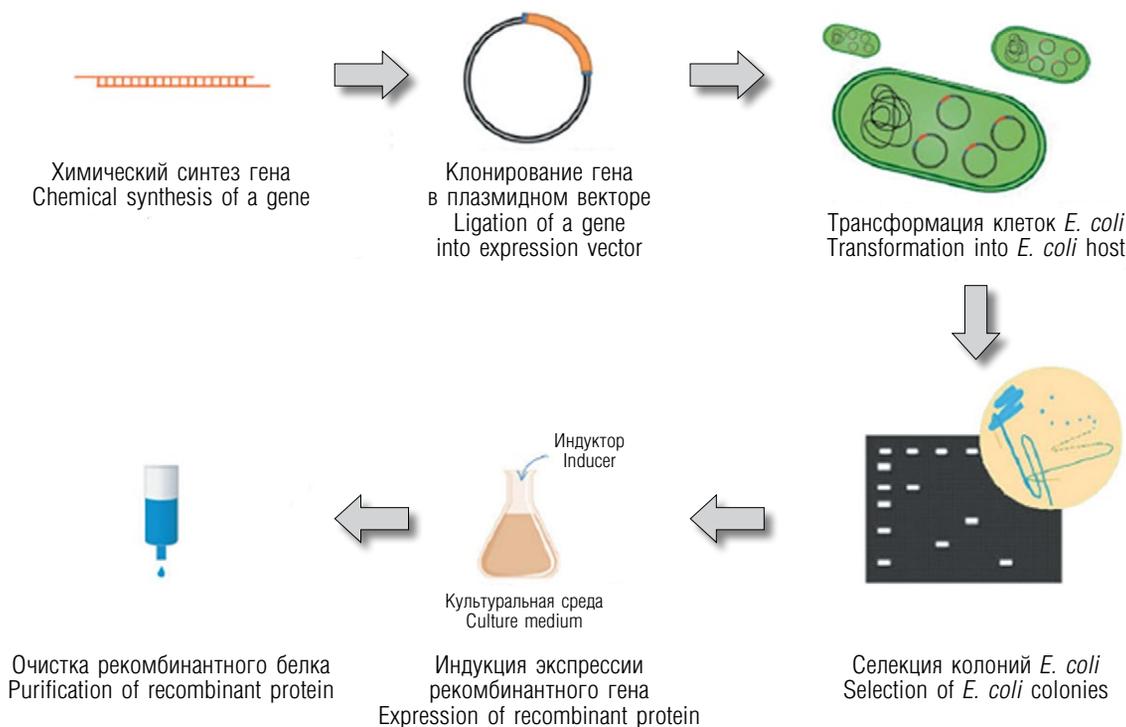


Рис. 1. Схема получения рекомбинантного белка [11]

Fig. 1. Scheme for producing recombinant protein [11]

трансформированных клонов клеток; их культивирование для наработки рекомбинантного белка и последующая очистка белка.

Перспективность ДНК-технологии для создания лекарственных препаратов не вызывает сомнений. В качестве классического примера успешного перехода от препарата, получаемого путем экстракции из тканей животных, к рекомбинантному можно привести инсулин человека. В 1922 г. Фридрих Бантинг и Чарлз Бест впервые успешно применили препарат инсулина, полученного из изолированной поджелудочной железы животного, для лечения инсулин-зависимых пациентов [12]. И вплоть до 1972 г. единственным доступным инсулином был препарат, получаемый в результате очистки из поджелудочной железы свиней и коров. Благодаря технологии рекомбинантной ДНК в 1982 г. удалось получить препарат рекомбинантного инсулина человека. Рекомбинантный инсулин человека обладает двумя явными преимуществами перед препаратом инсулина, полученным при экстракции из поджелудочной железы: существует практически неограниченный запас рекомбинантного белка, поскольку нет необходимости в сборе его источника, кроме того, рекомбинантный инсулин человека полностью идентичен природному инсулину человека. Рекомбинантный инсулин менее иммуногенен по сравнению с белком животного происхождения. Показано, что длительная терапия инсулином, выделенным из поджелудочной железы свиньи, может привести к возникновению аллергических реакций. В настоящее время доступно большое количество вариантов инсулина, отличающихся по времени действия в организме, также разрабатываются препараты с улучшенной эффективностью [13].

В последние годы все активнее развивается направление получения рекомбинантных энзимов [14]. Так, например, получена рекомбинантная L-аспарагиназа (ЕС 3.5.1.1), используемая в терапии острого лимфобластного лейкоза. Рекомбинантный фермент характеризуется высоким сродством к L-аспарагину и минимальной активностью по отношению к глутамину в качестве субстрата, период полувыведения в опытах *in vitro* составлял около 40 ч. В то же время, фермент продемонстрировал активность дегликозилирования, которая может создавать дополнительный барьер для пролиферирующих раковых клеток [15].

