

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2013

А. Шнайдер¹, А. Вагнер¹, Е. Е. Давыдова¹, А. С. Смирнов¹, И. Н. Глазков¹,
М. М. Шегай², Д. В. Глазкова³

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПРОТИВ ВИЧ (ОБЗОР)

¹ ООО "МедФармОткрытие", 123154, Москва, бульвар Генерала Карбышева д. 5, кор. 2, Россия
тел. +7 (495) 920 86 09, e-mail: schneider@mphd.ru;

² Институт медико-биологических проблем РУДН, 115093, Москва, ул. Подольское шоссе,
д. 8, стр. 5, Россия;

³ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва,
ул. Новогиреевская, 3А, Россия

Рассмотрены возможности применения генной терапии для внесения в клетки пациента трансгенов, экспрессирующих анти-ВИЧ агенты, влияющие, аналогично высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), на жизненный цикл вируса. Описаны анти-ВИЧ агенты на основе различных типов РНК (рибозимы, антисмысловые РНК, аптамеры РНК, РНК-приманки, малые интерферирующие РНК) и белковые агенты, такие как RevM10, внутриклеточные антитела и интракины. Как показали результаты первых клинических испытаний, одна из основных проблем генной терапии — поддержание в модифицированных клетках необходимого уровня анти-ВИЧ активности. Известны несколько генотерапевтических стратегий подавления экспрессии корецептора хемокина CCR5, но со временем активность интегрированных в геном анти-CCR5 агентов затухает ("сайленсинг генов"). Особое внимание уделено разработке метода лечения ВИЧ-инфицированных клеток с использованием *tre*-рекомбиназных агентов. Предварительные эксперименты показали, что использование данных препаратов приводит к удалению интегрированной провирусной ДНК вируса из генома в клеточных линиях и в экспериментах на мышах. Это важный шаг, позволяющий уничтожить скрытые резервуары вируса и полностью искоренить его из организма. Сделан вывод о том, что генная терапия станет важнейшей темой научных фармацевтических разработок на долговременную перспективу, так как потенциально способна обеспечить эффективное лечение или даже полное излечение ВИЧ-инфекции после однократного применения препарата.

Ключевые слова: генная терапия; ВИЧ-инфекция.

ВИЧ-инфекция является тяжелым, потенциально смертельным заболеванием. В последние два десятилетия возможности высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) позволили значительно улучшить качество жизни людей, живущих с ВИЧ. Действие применяемых лекарственных средств заключается в подавлении репликации вируса, которая непосредственно связана с его жизнедеятельностью. Жизненный цикл ВИЧ достаточно хорошо изучен. Он состоит из нескольких этапов (рис. 1).

ВИЧ способен проникать в клетки макрофагов, моноцитов и Т-лимфоцитов, имеющих на поверхности определенные рецепторы. Для первичного закрепления на поверхности клетки вирусный поверхностный гликопротеин gp120 связывается с рецептором CD4. Образовавшийся комплекс связывается далее с корецепторами CCR5 или CXCR4. В результате изменяется конформация вирусного трансмембранного гликопротеина gp41, что позволяет ему проникнуть в клеточную мембрану. Затем вирусные частицы сливаются с мембраной и инфицируют клетку (рис. 2).

Препараты ВААРТ могут подавлять жизненный цикл ВИЧ на разных этапах. Некоторые препараты ВААРТ группы ингибиторов связывания и проникновения вируса в клетку способны конкурентно связываться с корецептором CCR5, например действующее вещество — маравирик [1], другие взаимодействуют с вирусным трансмембранным гликопротеином gp41, например — энфувиртид [2]. В результате использования таких препаратов вирус теряет возможность проникать в клетку хозяина. Широко известны препараты других групп действия — ингибиторы обратной транскриптазы (нуклеозидные и нуклеотидные), ингибиторы интегразы и протеазы.

Типичные схемы лечения обычно включают одновременное применение нескольких препаратов, что связано с высокой мутагенностью вируса и его способностью достаточно быстро вырабатывать резистентность к однокомпонентной терапии. Часто назначают 3 препарата, при этом применяют 2 нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы в сочетании с одним препаратом ингибитора протеазы или с одним

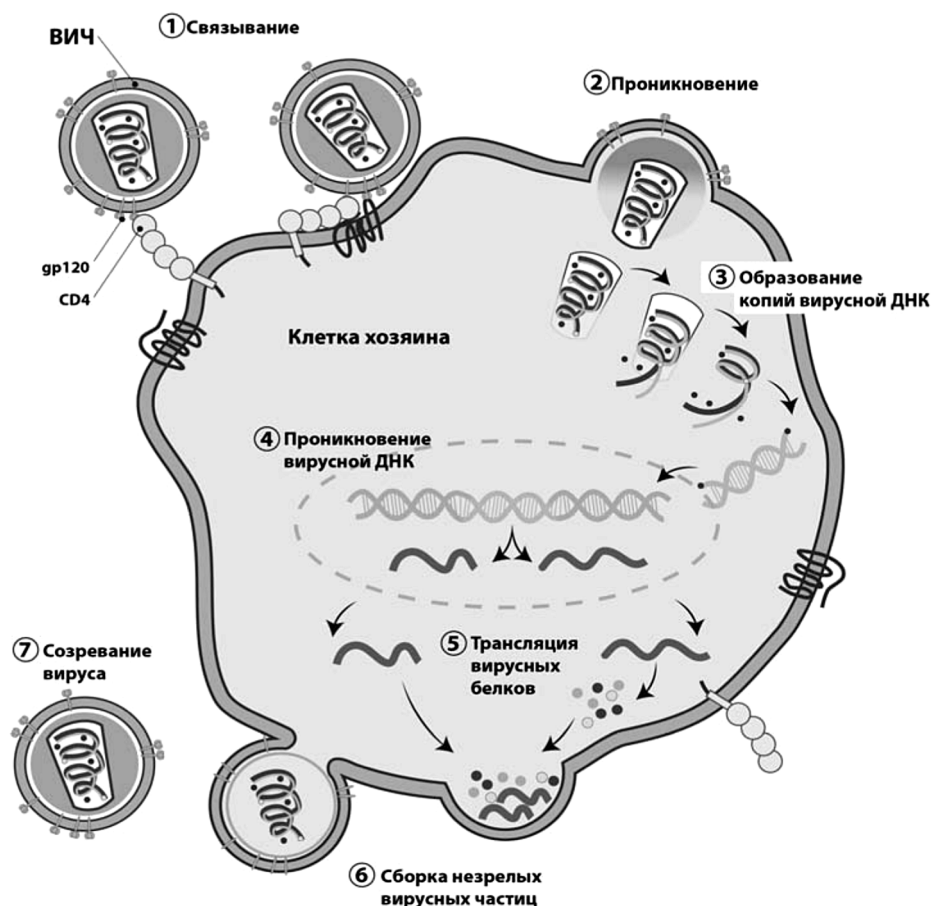


Рис. 1. Жизненный цикл ВИЧ: 1) связывание частицы ВИЧ с поверхностью клетки-хозяина; 2) проникновение вирусной РНК, обратной транскриптазы, интегразы и других вирусных белков в клетку-хозяина; 3) образование копий вирусной ДНК путем обратной транскрипции; 4) проникновение вирусной ДНК через ядро и интеграция в геном хозяина; 5) трансляция вирусных белков на свежесинтезированной РНК; 6) движение вирусной РНК и белков к клеточной стенке, сборка незрелых вирусных частиц; 7) созревание вируса за счет модификации белков капсида вирусной протеазой.