Кроме того, применение технологии рекомбинантной ДНК позволяет изучать молекулярные механизмы развития различных заболеваний. Мутация гена, кодирующего γ -саркогликан (SGCG), интегральный мембранный белок, ответственный за поддержание целостности

сарколеммы мышечных клеток, приводит к конечностно-поясничной мышечной дистрофии — врожденному заболеванию, терапии которого на данный момент не существует [16]. Получен полноразмерный белок SGCG в клетках *E. coli*, который используют для изучения патогенеза мышечной дистрофии конечностей и поясничного отдела и разработки этиотропной терапии [17].

Благодаря технологии рекомбинантной ДНК изучают физиологические функции разнообразных природных соединений, в результате чего появляются новые возможности их клинического применения. Так, например, антимикробные пептиды, в частности дефенсины и кателицидин человека, в экспериментах *in vitro* первоначально были охарактеризованы как бактерицидные агенты, но позднее оказалось, что они обладают иммуномодулирующими свойствами. Дефенсины человека модулируют иммунный ответ на чужеродные нуклеиновые кислоты, в частности, β -дефенсин 3 человека стимулирует синтез интерферона альфа в ответ на проникновение вирусной двуцепочечной ДНК. Изучение рекомбинантного β -дефенсина 3 человека в экспериментах *in vitro* с использованием клеточных линий — дендритных клеток мышцы и мононуклеарных клеток периферической крови человека — показало, что иммуномодулирующий эффект реализуется за счет активации Толл-подобных рецепторов 9 (TLR-9). Благодаря этому можно позиционировать β -дефенсин 3 человека как перспективный адъювант в составе вакцинных композиций [18].

Помимо производства рекомбинантных аналогов природных белков, технология рекомбинантной ДНК позволяет получать химерные белки с заданными свойствами [19, 20]. Активно идет разработка белковых препаратов с увеличенным временем полужизни, а также терапевтических и профилактических белков с повышенной эффективностью [21].

Около 30 % белковых лекарственных препаратов получают именно с использованием системы экспрессии на основе клеток *E. coli*. Существует, однако, и ряд ограничений и препятствий при применении данного типа продуцента, среди которых можно выделить необходимость очистки рекомбинантного белка от примесей других молекул штамма-продуцента (белки, ДНК и липополисахариды). Будучи высокоиммуногенными для человека, эти примеси в лекарственном препарате могут вызывать ряд нежелательных побочных явлений. В связи с этим количество примесных молекул необходимо строго контролировать и стандартизировать. Еще одна сложность,

с которой сталкиваются исследователи при разработке технологии производства рекомбинантного белка в клетках *E. coli*, заключается в получении его в нативной растворимой форме. При высоком уровне и скорости синтеза чужеродный белок в прокариотической клетке накапливается в виде агрегатов частично фолдированного белка — телец включения, которые в последующем необходимо подвергать рефолдингу с целью получения терапевтически активного компонента. Протоколы рефолдинга для каждого белка индивидуальны, и их следует тщательно разрабатывать.

Профилактические ДНК-вакцины

Другим перспективным подходом к разработке иммунобиологических препаратов является их получение на основе молекул ДНК. Схема производства препаратов на основе плазмидной ДНК в клетках *E. coli* похожа на схему получения рекомбинантного белка. Процесс получения также включает стадии синтеза гена, кодирующего терапевтический белок, клонирования гена в плазмидном векторе, трансформации компетентных клеток *E. coli*, селекции трансформантов, содержащих плазмиду, последующую наработку клеточной биомассы штамма — продуцента плазмидной ДНК и очистку плазмидной ДНК. Одним из основных отличий получения рекомбинантной плазмидной ДНК от белка является структура используемых векторов, которые кодируют антигены под контролем эффективных эукариотических промоторов, что обеспечивает синтез белка в клетках организма — реципиента лекарственного препарата. Клетки *E. coli* в данном случае служат для репликации плазмидной ДНК.

Уже несколько ДНК-вакцин были одобрены для использования в ветеринарии, в том числе вакцина против инфекционного некроза гемопоэтической ткани лосося, для терапии меланомы собак, профилактики лихорадки лошадей, вызванной вирусом Западного Нила [22]. В силу ряда причин на сегодняшний день пока ни одна из разрабатываемых ДНК-вакцин не лицензирована для применения у человека. Одна из таких причин состоит в относительно невысокой иммуногенности по сравнению с классически применяемыми вакцинами. Для устранения этого препятствия разрабатывается большое количество различных стратегий по усилению иммуногенности ДНК-вакцин. Они включают модификацию вакцинных векторов, оптимизацию кодонов, использование традиционных и молекулярных адъювантов, в том числе применение коэкспрессии антигена с молекулярным адъювантом, введение

ДНК-вакцин методом электропорации, стратегии прайм-буста.

Чтобы повысить эффективность иммунобиологического препарата на основе плазмидной ДНК, надо доставить ее внутрь клеток для индукции экспрессии антигена *in vivo*. В случае ДНК-вакцин это необходимо для презентации белкового антигена основными молекулами комплекса гистосовместимости (МНС) и распознавания иммунокомпетентными клетками. Антигены, синтезированные с генов, закодированных на плазмидной ДНК, активируют как МНС класса I, так и класса II, что позволяет стимулировать как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки [23].

Плазмидный вектор трансформирует миоциты, кератиноциты и дендритные клетки. Дендритные клетки способны самостоятельно осуществлять презентацию антигена, тогда как миоциты и кератиноциты реализуют этот процесс через перекрестные пути (рис. 2).

Экспрессией гена ДНК-вакцины обычно управляют промоторы полимеразы II типа. Эндогенные промоторы полимеразы II млекопитающих не так сильны, как вирусные промоторы, например цитомегаловируса (CMV) или SV40 (используемые, в частности, в векторах pcDNA3.1, pVAX1, pVIVO2, pCI, pCMV и pSV2). Промотор цитомегаловируса проявляет высокую активность в большинстве типов клеток, ввиду чего его широко применяют для разработки ДНК-вакцин. Исследования с использованием ДНК-вакцин, содержащих

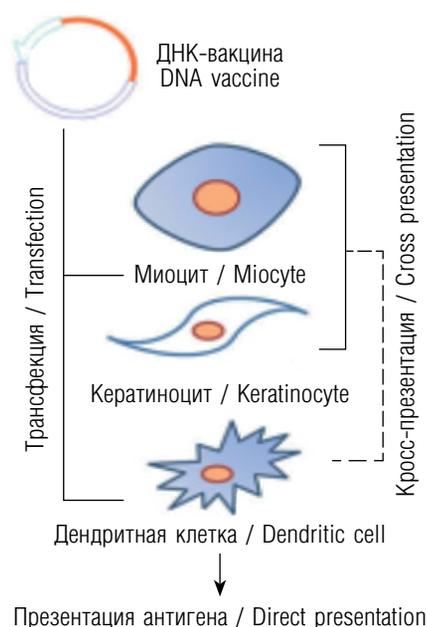


Рис. 2. Схематическое изображение действия ДНК-вакцины [24]

Fig. 2. Schematic representation of a DNA vaccine action [24]

ген *env* ВИЧ-1, показали, что более сильные промоторы индуцировали более активный синтез белка и формирование более мощных иммунных ответов [25]. Хотя вирусные промоторы эффективно стимулируют синтез вакцинного антигена, это не во всех случаях коррелирует с эффективностью вакцины. Причина заключается в том, что провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухолей α или интерферон γ , могут ингибировать вирусные промоторы. Было установлено, что промоторы главного комплекса гистосовместимости II класса не чувствительны к данным факторам [26]. Таким образом, несмотря на то, что промотор CMV, обеспечивающий высокий уровень экспрессии гена, остается основным при разработке большинства ДНК-вакцин, альтернативные промоторы могут повысить эффективность вакцинации. Следует также отметить, что не всегда оптимизация нуклеотидной последовательности путем замены редко встречающихся кодов приводит к увеличению эффективности вакцинации ДНК-плазмидами. Так, например, в ходе разработки ДНК-вакцины для профилактики малярии было показано, что нативная нуклеотидная последовательность антигена вызывала более мощный Т-клеточный ответ против *Plasmodium yoelii*, чем оптимизированная по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих [27]. Таким образом, при разработке ДНК-вакцин необходимо проводить сравнение эффективности оптимизированной и нативной последовательностей антигена.

Другим подходом к увеличению эффективности вакцинации с использованием плазмидной ДНК является совершенствование способов ее доставки в цитоплазму клетки. Для этих целей разрабатывают липосомы, которые представляют собой сферические везикулы, состоящие из липидного бислоя, включающего фосфолипиды и холестерин. Липосомы захватывают или связывают плазмидную ДНК и облегчают ее проникновение внутрь клетки [28]. Следует отметить, что при создании фармакологических препаратов, предназначенных для внутримышечного введения, с использованием липосом на основе плазмидной ДНК необходимо исключить их местно-раздражающее действие. Тем не менее они остаются перспективными кандидатами для разработки препаратов с целью использования на слизистых оболочках. Недавнее исследование на лабораторных мышцах линии C57BL/6 показало, что оральная вакцинация вектором на основе плазмидной ДНК pcDNA3.1, кодирующей ген белка M1 вируса гриппа А, инкапсулированной в катионные липосомы, вызывала как гуморальный,

так и клеточный иммунный ответ, в результате чего формировалась защита от респираторной инфекции [29]. Липосомы также оказались эффективны при интраназальной вакцинации лабораторных мышей линии Balb/c кандидатной вакциной против вируса восточного энцефалита лошадей на основе плазмидной ДНК pcDNA3.1, содержащей гены С, Е3, Е2, 6к и Е1 вируса [30].