препаратом нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы [3]. Подобные схемы позволяют эффективно подавлять вирус, но существует ряд недостатков, обусловленных необходимостью пожизненной ежедневной терапии. В первую очередь прием препаратов ВААРТ приводит к возникновению у пациентов со временем побочных эффектов, вызванных кумулятивной токсичностью. Более того в России многие пациенты, особенно потребители инъекционных наркотиков, часто живут в условиях, которые не позволяют им регулярно и своевременно получать ВААРТ-терапию. По неутешительной статистике в 2013 г. в России только 140 000 из 780 000 зарегистрированных ВИЧ-положительных пациентов получали ВААРТ. В результате нерегулярного или в недостаточных дозах приема вирус вырабатывает резистентность, появляются и распространяются штаммы вируса, устойчивые по отношению к препаратам нескольких классов. Если пациент инфицируется таким мультирезистентным штаммом ВИЧ, подобрать эффективный вариант терапии будет очень затруднительно.

Постоянно ведется поиск менее токсичных и эффективных ингибиторов жизненного цикла ВИЧ [4], однако необходимость в новых более эффективных

способах борьбы с вирусом по-прежнему очень актуальна.

1. Возможности генной терапии

Генная терапия, впервые разработанная для лечения наследственных моногенных патологий, имеет сегодня большой потенциал в области лечения приобретенных заболеваний, в том числе ВИЧ/СПИД. Даже однократное применение препаратов, вызывающих образование устойчивых к ВИЧ CD4⁺ лимфоцитов, позволяет значительно снизить вирусную нагрузку и дает возможность полного излечения от инфекции.

Уже одобрено для массового применения 3 генно-терапевтических препарата ("Глибера" ЕС; "Гендизин", Китай; "Неоваскулген", Россия). Россия, Китай и США входят в число формальных лидеров по разработкам подобных препаратов, наибольшее число разработок сосредоточено в США.

Согласно аналитическому прогнозу лаборатории геномных и протеомных исследований ФГАОУ ВПО "Балтийский федеральный университет (БФУ) им. Канта", при стабильном экономическом росте не менее 3 % в год и дальнейшей реализации плана меро-

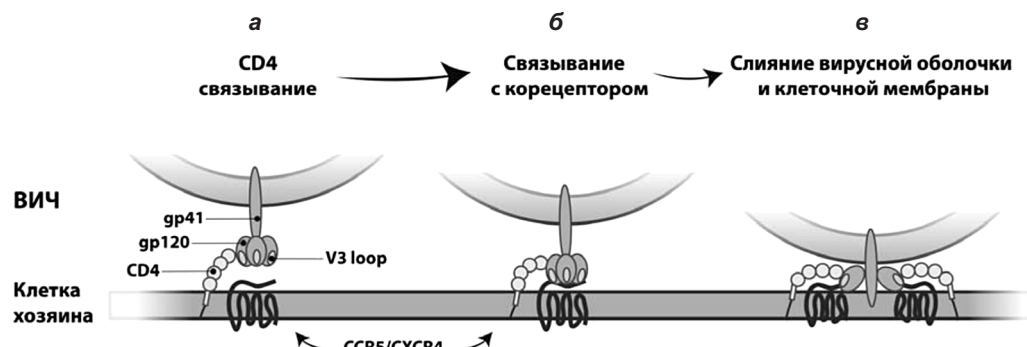


Рис. 2. Проникновение ВИЧ в клетку-хозяина: *а*) CD4-связывание, вирусный поверхностный гликопротеин gp120 связывается с рецептором CD4 на поверхности клетки; *б*) связывание с корецептором, gp120 связывается с корецептором CCR5 или CXCR4 и претерпевает конформационные изменения; *в*) слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны, гидрофобная часть трансмембранного гликопротеина gp41 ВИЧ связывается с клеточной мембраной, инициируется слияние вируса с клеткой.

приятый по развитию генной терапии можно ожидать, что к 2025 г. РФ выведет на открытый рынок не менее 30 генно-терапевтических препаратов [5]. При этом объем рынка российских препаратов составит от 22 до 40 млрд долларов США к 2030 г.

Генная терапия определяется как введение трансгена, кодирующего РНК или белковые агенты, в клетки пациентов с помощью векторов переноса. Используемые в генной терапии основные типы векторов приведены в табл. 1 [6].

По своей природе все клетки в организме человека содержат генетический материал, что делает их потенциальной мишенью для генной терапии. Однако эти клетки могут быть разделены на 2 основные категории: соматические, к которым принадлежит большинство клеток тела, и зародышевые (половые) клетки, к которым относятся яйцеклетки и сперматозоиды. Теоретически подвергнуть генетическим изменениям можно как соматические, так и половые клетки.

Использование генной терапии на уровне зародышевых клеток приводит к постоянным изменениям, передающимся по наследству последующим поколениям. Привлекательность этого подхода заключается в появлении постоянного терапевтического эффекта не только у пациента, но и у его потомков, наследующих целевой ген-мишень. В результате можно полностью и навсегда искоренить заболевание в конкретной семье, и в конечном итоге у всего населения в целом. Однако обоснованность использования генной терапии на уровне зародышевых клеток рождает серьезные споры. Искусственное изменение генома путем введенных в зародышевые клетки постоянных генетических модификаций может на практике оказать непредсказуемое побочное действие на здоровье человека и более того, вызвать драматические последствия для будущих поколений. Но основная проблема в другом: помимо озабоченности по поводу технических аспектов, генотерапия зародышевых клеток рассматривается и широко обсуждается как “игры в Бога” [7].

Применение генной терапии к соматическим клеткам рассматривается как более консервативный и безопасный подход, поскольку генетической модифи-

кации подвергаются только целевые клетки пациента. Соматические клетки нерепродуктивны и измененная генетическая информация не передается будущим поколениям. Другими словами, терапевтический эффект заканчивается на человеке, который получает лечение.

Основная проблема терапии на уровне соматических клеток — недолговечность терапевтического эффекта. Клетки большинства тканей в конечном счете умирают и заменяются новыми, поэтому постоянно необходимы повторные курсы лечения на протяжении всей жизни пациента. Введения генетической информации в клетки-мишени или ткани пациента также сопряжено с рядом проблем. Но, несмотря на сложности, все ведущиеся на сегодняшний день разработки нацелены именно на изменение соматических клеток. Главное преимущество генной терапии соматических клеток — воздействие только на часть клеток (клетки-мишени) фактического пациента и исключение передачи генетической модификации его детям. Генетические модификации зародышевых клеток считаются спорными и запрещены, например в Европейском Союзе, в основном из-за серьезных этических проблем [7].