ДНК-вакцины обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными вакцинами. Среди них особенности конструкции ДНК-вакцин, для создания которых, как правило, необходимо только одностадийное клонирование в плазмидный вектор. Это уменьшает их стоимость и время производства. Кроме того, экспрессия *in vivo* гена, управляемого эукариотическим промотором, и эндогенная посттрансляционная модификация приводят к формированию нативных белковых структур, что обеспечивает правильную иммунную презентацию. С точки зрения безопасности клонирование и синтез нуклеиновых кислот, кодирующих антиген, вместо его выделения из природных источников позволяют избежать использования патогенных микроорганизмов в производстве вакцин. С помощью технологии рекомбинантной ДНК можно проводить практически любой вид молекулярных манипуляций с плазмидной ДНК, среди которых внесение мутаций в ген *in vitro*, позволяющее быстро изменить дизайн антигенов. Эта особенность очень важна при разработке профилактических препаратов против таких патогенов, как вирус гриппа, для которого характерна высокая изменчивость в силу антигенного дрейфа. Плазмидная ДНК характеризуется хорошими показателями безопасности, не вызывая раздражающего действия в месте инъекции, что является наиболее распространенным побочным эффектом препаратов для внутримышечного введения. Плазмидная ДНК стабильна при комнатной температуре, поэтому нет необходимости в организации холодовой цепи во время ее транспортировки и специальных средствах для хранения [31].

Профилактические РНК-вакцины

Несколько лет назад мРНК была признана новым классом терапевтических соединений со своей собственной международной номенклатурой [32]. На основе РНК разрабатывают вакцины, индуцирующие иммунный ответ против патогенов и опухолевых клеток [33]. Это направление появилось совсем недавно. Были разработаны новые методологические подходы, связанные

с особенностями молекул РНК, а именно их нестабильностью и быстрой деградацией в организме млекопитающих, необходимостью эффективного способа доставки в клетки для осуществления процесса трансляции, а также с решением проблем, вызванных возникновением мощного провоспалительного ответа при введении РНК. В прошедшем десятилетии последняя из перечисленных проблем была в значительной степени преодолена путем включения в состав вакцинной последовательности РНК модифицированных нуклеозидов, оптимизации последовательности РНК, тщательной очистки от побочных продуктов (в особенности двуцепочечной РНК — дцРНК), что позволило снизить токсичность терапевтической мРНК и увеличить степень ее трансляции в организме [34].

Структура РНК-вакцин включает открытую рамку считывания, которая кодирует антиген, и фланкирующие ее последовательности: 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR) по обе стороны от открытой рамки считывания, 5'-концевой 7-метилгуанозиновый кэп и 3'-полиадениловый хвост (полиА). Эти элементы необходимы для максимизации скорости трансляции и/или персистенции вектора в трансформированных клетках в результате взаимодействий с регуляторными белками, другими РНК и метаболитами [34]. РНК-вакцины могут быть как в виде нереплицирующегося вектора, так и в форме самовоспроизводящегося репликона [35]. Конструкция самовоспроизводящихся векторов содержит дополнительные вирусные элементы, ответственные за репликацию [36]. Получают РНК-репликоны путем замены структурных генов одноцепочечных РНК-вирусов (например, альфавирусов, флавивирусов, пикорнавирусов) на ген целевого антигена при сохранении неструктурных генов, которые отвечают за синтез белков, обеспечивающих репликацию. Основное преимущество этого подхода по сравнению с использованием нереплицирующихся мРНК заключается в том, что благодаря самовоспроизведению вектора *in vivo* наблюдается высокий уровень экспрессии целевого антигена. Введение таких векторов запускает иммунный ответ, наиболее близкий к таковому в условиях естественной инфекции, — вакцинный вектор начинает реплицироваться в клетке-хозяине, образуя двуцепочечные РНК-интермедиаты, которые являются лигандом Толл-подобного рецептора-3 (TLR-3). Передача сигнала через TLR-3 приводит к выработке интерлейкина-12, который представляет собой цитокин, вызывающий синтез интерферонов, активирующих ответ Т-хелперов 1, а затем и цитотоксических

Т-клеток [37]. Однако к настоящему времени не разработана технология получения таких молекул с большим выходом, поскольку они существенно превосходят по размерам нереплицирующиеся векторы. Помимо прочего, РНК-вакцины на основе самовоспроизводящегося репликона также подвержены ферментативному расщеплению при введении в организм, а из-за гидрофильной природы и высокой молекулярной массы возникает проблема эффективной системы доставки в цитоплазму клеток [38].

Доставка РНК в цитоплазму клетки — необходимое условие синтеза целевого антигена. Эта задача решается путем разработки молекул-носителей, которые защищают мРНК от быстрой деградации и доставляют ее в цитоплазму без проявления значительного токсического эффекта. Существуют вирусные и невирусные системы доставки РНК. Несмотря на эффективность вирусных систем в плане доставки нуклеиновых кислот внутрь клетки, их применение может быть ограничено в силу возможности возникновения иммунного ответа на вирусный вектор [39]. Невирусные способы доставки подразумевают ассоциирование мРНК с молекулами-переносчиками, а именно липидами, полимерами и пептидами. Все они показали перспективность в доклинических и некоторых клинических исследованиях [40]. При разработке полимерных носителей молекул РНК первоначально был успешно использован полиэтиленимин, но в настоящее время доступны лишь данные доклинических исследований с его применением. Совсем недавно разработаны липид-содержащие полимеры, названные CARTs (высвобождающие переносчики, изменяющие заряд), которые способны доставлять мРНК напрямую в Т-лимфоциты, что делает их весьма перспективными при разработке противоопухолевых препаратов [41]. В настоящее время наиболее часто применяемым способом доставки мРНК являются липидные наночастицы. В экспериментах на лабораторных мышах было показано, что инкапсулированная в липидные наночастицы мРНК эффективно транскрибируется *in vivo* при различных способах введения в организм [42].