Генная терапия может проводиться *in vivo* и *ex vivo*. *In vivo* подразумевает введение генотерапевтического материала непосредственно в ткани (клетки крови, мышцы, легкие, опухоли и т.д.) пациента. *Ex vivo* генная терапия представляет собой технологию, основанную на трансплантации (инфузии) генетически модифицированных клеток пациенту. При этом из организма изолируются и культивируются клетки специфического типа, например, гемопоэтические стволовые клетки HSC, в них вводятся терапевтические трансгены, проводится отбор клонов с высоким уровнем экспрессии требуемого гена и исключаются клоны с опасными трансформациями. Отобранные модифицированные клетки вводятся тому же пациенту. Преимуществом генной терапии *ex vivo* является возможность охарактеризовать полученные трансформированные клетки до их трансплантации в организм. В настоящее время в большинстве допущенных к клини-

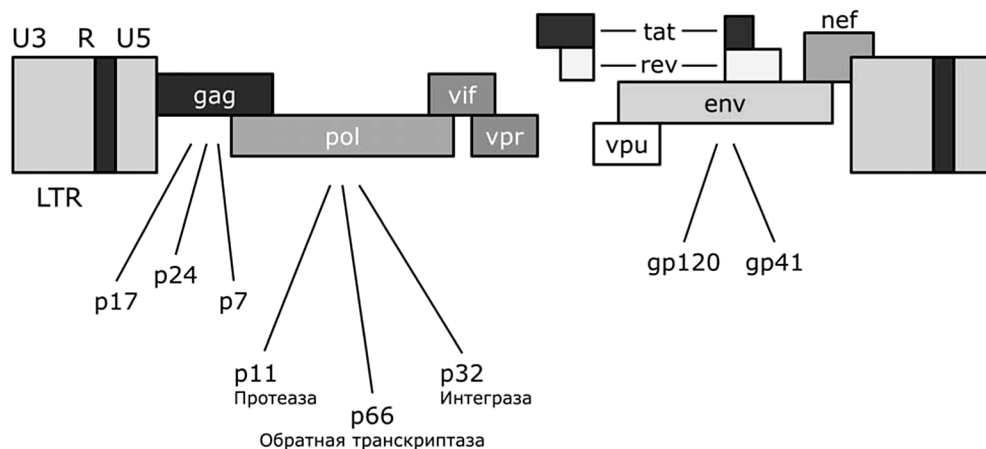


Рис. 3. Схема генома ВИЧ и кодируемые вирусом белки.

ческим испытаниям программ генной терапии используется именно этот подход [8].

На продолжительность действия препаратов генной терапии влияют различные факторы. Имеет значение, интегрирован ли трансген в хроматин клетки хозяина, как в случае онкоретровирусных и лентивирусных векторов, или находится в ядре в виде внехромосомных эписом (адено-ассоциированные вирусы, аденовирусы и вирусы герпеса). Необходимо отметить, что интеграция не является гарантией стабильной экспрессии, трансген может замолчать с течением времени [9].

Очень важно, в какой вид клеток будет встроен терапевтический ген. HSC представляют собой привлекательную мишень для генной терапии ВИЧ-1, поскольку данные стволовые клетки производят все клетки, участвующие в ВИЧ-1 патогенезе (CD4+ Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и микроглии) и их генетическая модификация обеспечит защиту всего спектра ВИЧ восприимчивых клеток. Продолжительность жизни HSC клеток составляет годы, поэтому они могут служить в качестве надежного источника ВИЧ-1 устойчивых клеток крови [8].

CD4+ Т-лимфоциты также являются перспективными мишенями для генной терапии ВИЧ. В последние 10 лет достигнуты значительные успехи в технологии поддержания и выращивания Т-клеток крови вне организма. Также продемонстрирована возможность модификации Т-клеток с целью получения достаточных доз клеточного продукта от ВИЧ-инфицированных пациентов. Ранние клинические испытания касались скорее проверки безопасности применения модифицированных CD4+ клеток на ВИЧ-инфицированных пациентах [10], однако отмечено, что у пациентов, получавших модифицированные Т-лимфоциты, вирусная нагрузка не возрастала [11].

2. Целевые мишени для РНК агентов генной терапии ВИЧ

К препаратам на основе РНК, ингибирующим определенные стадии жизненного цикла ВИЧ, относятся

рибозимы, антисмысловые РНК, РНК аптамеры, РНК приманки, малые интерферирующие РНК (siRNA). Различные регионы генома ВИЧ, используемые в качестве мишеней при генной терапии, приведены на рис. 3.

Сообщается о проведении ряда клинических испытаний препаратов рибозимов, подавляющих репликацию ВИЧ путем ферментативного расщепления РНК генов *tat*, *rev* и U5 региона LTR (длинные концевые повторы), на стадиях I и II фазы [12 – 16]. Стволовые клетки, полученные от ВИЧ-инфицированных лиц, модифицировали ретровирусным вектором, несущим трансген рибозима, после чего клетки вводили обратно в организм пациента. Несмотря на то, что данная терапия не оказывает значительного влияния на вирусную нагрузку, проведенные испытания показали, что применение рибозимов безопасно.

Также были проведены клинические испытания препаратов на основе коротких и длинных трансгенов антисмысловой РНК, способной к образованию нефункциональных дуплексов с РНК транскриптами ВИЧ. Сообщается о применении ВИЧ коротких антисмысловых РНК, комплементарных U5 РНК и *env* РНК [17, 18].

Другую группу терапевтических РНК молекул, олигонуклеотидные аптамеры с высоким сродством к целевым лигандам, синтезируют искусственно, выделяя их из библиотек случайных последовательностей методами селекции *in vitro* [19 – 21]. Хотя использование анти-ВИЧ аптамеров выглядит многообещающим, клинические испытания пока не проводились. Потенциальная проблема состоит в том, что созданные искусственно аптамеры могут не образовывать в клетках необходимой для эффективного связывания белков-мишеней третичной структуры.

С другой стороны, экспрессия РНК приманок, представляющих собой последовательности РНК, соответствующие регуляторным элементам TAR (trans-activating response) и RRE (Rev responsive element) генома вируса, позволяет эффективно ингибировать белки активаторы транскрипции вирусных

генов *Tat* и *Rev*. Один из препаратов на основе *Rev* ингибирующей РНК приманки успешно прошел клинические испытания [22].