В то время как вакцины на основе нуклеиновых кислот в целом демонстрируют значительные преимущества перед традиционными вакцинами с точки зрения безопасности, индукции как В-, так и Т-клеточных ответов, мРНК-вакцины обладают преимуществами по сравнению с вакцинами на основе ДНК [43]. Методологическая проблема, связанная с ДНК-вакцинами, заключается в обеспечении эффективной доставки в ядро клетки,

где происходит транскрипция антигена. Кроме того, ДНК-вакцины несут потенциальный риск интеграции в геном хозяина, что может привести к инсерционному мутагенезу. У вакцин на основе мРНК подобные риски отсутствуют, поскольку их воспроизводство происходит в цитоплазме клетки [44]. Относительно короткий период полураспада приводит к временной и более контролируемой экспрессии кодируемого антигена. Кроме того, мРНК может быть получена в бесклеточной среде путем транскрипции *in vitro* (IVT), тем самым удается избежать использования бактериальных клеток, в результате чего устраняются проблемы, связанные с присутствием примесей молекул штамма-продуцента. Это обеспечивает простую очистку и удешевляет производство препарата [37]. Все это делает РНК перспективной платформой для разработки лекарственных препаратов.

Терапевтические препараты на основе нуклеиновых кислот

Секвенирование генома человека и изучение роли тех или иных генов в патогенезе заболеваний послужило стимулом для разработки терапевтических препаратов на основе нуклеиновых кислот. Одним из значительных преимуществ препаратов на основе ДНК и РНК перед классическими низкомолекулярными лекарственными средствами является их более избирательное распознавание молекулярных мишеней, что придает их действию строгую специфичность. Эти препараты, использованные как при остром течении заболеваний, так и для их профилактики и терапии на ранней стадии, способствуют предотвращению прогрессирования патологических процессов и развитию осложнений. Генная терапия включает коррекцию дефектного гена путем введения и экспрессии его правильной копии, что выражается в синтезе одного необходимого белкового продукта. Точно так же препараты, основанные на нуклеиновых кислотах, предназначенные для генетической абляции, препятствуют экспрессии определенных генов, что обеспечивает специфичность контроля заболевания. Кроме того, негативные побочные эффекты генной терапии могут быть сведены к минимуму по сравнению с классическими фармацевтическими препаратами, которые, как правило, менее специфичны и, как следствие, оказывают менее выраженное системное действие на организм.

За последние несколько десятилетий общепринятая концепция о роли РНК в обеспечении процесса синтеза белка изменилась, теперь считают, что РНК можно применять

и в терапевтических целях. Благодаря реализации двух международных проектов — «Функциональная аннотация генома млекопитающих» (FANTOM) и «Энциклопедия элементов ДНК» (ENCODE) — было установлено, что менее чем 2 % генома млекопитающих отвечает за синтез белка, а почти 98 % — транскрибируется в не кодирующую белок РНК, называемую некодирующей РНК (нкРНК), которая играет регуляторную роль при реализации молекулярных и клеточных функций, контролируя экспрессию генов [45]. нкРНК классифицируется на длинную некодирующую РНК (lncRNA), короткую некодирующую РНК (sncRNA) и трансляционную/структурную РНК, которые выполняют разные функции. Было показано, что нкРНК влияет на процессы транскрипции, трансляции, а также посттрансляционные модификации. Некодирующие РНК регулируют экспрессию гена как в норме, так и при патологии, модулируя развитие и прогрессирование заболевания [46]. Характеристика последовательностей, кодирующих нкРНК, и расшифровка механизмов их действия может помочь в диагностике заболевания, изучении его развития и разработке специфических методов терапии. В силу уникальности механизмов действия нкРНК они представляют перспективные мишени для разработки нового класса терапевтических препаратов. Некодирующие РНК могут проявлять терапевтический эффект при различных заболеваниях путем расщепления мРНК благодаря присутствию в составе их последовательности антисмысловых олигонуклеотидов, формирования дуплексов с ДНК, альтернативного сплайсинга, редактирования РНК, модификации хроматина, модуляции транскрипции, трансляции, маскирования РНК, сайленсинга генов.

Терапевтические препараты на основе нуклеиновых кислот включают плазмидные ДНК, кодирующие белки для генной терапии, олигонуклеотиды, рибозимы, ДНКзимы, аптамеры и небольшие интерферирующие РНК (миРНК). Хотя большинство препаратов на основе нуклеиновых кислот находятся на ранних стадиях клинических испытаний, они являются перспективными кандидатами для разработки терапевтических препаратов против широкого круга заболеваний, включая онкологические, неврологические (такие как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера), а также сердечно-сосудистые. Цель генной терапии — достижение долговременной и эффективной экспрессии введенного гена на терапевтическом уровне. При этом существуют различные варианты. Так, можно ввести нормальную копию мутированного гена, внести изменения

в нуклеотидную последовательность или подавить экспрессию гена, ответственного за возникновение заболевания.