Малые интерферирующие РНК (siRNA) — класс двухцепочечных РНК, длиной 21 – 22 нуклеотидов с 2 неспаренными выступающими нуклеотидами на 3'-концах, которые позволяют им быть распознанными в процессе РНК-интерференции клеточными ферментами, что приводит к деградации гомологичной мРНК-мишени. Запуск РНК-интерференции можно инициировать экспрессией трансгенного предшественника короткой шпильки (shRNA), который отчасти напоминает эндогенных предшественников микроРНК, что позволяет ему экспортироваться в цитоплазму и подвергаться процессингу. Молекулы shRNA разрезаются клеточными ферментами в малые интерферирующие РНК (siRNA), которые далее переходят в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC). Этот комплекс связывается и разрезает мРНК на участках комплементарных siRNA. Экспрессия предшественников коротких шпилек, кодирующих siRNA вирусных или клеточных последовательностей, может быть легко осуществлена с помощью обычных вирусных векторов, используемых для генной терапии [28].

ВИЧ-1 был одним из первых инфекционных агентов, ставшим мишенью РНК-интерференции в результате хорошо изученных жизненного цикла вируса и экспрессии его генов. Практически все транскрипты ВИЧ, в том числе *tat*, *rev*, *gag*, *pol*, *nef*, *vif*, *env*, *vpr* и РНК LTR региона восприимчивы к негативной регуляции РНК-интерференцией в клеточных культурах [23 – 27]. Существенной проблемой для клинического

применения препаратов, запускающих механизм РНК-интерференции, является высокая скорость образования мутаций ВИЧ, в результате чего могут появляться мутанты, резистентные к данной терапии [25, 26, 32 – 36]. Один из подходов, позволяющих избежать данную проблему, — направление действия препаратов генной терапии на хозяйские транскрипты, кодирующие ключевые функции, необходимые для проникновения ВИЧ-1 в клетку и для репликации его генома. В этой связи разрабатываются препараты против ВИЧ с использованием механизма РНК-интерференции, позволяющие подвергнуть негативной регуляции экспрессию клеточных кофакторов, таких как ядерный фактор каппа В (NF-κB), ВИЧ рецептор CD4 и ВИЧ и корецепторы CCR5 (С-С мотив) и CXCR4 (С-Х-С мотив). Это позволяет блокировать вирусную репликацию или проникновение вируса в клетку [25, 26, 32 – 36]. Возможность использования регуляции экспрессии рецептора CD4 была отброшена генетическими исследованиями, которые показали, что подобная терапия может привести к серьезным иммунным нарушениям у пациентов. В противоположность этому, CCR5 корецептор, тропный к макрофагам, особенно перспективен в качестве мишени, так как нарушения в структуре CCR5 рецептора не оказывают влияния на иммунную систему.

3. Целевые мишени для белковых агентов генной терапии ВИЧ. Белковые ингибиторы

Так же как и РНК-ингибиторы ВИЧ, белковые агенты способны блокировать как клеточную, так и вирус-

Основные группы векторных систем, применяемых в генной терапии [6]

Вектор	Генетический материал	Максимальный размер вставки, т.п.о.	Тропизм	Воспалительный ответ	Форма существования генома вируса в клетках	Основные ограничения	Преимущества
Оболочечные вирусы							
Ретровирусы	РНК	8	только делящиеся клетки	низкий	интегрирован в геном хозяина	к трансдукции данных векторов способны только делящиеся клетки; в некоторых случаях интеграция может инициировать онкогенез	устойчивый перенос генетического материала в делящиеся клетки
Лентивирусы	РНК	8	широкий	низкий	Интегрирован в геном	в некоторых случаях интеграция может инициировать онкогенез	устойчивый перенос генетического материала в большинство тканей организма
HSV-1	дцДНК	40 ^a 150 ^b	исключительно для нейронов	высокий	Эписомальная	воспалительный ответ, появление временной экспрессии трансгенов в других тканях	высокая емкость для встройки чужеродной ДНК, тропизм к нейронам
Безоболочечные вирусы							
AAV	оцДНК	< 5	широкий	низкий	эписомальная форма (> 90 %). Интегрирован в геном (< 10 %)	маленькая емкость для встройки чужеродной ДНК	нетоксичный; низкий воспалительный ответ
Аденовирус	дцДНК	8 ^a 30000 ^b	широкий	высокий	эписомальная форма	капсид вызывает мощный воспалительный ответ	очень эффективная трансдукция для большинства тканей

^a дефективная репликация; ^b векторы-ампликоны; ^c зависимость от вируса помощника;

AAV — аденоассоциированный вирусный вектор; дцДНК-двухцепочечная ДНК; HSV-1 — вирус простого герпеса-1; оцДНК — одноцепочечная ДНК.

ную мишени. Мутантная форма ВИЧ *Rev* белка, названная M10, стала первым белком, используемым в генной терапии ВИЧ [37]. Предположительно *Rev*-M10 блокирует выход вирусной РНК из ядра клетки в цитоплазму и, таким образом, предотвращает упаковку и последующий перенос вирусной РНК. Данный мутантный белок — один из лучших потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ. Внутриклеточные антитела и интракины также являются потенциальными ингибиторами репликации вируса [38 – 44]. Эти белки связываются с клеточными или вирусными белками-мишенями, что в большинстве случаев приводит к протеасомному расщеплению белков-мишеней. К сегодняшнему моменту клинические испытания на человеке проведены только для генотерапевтического препарата на основе белка *Rev*-M10 [37].

Исследование механизмов, ограничивающих распространение ВИЧ в клетках, расширяет арсенал пригодных для терапии молекулярных подходов. Хорошо изучены свойства белка TRIM5α (tripartite interaction motif5), обнаруженного у многих приматов и имеющего функцию подавления ретровирусных инфекций. У некоторых видов макаков (резус макак) белок TRIM5α подавляет репликацию ВИЧ-1 в клетках, в то время как ортологичный TRIM5α белок человека не способен препятствовать жизненному циклу ВИЧ [45]. Выяснено, что тримерный белок TRIM5αrh макака взаимодействует с гексамерным капсидом вируса с формированием комплекса “вирус-TRIM5αrh” [46], что блокирует этап “раздевания” вируса и перенос его нуклеиновой кислоты в ядро клетки [46 – 48].

Всего лишь одна-две ключевые аминокислоты определяют разницу в специфической активности человеческого и резус TRIM5α белков и ответственны за возможность взаимодействия с ВИЧ-1 капсидом [47, 49, 50]. Кроме того, TRIM5α ограничивает ВИЧ-1 на поздней фазе репликации вируса [51]. Оценка распространенности ВИЧ среди китайских потребителей инъекционных наркотиков и изучение генетических особенностей серонегативных индивидуумов свидетельствуют о существовании у них естественной защиты, предположительно также связанной с наличием определенных полиморфизмов TRIM5α белка [52]. Результаты данных исследований поддержали идею использования для генотерапии химерных человек-резус TRIM5α вариантов (TRIM5αrh-xy) [53] или искусственно модифицированных вариантов TRIM5α белка человека [50, 54], что минимизирует антигенность при проведении генотерапии. Использование модифицированного TRIM5α, как часть комбинированной анти-ВИЧ генотерапии [55], кажется очень многообещающим [53].

Некоторые члены АРОВЕС3 (A3) семейства белков, в частности A3F и A3G, известны как перспективные факторы клеток хозяина, обладающие противовирусной активностью. Данные каталитические полипептиды способны специфически дезаминировать цитозин в урацил в составе мРНК или ДНК, что приводит к накоплению мутаций G/A и нарушению вирусного гено-

ма. Белок A3G способен упаковываться в вирион и блокировать обратную транскрипцию дезаминированием минус-цепи.

Однако фактор Vif (viral infectivity factor) вируса образует комплекс с АРОВЕС3G и блокирует активность АРОВЕС3G. При наличии Vif белка АРОВЕС3G связывается, убиквитинируется, подвергается деградации и теряет возможность встраиваться в новые вирусные частицы [56 – 58].

Изучение биологических функций и особенностей участия АРОВЕС3 белков в репликации ВИЧ-1 в различных типах клеток продолжается [59 – 64].

Разрабатываются некоторые генотерапевтические стратегии, использующие активность АРОВЕС3G белка, например, применение специфических ингибиторов, блокирующих взаимодействие Vif и АРОВЕС3G или препятствующих внутриклеточному распаду АРОВЕС3G. Терапия данными агентами потенциально может нанести вред пациенту и, благодаря высокой скорости мутагенеза, может способствовать ВИЧ-1 эволюции и развитию устойчивости, поэтому в данном случае подчеркивается необходимость тщательнейшей оценки безопасности [65, 66]. Другая стратегия использует белок Chim3 — доминантно-негативную мутантную производную VIF. Chim3 не блокирует интеграцию путем индукции A3G деградации, а блокирует накопление ретротранскрипта, уменьшая ВИЧ-1-выход в процессе инфицирования CD4 + Т-клеток [67]. Изучение молекулярной биологии взаимодействия Vpr белка ВИЧ-1 с хозяйским белком BST-2 (тетерин, костномозговой стромальный клеточный антиген 2) является предметом интенсивного интереса и может дать новое поколение ВИЧ-1 ингибиторов [68 – 82].

Другой подход, который может помочь искоренить ВИЧ из организма человека, — это использование tre-рекомбиназного агента в сочетании с ВААРТ. Tre-рекомбиназа — это модифицированный методом белковой эволюции фермент на основе cre-рекомбиназы, способный распознавать асимметричные последовательности LTR регионов ВИЧ-1 и выселять интегрированную провирусную ДНК из генома инфицированных клеток [83].

Еще одним перспективным направлением в разработке белковых ингибиторов ВИЧ являются рекомбинантные белки, способные связываться с ВИЧ gp41 на поверхности клеток, блокируя тем самым проникновение вируса [84, 85]. Данные белковые ингибиторы могут быть экспрессированы с использованием ретровирусных или лентивирусных векторов, и являются удобным объектом для разработки на их основе препаратов генной терапии.

4. Адресное воздействие на CCR5 мишень

Цитокиновый рецептор 5 (CCR5) — основной молекулярный корецептор, используемый ВИЧ для проникновения в клетки [86]. Было выявлено, что у людей, в геноме которых есть мутация CCR5Δ32, вирус

ВИЧ 1 не способен проникать в клетки, так как не имеет тропизма к мутантному CCR5 белку. Это приводит к устойчивости клеток к заражению ВИЧ у индивидуумов, имеющих гомозиготную мутацию, и к повышенной сопротивляемости в случае гетерозиготной мутации [87, 88]. Данное наблюдение послужило толчком к разработке против-ВИЧ лекарственных препаратов, действие которых основано на нарушении взаимодействия вируса и CCR5 корцептора. Примером является одобренный к применению препарат ВА-АРТ “Маравирик” [1, 89, 90].

Также ведутся многочисленные исследования, направленные на разработку генотерапевтических препаратов, действие которых заключается в существенном снижении или полном подавлении экспрессии CCR5. Результаты недавних исследований позволяют надеяться на успех в этом направлении. Так у пациента (“берлинский пациент”), которому трансплантировали гемопоэтические стволовые прогениторные клетки (HSC) от донора, несущего CCR5Δ32 мутацию, наблюдалось полное удаление ВИЧ-1 инфекции при отсутствии обычной противовирусной терапии [91]. Высокая эффективность лечения ВИЧ путем трансплантации Т-клеток от CCR5-отрицательного донора, имеющего мутацию, дает основание полагать, что получение подобных клеток в организме ВИЧ-пациента с использованием генотерапевтических средств также может быть очень эффективным.

4.1. Подавление CCR5 экспрессии путем генной терапии

Такие подходы, как РНК-интерференция, рибозимы, антисмысловые РНК и секвестрация белка, последующая за экспрессией внутриклеточных антител к CCR5 [92], подавляют экспрессию CCR5 для того, чтобы имитировать CCR5-отрицательные клетки.

Недавние исследования подтверждают возможность использования РНК-интерференции для подавления экспрессии CCR5 с направленной доставкой предшественников малых интерферирующих РНК в Т-клетки с помощью наночастиц (липосом, углеродных нанотрубок и др.), на поверхности которых иммобилизованы антитела и другие векторы [93, 94]. Альтернативный подход заключается в достижении постоянной экспрессии предшественников малых интерферирующих РНК, shRNA с помощью модификации клеток лентивирусными векторами [107 – 109]. Стратегия по направленной доставке лентивирусных векторов, экспрессирующих shRNA в CCR5+ клетки, продемонстрирована на примере РВМС-трансплантированных мышей [98].

Описан пример объединения анти-CCR5 shRNA с химерным геном TRIM5α белка и геном TAR-приманки в 1 лентивирусном векторе с целью модификации CD34+ HSC клеток. Данный подход, позволяющий подавлять жизненный цикл вируса на различных этапах проникновения в клетку (анти-CCR5 shRNA агент), после проникновения перед интеграцией в геномную

ДНК (химерный TRIM5α агент) и после интеграции (TAR приманка агент) был опробован в экспериментах *in vitro* и *in vivo* на мышах [53, 99].

shRNA могут быть сконструированы в форме искусственных микроРНК, которые более эффективны по сравнению с siRNA, — значительно меньшее число молекул микроРНК в клетке приводит к аналогичному уровню ингибирования [100 – 102]. В настоящее время в России во ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора ведется разработка противовирусной конструкции, в состав которой должны войти микроРНК против рецептора CCR5. Доставка этой конструкции в клетку будет осуществляться с помощью лентивирусного вектора. Для ингибирования CCR5 рецептора создана комбинация из 2 искусственных микроРНК, ее эффективность продемонстрирована на индикаторной линии клеток человека [103, 104].

Еще один подход к выключению гена CCR5 основан на использовании CCR5 рибозимов, как одного из вариантов генной терапии. Описан случай доставки анти-CCR5 рибозимного агента лентивирусным вектором к CD34+ гемопоэтическим стволовым клеткам из лимфомы больных СПИДом пациентов, перенесших химиотерапию и подвергшихся трансплантации своих же собственных гемопоэтических стволовых клеток [105]. Присутствие в организме клеток, экспрессирующих рекомбинантный ген, через 24 мес после трансплантации демонстрирует обоснованность применения данного подхода.