Цель введения гена состоит в восстановлении нормальной клеточной функции путем внедрения функционирующей копии гена без влияния на мутантный, который будет оставаться в клетке. Примерами данного подхода служат терапия таких заболеваний, как спинальная мышечная атрофия [47], первичные иммунодефициты и др. Например, при болезни Хантингтона клеточная функция теряется в результате накопления дефектного белка. В этом случае подавляют гены с целью восстановления нормальной функции клеток путем снижения экспрессии мутированного гена через РНК-интерференцию. Еще одним подходом генной терапии является редактирование гена. Хотя для редактирования генома не обязательно использование нуклеазы, эффективность ген-специфического редактирования в клетках млекопитающих обычно усиливается за счет индукции двуцепочечного разрыва ДНК в сайте-мишени. Выбор одного из механизмов репарации ДНК будет определять результат редактирования генома. После разрыва ДНК может соединиться с негомологичным концом, поэтому существует вероятность нокдауна гена. В присутствии экзогенной матрицы функционального гена репарация ДНК может привести к коррекции мутантного гена с помощью гомологичной рекомбинации. Третий потенциальный результат — вставка ДНК-матрицы через негомологичное соединение концов, что приведет к добавлению нуклеотидной последовательности в ген [48] (рис. 3).

На сегодняшний день ряд генотерапевтических препаратов одобрен для применения

в Европе и США. Среди них лицензированный в 2012 г. Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency — EMA) препарат Glybera для терапии семейного дефицита липопротеинлипазы, основанный на аденоассоциированном вирусе [49]. В 2015 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration — FDA) был одобрен препарат IMLYGIC, представляющий собой генетически модифицированный вирус герпеса типа 1, предназначенный для местного лечения неоперабельных поражений у пациентов с меланомой. В 2016 г. препарат Strimvelis на основе γ-ретровируса для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита, вызванного дефицитом аденозин-деаминазы (ADA-SCID), получил одобрение EMA [50]. В 2017 г. FDA одобрило три генотерапевтических препарата. KYMRIAH и YESCARTA направлены на CD19⁺ Т-лимфоциты и предназначены для терапии лимфомы. KYMRIAH также показан для лечения острого лимфобластного лейкоза [51, 52]. LUXTURNА — препарат на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса для терапии наследственной дистрофии сетчатки, вызванной мутацией RPE-65 (IRD-RPE-65) [53]. В 2018 г. FDA был одобрен препарат на основе коротких интерферирующих РНК, инкапсулированных в липидные наночастицы. Препарат предназначен для лечения полиневропатий, ассоциированных с наследственным аутосомно-доминантным заболеванием транстретиновым амилоидозом, которое вызывает поражение периферической нервной системы и внутренних органов [54].

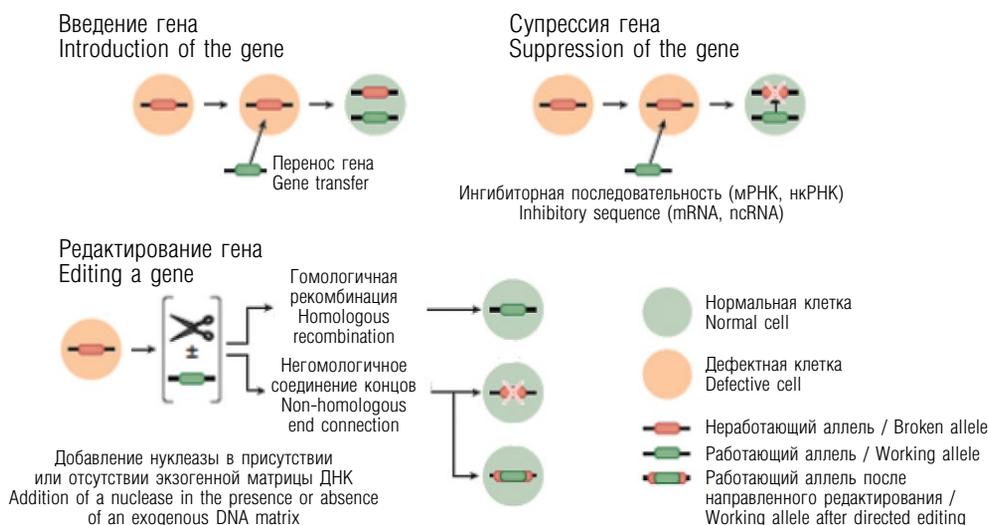


Рис. 3. Схематическое изображение принципов генной терапии [по 48]

Fig. 3. Schematic representation of the principles of gene therapy [48]

Закключение

Разработка методов генной инженерии и создания рекомбинантных молекул ДНК стимулировали развитие наук о жизни. Благодаря мощным инструментам технологии рекомбинантных ДНК, совершенствование которых активно продолжается последние десятилетия, манипулирование ДНК вошло в обычную практику. Клонирование генов стало относительно простым, что привело к прорыву в понимании патогенеза многих заболеваний, способов их диагностики, профилактики и терапии.

Современные методы генной инженерии позволяют получать природные белки в количествах, не лимитированных наличием их природного источника, без использования патогенных микроорганизмов. С помощью химерных молекул получают препараты с заданными свойствами.