Больные СПИДом пациенты с наличием заболеваний лимфатической ткани представляют собой уникальную группу для оценки анти-ВИЧ терапии, основанной на использовании гемопоэтических стволовых клеток, если последние произведены и собраны перед химиотерапией. Оба эти фактора обеспечивают возможность создания гемопоэтических стволовых клеток, обладающих анти-ВИЧ свойствами, а также увеличивают шанс приживания трансплантированных модифицированных клеток.

Несмотря на потенциальную привлекательность всех описанных выше подходов, процесс достижения и поддержания достаточного уровня анити-CCR5 активности является трудозатратным и часто вообще невыполнимым. Ограничения вышеупомянутых методов способны преодолеть подход, основанный на использовании нуклеаз типа “цинковые пальцы” (zinc finger nucleases, ZFN). Данная стратегия обеспечит постоянное отключение CCR5 гена без необходимости поддержания долгосрочной экспрессии ZFN агента в клетках [32].

4.2. Выключение гена CCR5 с использованием нуклеаз “цинковые пальцы”

Нуклеазы “цинковые пальцы” это рекомбинантные белки, состоящие из 2 доменов: ДНК связывающего домена типа “цинковые пальцы” и домена с активностью эндонуклеазы рестрикции первого типа [106].

ДНК связывающий домен состоит из набора искусственно сконструированных пептидных последовательностей типа “цинковые пальцы”, обладающих способностью специфично связываться с целевой последовательностью ДНК. Специфичность связывания обеспечивается присутствием на конце каждого “пальца” последовательности из 3 – 4 аминокислотных остатков, которые специфично взаимодействуют с 3 или 4 парами нуклеотидов в цепи ДНК. Изменение аминокислотной концевой последовательности “цинкового пальца” изменяет его специфичность к последовательности ДНК. Использование ряда “цинковых пальцев” позволяет увеличить длину распознавания целевой последовательности ДНК и соответственно специфичность действия фермента. Использование данного подхода позволяет сконструировать нуклеазу ZNF, способную с высокой специфичностью связываться только с уникальной целевой последовательностью в геноме человека [32].

ZFN можно рассматривать как искусственно сконструированную рестриктазу, способную расщеплять ДНК в сайте специфического связывания фермента с ДНК. После расщепления в клетках млекопитающих задействуется механизм репарации двунитевых разрывов ДНК, протекающий преимущественно по механизму негомологичного воссоединения концов (NHEJ). Репарация по механизму NHEJ редко бывает безошибочной и, как правило, приводит к появлению в области разрыва генома небольших делеций или инсерций, вследствие чего нарушаются открытые рамки считывания (ORF) в данной области. Пара нуклеаз ZFN, специфичная к фрагменту генома, кодирующему N концевой участок CCR5 человека, описана в работах [107, 108]. В данном случае в результате репарации ДНК с высокой вероятностью дублируется 5bp фрагмент целевой последовательности [108, 109]. Это приводит к появлению 2 соседних стоп-кодона в открытой рамке считывания и преждевременной терминации синтеза целевого белка.

Ключевой особенностью генной терапии с использованием нуклеаз ZNF является то, что экспрессия ZNF требуется только в очень короткий промежуток времени. Как только расщепление двухцепочечной ДНК будет произведено, клеткой-хозяином запускается механизм репарации, приводящий к постоянному выключению (нокауту) гена. Рекомбинантные гены нуклеаз ZNF могут быть адресно доставлены в различные человеческие клетки с использованием стандартных методик и векторных систем, обеспечивающих только временную экспрессию. Это могут быть аденовирусные векторы, не интегрирующие в геном лентивирусные векторы, и плазмидные ДНК, доставляемые в клетку путем нуклеофекции [107 – 110].

В настоящее время инициировано несколько клинических испытаний, использующих CD4+ лимфоциты крови пациентов, модифицированные генами ZFN [111, 112].

Принимая во внимание проблемы, связанные с необходимостью непрерывной борьбы за здоровье

ВИЧ-инфицированных пациентов и соответственно большие экономические затраты в условиях ВИЧ-1 эпидемии, было бы разумно развивать альтернативные варианты терапевтических стратегий. Становятся доступными различные варианты генной терапии с использованием трансгенов, кодирующих РНК или белковые молекулы. Особыми достоинствами данной терапии являются высокая адресная специфичность и активность анти-ВИЧ агента при минимальной цитотоксичности, предотвращение развития резистентности вируса и потенциально низкая антигенность противовирусных молекул. Таким образом, генная терапия ВИЧ может дополнить набор традиционных противовирусных схем лечения, а также усилить эффект доступных вакцинных технологий, на сегодняшний день быстро теряющих необходимую эффективность. При этом комбинированное использование генномодифицированных CD4+ Т-лимфоцитов и CD34+ стволовых клеток может обеспечить положительный синергетический эффект. Генномодифицированные Т-лимфоциты обеспечивают резистентность клеток крови к ВИЧ сразу после трансфузии, но выводятся из организма пациента в течение непродолжительного времени, в то время как модифицированные CD34+ стволовые клетки способны функционировать и производить Т-лимфоциты в течение нескольких месяцев. Если репликация ВИЧ-1 в этих клетках будет невозможна, то более длительное присутствие их в организме может повысить эффективность лечения. Проводятся или уже завершены клинические испытания по проверке безопасности и эффективности стратегий переноса трансгенов в Т-лимфоциты и стволовые клетки.

Методы лечения ВИЧ-1 инфекции с использованием генной терапии развиваются не так стремительно, как хотелось бы. Но однозначно ясно, что их широкое использование в будущем позволит искоренить ВИЧ-эпидемию и эффективно и безопасно лечить СПИД.

ЛИТЕРАТУРА

1. N. A. Meanwell and J. F. Kadow, *Cur. Opin. Investig. Drugs*, **8**(8), 669 – 681 (2007).
2. I. G. Williams, *Int. J. Clin. Pract.*, **57**(10), 890 – 897 (2003).
3. P. K. Quashie, *Cur. Infect. Dis. Rep.*, **15**(1), 85 – 100 (2003).
4. А. А. Лагунин, Д. А. Филимонов, Т. А. Глориозова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **47**(7), 1 – 21 (2013).
5. <http://geneticlab.ru/analitika/gennaya-terapiya-220.html>.
6. E. T. Clare, A. Ehrhardt, and M. A. Kay, *Nature*, **4**, 346 – 358 (2003).
7. R. M. Sade and G. Khushf, *J. So. Carolina Med. Assoc.*, **94**(9), 406 – 410 (1998).
8. J. J. Rossi, C. H. June, and D. B. Kohn, *Nat. Biotechnol.*, **12**, 1444 – 1454 (2007).
9. D. Pannell and J. Ellis, *Rev. Med. Virol.*, **11**, 205 – 217 (2001).
10. F. Bex, P. Hermans, S. Sprecher, et al., *Blood*, **84**, 3317 – 3326 (1994).
11. B. L. Levine, W. B. Bernstein, N. E. Aronson, et al., *Nat. Med.*, **8**, 47 – 53 (2002).
12. R. T. Mitsuyasu, T. C. Merigan, A. Carr, et al., *Nature Med.*, **15**(3), 285 – 292 (2009).
13. A. Michienzi, D. Castanotto, N. A. Lee, et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, **1002**, 63 – 71 (2003).

14. F. K. Ngok, R. T. Mitsuyasu, J. L. Macpherson, et al., *Methods Mol. Biol.*, **252**, 581 – 598 (2004).
15. G. Bauer, P. Valdez, K. Kearns, et al., *Blood*, **89**, 2259 – 2267 (1997).
16. M. C. Leavitt, M. Yu, O. Yamada, et al., *Hum. Gene Ther.*, **5**, 1115 – 1120 (1994).
17. S. Chatterjee, P. R. Johnson, and K. K. Wong, *Science*, **258**, 1485 – 1488 (1992).
18. B. L. Levine, L. M. Humeau, J. Boyer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17372 – 17377 (2006).
19. D. M. Held, J. D. Kissel, J. T. Patterson, et al., *Front. Biosci.*, **11**, 89 – 112 (2006).
20. P. J. Joshi, T. S. Fisher, and V. R. Prasad, *Cur. Drug Targets Infect. Disord.*, **3**, 383 – 400 (2003).
21. T. L. Symensma, L. Giver, M. Zapp, et al., *J. Virol.*, **70**, 179 – 187 (1996).
22. D. B. Kohn, G. Bauer, C. R. Rice, et al., *Blood*, **94**, 368 – 371 (1999).
23. J. M. Jacque, K. Triques, and M. Stevenson, *Nature*, **418**, 435 – 438 (2002).
24. N. S. Lee, T. Dohjima, G. N. Bauer, et al., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 500 – 505 (2002).
25. M. A. Martinez, B. Clotet, and J. A. Este, *Trends Immunol.*, **23**, 559 – 561 (2002).
26. C. D. Novina, M. F. Murray, D. M. Dykxhoorn, et al., *Nat. Med.*, **8**, 681 – 686 (2002).
27. G. A. Coburn and B. R. Cullen, *J. Virol.*, **76**, 9225 – 9231 (2002).
28. D. Boden, O. Pusch, F. Lee, et al., *J. Virol.*, **77**, 11531 – 11535 (2003).
29. E. M. Westerhout, M. Ooms, M. Vink, et al., *Nucleic Acids Res.*, **33**, 796 – 804 (2005).
30. A. T. Das, T. R. Brummelkamp, E. M. Westerhout, et al., *J. Virol.*, **78**, 2601 – 2605 (2004).
31. R. Sabariego, M. Gimenez-Barcons, N. Tapia, et al., *J. Virol.*, **80**, 571 – 577 (2006).
32. P. Cannon, and C. June, *Cur. Opin HIV AIDS*, **6**(1), 74 – 79 (2011).
33. J. Anderson and R. Akkina, *Retrovirology*, **2**, 53 (2005).
34. P. Cordelier, B. Morse, and D. S. Strayer, *Oligonucleotides*, **13**, 281 – 294 (2003).
35. R. M. Surabhi and R. B. Gaynor, *J. Virol.*, **76**, 12963 – 12973 (2002).
36. D. S. An, F. X. Qin, V. C. Auyeung, et al., *Mol. Ther.*, **14**, 494 – 504 (2006).
37. C. Woffendin, U. Ranga, and Z. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2889 – 2894 (1996).
38. M. N. Lobato and T. V. Rabbitts, *Cur. Mol. Med.*, **4**, 519 – 528 (2004).
39. W. A. Marasco, J. LaVecchio, and A. Winkler, *J. Immunol. Methods*, **231**, 223 – 238 (1999).
40. A. Poluri, M. van Maanen, and R. E. Sutton, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **3**, 951 – 963 (2003).
41. R. Schroers, C. M. Davis, H. J. Wagner, et al., *Gene Ther.*, **9**, 889 – 897 (2002).
42. A. G. Yang, X. Bai, X. F. Huang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11567 – 11572 (1997).
43. H. Chono, K. Matsumoto, H. Tsuda, et al., *Hum. Gene Ther.*, **22**, 35 – 43 (2011).
44. A. B. Balazs, J. Chen, C. M. Hong, et al., *Nature*, **481**, 81 – 86 (2012).
45. E. E. Nakayama and T. Shioda, *Rev. Med. Virol.*, **20**, 77 – 92 (2010).
46. L. R. Black and C. J. Aiken, *Virol.*, **84**, 6564 – 6569 (2010).
47. B. K. Ganser-Pornillos, V. Chandrasekaran, O. Pornillos, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 534 – 539 (2011).
48. S. Ohmine, R. Sakuma, T. Sakuma, et al., *Biol. Chem.*, **285**, 34508 – 34517 (2010).
49. A. Kuroishi, K. Bozek, T. Shioda, et al., *Retrovirology*, **7**, 58 (2010).
50. Q. T. Pham, A. Bouchard, M. G. Grutter, et al., *Gene Ther.*, **17**, 859 – 871 (2010).
51. R. Sakuma, S. Ohmine, and Y. J. Ikeda, *Biol. Chem.*, **285**, 3784 – 3793 (2010).
52. F. L. Liu, Y. Q. Qiu, H. Li, et al., *Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **56**, 306 – 311 (2011).
53. J. S. Anderson, J. Javien, J. A. Nolta, et al., *Mol. Ther.*, **17**(12), 2103 – 2114 (2009).
54. M. R. Neagu, P. Ziegler, T. Pertel, et al., *J. Clin. Invest.*, **119**, 3035 – 3047 (2009).
55. B. Pacheco, A. Finzi, and M. Stremlau, *J. Sodroski, Virology*, **408**, 204 – 212. (2010).
56. J. L. Smith, W. Bu, R. C. Burdick, et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, **30**, 638 – 646 (2009).
57. J. S. Albin and R. S. Harris, *Exp. Rev. Mol. Med.*, **12**, e4 (2010).
58. S. Wissing, N. L. Galloway, and W. C. Greene, *Mol. Aspects Med.*, **31**, 383 – 397 (2010).
59. R. Burdick, J. L. Smith, C. Chaipan, et al., *J. Virol.*, **84**, 10241 – 10253 (2010).
60. C. Hu, D. T. Saenz, H. J. Fadel, et al., *J. Virol.*, **84**, 11981 – 11993 (2010).
61. D. Lavens, J. Peelman, Van der Heyden, et al., *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1902 – 1912 (2010).
62. J. L. Mbisa, W. Bu, and V. K. Pathak, *J. Virol.*, **84**, 5250 – 5259 (2010).
63. L. C. Mulder, M. Ooms, S. Majdak, et al., *J. Virol.*, **84**, 9613 – 9617 (2010).
64. E. W. Refsland, M. D. Stenglein, K. Shindo, et al., *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4274 – 4284 (2010).
65. E. Y. Kim, T. Bhattacharya, K. Kunstman, et al., *J. Virol.*, **84**, 10402 – 10405 (2010).
66. H. A. Sadler, M. D. Stenglein, R. S. Harris, et al., *J. Virol.*, **84**, 7396 – 7404 (2010).
67. S. Porcellini, F. Gubinelli, L. Alberici, et al., *Blood*, **115**, 4021 – 4029 (2010).
68. B. Mangeat, G. Gers-Huber, M. Lehmann, et al., *PLoS Pathog.*, **5**, e1000574 (2009).
69. R. S. Mitchell, C. Katsura, M. A. Skasko, et al., *PLoS Pathog.*, **5**, e1000450 (2009).
70. K. Miyakawa, A. Ryo, T. Murakami, et al., *PLoS Pathog.*, **5**, e1000700 (2009).
71. N. Casartelli, M. Sourisseau, J. Feldmann, et al., *PLoS Pathog.*, **6**, e1000955 (2010).
72. I. Christodouloulopoulos, M. E. Droniou-Bonzom, J. E. Oldenburg, et al., *Retrovirology*, **7**, 4 (2010).
73. M. Dube, B. B. Roy, P. Guiot-Guillain, et al., *PLoS Pathog.*, **6**, e1000856 (2010).
74. K. Fitzpatrick, M. Skasko, T. J. Deerinck, et al., *PLoS Pathog.*, **6**, e1000701 (2010).
75. C. Goffinet, S. Homann, I. Ambiel, et al., *J. Virol.*, **84**, 4089 – 4094 (2010).
76. C. Goffinet, S. Schmidt, C. Kern, et al., *J. Virol.*, **84**, 11374 – 11384 (2010).
77. J. Hammonds, J. J. Wang, H. Yi, et al., *PLoS Pathog.*, **6**, e1000749 (2010).
78. L. A. Lopez, S. J. Yang, J. E. Oldenburg, et al., *Retrovirology*, **7**, 51 (2010).
79. A. Hinz, N. Miguët, G. Natrajan, et al., *Cell Host Microbe*, **7**, 314 – 323 (2010).
80. L. A. Lopez, S. J. Yang, H. Hauser, et al., *J. Virol.*, **84**, 7243 – 7255 (2010).
81. M. Schindler, C. Rajan, C. Banning, et al., *Retrovirology*, **7**, 1 (2010).
82. A. A. Tokarev, J. Munguia, and J. C. Guatelli, *J. Virol.*, **85**, 51 – 63 (2011).
83. I. Hauber, J. Hauber, F. Buchholz, et al., *Science*, **316**, 1912 – 1915 (2007).
84. M. Egelhofer, G. Brandenburg, H. Martiniuset, et al., *J. Virol.*, **78**, 568 – 575 (2004).
85. E. E. Perez, J. L. Riley, R. G. Carroll, et al., *Clin. Immunol.*, **115**, 26 – 32 (2005).