Большой интерес к созданию препаратов на основе ДНК и РНК, наблюдающийся в последние годы, открывает перспективу разработки не только инновационных лекарственных средств при лечении различных типов патологии, но и методик устранения причин заболеваний, вызванных мутациями генов.

Все описанные методологические подходы обладают определенными преимуществами и характеризуются некоторыми ограничениями в применении. Выбор платформы для разработки того или иного лекарственного препарата в большой степени зависит от конкретной задачи, стоящей перед исследователем.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Araki E, Araki H, Senokuchi T, Motoshima H. New perspectives on the insulin therapy. *J Diabetes Investig.* 2020;11(4):795-797. <https://doi.org/10.1111/jdi.13263>.
- Richmond E, Rogol AD. Treatment of growth hormone deficiency in children, adolescents and at the transitional age. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(6):749-755. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.11.005>.
- Razaghi A, Owens L, Heimann K. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *J Biotechnol.* 2016;240:48-60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>.
- Raso S, Hermans C. Recombinant factor VIII: past, present and future of treatment of hemophilia A. *Drugs Today (Barc).* 2018;54(4):269-281. <https://doi.org/10.1358/dot.2018.54.4.2800622>.
- Ladisch MR, Kohlmann KL. Recombinant human insulin. *Biotechnol Prog.* 1992;8(6):469-478. <https://doi.org/10.1021/bp00018a001>.
- Goryaev AA, Savkina MV, Obukhov YI, et al. DNA and RNA vaccines: Current status, quality requirements and specific aspects of preclinical studies. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2019;19(2):72-80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-72-80>.
- Porter KR, Raviprakash K. DNA vaccine delivery and improved immunogenicity. *Curr Issues Mol Biol.* 2017;22:129-138. <https://doi.org/10.21775/cimb.022.129>.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science.* 1990;247(4949 Pt 1):1465-1468. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>.
- Kaczmarek JC, Kowalski PS, Anderson DG. Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. *Genome Med.* 2017;9(1):60. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0450-0>.
- Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, et al. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(7):953-962. <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>.
- Huang W, Rollett A, Kaplan DL. Silk-elastin-like protein biomaterials for the controlled delivery of therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(5):779-791. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.989830>.
- Barfoed HC. Insulin production technology. *Chem Eng Prog.* 1987;83:49-54.
- Insulin. B LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.
- Arbige MV, Shetty JK, Chotani GK. Industrial enzymology: The next chapter. *Trends Biotechnol.* 2019;37(12):1355-1366. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.010>.
- Sindhu R, Manonmani HK. Expression and characterization of recombinant L-asparaginase from pseudomonas fluorescens. *Protein Expr Purif.* 2018;143:83-91. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.09.009>.
- Шнайдер Н.А., Николаева Т.Я., Бороева Е.Н., и др. Конечностно-поясная мышечная дистрофия с аутосомно-доминантным типом наследования: пельвиофemorальная форма Лейдена – Мебиуса // Нервно-мышечные болезни. – 2013. – № 1. – С. 46–61. [Shnyder NA, Nikolayeva TY, Boroeva EN, et al. Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: Leyden-Möbius pelvifemoral form. *Neuromuscular Diseases.* 2013;(1):46-61. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2013-01-46-61>.
- Jamaladdine M, Harris MS, Liyanage L, et al. Expression, purification, and structural analysis of the full-length human integral membrane protein γ -Sarcoglycan. *Protein Expression and Purification.* 2019;167:105525. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105525>.
- Ferris LK, Mburu YK, Mathers AR, et al. Human beta-defensin 3 induces maturation of human langerhans cell-like dendritic cells: An antimicrobial peptide that functions as an endogenous adjuvant. *J Invest Dermatol.* 2013;133(2):460-468. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.319>.
- Prejit N, Pratheesh PT, Nimisha S, et al. Expression and purification of an immunogenic SUMO-OmpC fusion protein of salmonella typhimurium in *Escherichia coli*. *Bio-*

- logicals*. 2019;62:22-26. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2019.10.010>.
20. Singh SK, Thrane S, Chourasia BK, et al. Pfs230 and Pfs48/45 fusion proteins elicit strong transmission-blocking antibody responses against plasmodium falciparum. *Front Immunol*. 2019;10:1256. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01256>.
 21. Kim TY, Park JH, Shim HE, et al. Prolonged half-life of small-sized therapeutic protein using serum albumin-specific protein binder. *J Control Release*. 2019;315:31-39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.017>.
 22. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: Ready for prime time? *Nat Rev Genet*. 2008;9(10):776-788. <https://doi.org/10.1038/nrg2432>.
 23. Liu MA. DNA vaccines: An historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*. 2011;239(1):62-84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x>.
 24. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(3):313-329. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762>.
 25. Wang S, Farfan-Arribas DJ, Shen S. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*. 2006;24(21):4531-4540. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.023>.
 26. Vanniasinkam T, Reddy ST, Erel HC. DNA immunization using a non-viral promoter. *Virology*. 2006;344(2):412-420. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.040>.
 27. Dobano C, Sedegah M, Rogers WO, et al. Plasmodium: Mammalian codon optimization of malaria plasmid DNA vaccines enhances antibody responses but not T cell responses nor protective immunity. *Exp Parasitol*. 2009;122(2):112-123. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.010>.
 28. Karkada M, Weir GM, Quinton T, et al. A liposome-based platform, VacciMax, and its modified water-free platform DepoVax enhance efficacy of *in vivo* nucleic acid delivery. *Vaccine*. 2010;28(38):6176-6182. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.025>.
 29. Liu J, Wu J, Wang B. Oral vaccination with a liposome-encapsulated influenza DNA vaccine protects mice against respiratory challenge infection. *J Med Virol*. 2014;86(5):886-894. <https://doi.org/10.1002/jmv.23768>.
 30. Ma J, Wang H, Zheng X. CpG/Poly (I:C) mixed adjuvant priming enhances the immunogenicity of a DNA vaccine against eastern equine encephalitis virus in mice. *Int Immunopharmacol*. 2014;19(1):74-80. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.01.002>.
 31. Gary EN, Weiner DB. DNA vaccines: Prime time is now. *Curr Opin Immunol*. 2020;65:21-27. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.006>.
 32. International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). *WHO Drug Information*. 2015;29(2):113.
 33. Qadir MI, Bukhat S, Rasul S, et al. RNA therapeutics: Identification of novel targets leading to drug discovery. *J Cell Biochem*. 2020;121(2):898-929. <https://doi.org/10.1002/jcb.29364>.
 34. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol*. 2020;65:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.008>.
 35. Brito LA, Kommareddy S, Maione D. Self-amplifying mRNA vaccines. *Adv Genet*. 2015;89:179-233. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2014.10.005>.
 36. Ulmer JB, Mason PW, Geall A, et al. RNA-based vaccines. *Vaccine*. 2012;30(30):4414-4418. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.060>.
 37. Iavarone C, O'hagan DT, Yu D, et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(9):871-881. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1355245>.
 38. Anderluzzi G, Lou G, Gallorini S, et al. Investigating the impact of delivery system design on the efficacy of self-amplifying RNA vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2):E212. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020212>.
 39. Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, et al. Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):E102. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020102>.
 40. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the messenger: Advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Mol Ther*. 2019;27(4):710-728. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.012>.
 41. McKinlay CJ, Benner NL, Haabeth OA, et al. Enhanced mRNA delivery into lymphocytes enabled by lipid-varied libraries of charge-altering releasable transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(26):E5859-E5866. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805358115>.
 42. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015;217:345-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>.
 43. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(4):261-279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.
 44. Jahanafrooz Z, Baradaran B, Mosafer J, et al. Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. *Drug Discov Today*. 2020;25(3):552-560. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.003>.
 45. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>.
 46. Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: Genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*. 2013;154(1):26-46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.020>.
 47. Arnold ES, Fischbeck KH. Spinal muscular atrophy. *Handb Clin Neurol*. 2018;148:591-601. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00038-7>.
 48. Anguela XM, High KA. Entering the modern era of gene therapy. *Annu Rev Med*. 2019;70:273-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>.
 49. Gaudet D, Merthot J, Derry S, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: An open-label trial. *Gene Ther*. 2013;20(4):361-369. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.43>.
 50. Schimmer J, Breazzano S. Investor outlook: Rising from the ashes; GSK's European approval of Strimvelis for ADA-SCID.

- Hum Gene Ther Clin Dev.* 2016;27(2):57-61. <https://doi.org/10.1089/humc.2016.29010.ind>.
51. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2018; 378(5):439-448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>.
52. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-2544. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707447>.
53. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: A randomised, controlled, open-label, Phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390(10097):849-860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8).
54. Akinc A, Maier MA, Manoharan M, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol.* 2019;14(12):1084-1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.

Сведения об авторах / Information about the authors

Елена Григорьевна Богомолова — канд. биол. наук, научный сотрудник, отдел патологии и патологической физиологии. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-4047-4086>. SPIN-код: 8721-0220. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

Павел Максимович Копейкин — младший научный сотрудник, отдел патологии и патологической физиологии. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». <https://orcid.org/0000-0002-6076-8842>. SPIN-код: 9691-3484. E-mail: pmkopeikin@mail.ru.

Андрей Азисович Тагаев — старший научный сотрудник. ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва. <https://orcid.org/0000-0001-8986-5825>. AuthorID: 85858. E-mail: andtag@ibch.ru.

Elena G. Bogomolova — PhD, Researcher, Department of Pathology and Pathological Physiology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-4047-4086>. SPIN-code: 8721-0220. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

Pavel M. Kopeykin — Junior Researcher, Department of Pathology and Pathological Physiology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-6076-8842>. SPIN-code: 9691-3484. E-mail: pmkopeikin@mail.ru.

Andrey A. Tagaev — Senior Researcher. Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-8986-5825>. AuthorID: 85858. E-mail: andtag@ibch.ru.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Елена Григорьевна Богомолова / Elena G. Bogomolova
E-mail: bogomolovaele@inbox.ru