86. L. Wu, N. P. Gerard, R. Wyatt, et al., *Nature*, **6605**, 179 – 183 (1996).
87. M. Samson, F. Libert, B. J. Doranz, et al., *Nature*, **6593**, 722 – 725 (1996).
88. K. Chalmet, F. Van Wanseele, E. Demecheleer, et al., *Virology*, **379**, 213 – 222 (2008).
89. W. D. Hardy, R. M. Gulick, H. Mayer, et al., *J. Acquir Immune Defic Syndr*, **55**(5), 558 – 564 (2010).
90. M. Westby and E. van der Ryst, *Antivir Chem. Chemother.*, **20**, 179 – 192 (2010).
91. G. Hütter, D. Nowak, M. Mossner, et al., *N. Engl. J. Med.*, **360**, 692 – 698 (2009).
92. C. H. Swan, B. Buhler, P. Steinberger, et al., *Gene Ther.*, **13**, 1480 – 1492 (2006).
93. P. Kumar, H. S. Ban, S. S. Kim, et al., *Cell*, **134**, 577 – 586 (2008).
94. S. S. Kim, D. Peer, P. Kumar, et al., *Mol. Ther.*, **18**, 370 – 376 (2010).
95. M. Liang, M. Kamata, K. N. Chen, et al., *J. Gene Med.*, **12**, 255 – 265 (2010).
96. S. Shimizu, P. Hong, B. Arumugam, et al., *Blood*, **115**, 1534 – 1544 (2010).
97. G. E. Ringpis, S. Shimizu, H. Arokium, et al., *PLoS ONE*, **7**(12), e53492, (2012).
98. J. S. Anderson, J. Walker, J. A. Nolta, et al., *J. Acquir Immune Defic Syndr*, **52**, 152 – 161 (2009).
99. J. E. Walker, R. X. Chen, J. McGee, et al., *J. Virol.*, **86**(10), 5719 – 5729 (2012).
100. J. M. Silva, M. Z. Li, K. Chang, et al., *Nat. Genet.*, **37**(11), 1281 – 1288 (2005).
101. D. Boden, O. Pusch, R. Silberman, et al., *Nucleic Acids Res.*, **32**(3), 1154 – 1158 (2004).
102. Y. P. Liu, Haasnoot, O. ter Brake, et al., *Nucleic Acids Res.*, **36**(9), 2811 – 2824 (2008).
103. D. Glazkova, A. Vetchinova, Y. Zhogina, et al., *ESGCT and BSGT collaborative Congress*, Brighton, UK (2011).
104. Д. В. Глазкова, А. С. Ветчинова, Е. В. Богословская и др., *Молек. биол.*, **47**(3), 475 – 486 (2013).
105. D. L. DiGiusto, A. Krishnan, L. Li, et al., *Sci. Transl. Med.*, **2**, 36 – 43 (2010).
106. F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, et al., *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 636 – 646 (2010).
107. A. Lombardo, P. Genovese, C. M. Beausejour, et al., *Nat. Biotechnol.*, **5**, 1298 – 1306 (2007).
108. E. E. Perez, J. Wang, J. C. Miller, et al., *Nat Biotechnol.*, **26**, 808 – 816 (2008).
109. N. Holt, J. Wang, K. Kim, et al., *Nat. Biotechnol.*, **28**, 839 – 847 (2010).
110. D. A. Maier, A. L. Brennan, S. Jiang, et al., *Human Gene Therapy*, **24**, 245 – 258 (2013).
111. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00842634?spons=San-gamo&rank=10>
112. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01252641>

Поступила 09.10.13

PROBLEMS AND PROSPECTS OF GENE THERAPY AGAINST HIV

A. Schneider^{1*}, A. Wagner¹, E. E. Davydova¹, A. S. Smirnov¹, I. N. Glazkov¹, M. M. Shegai², and D. V. Glazkova³

¹ MedPharmDiscovery Ltd., General Karbyshev boulevard 5/2, Moscow, 123154 Russia;

² Institute for Medico-Biological Problems, Peoples Friendship University of Russia, Podolskoe shosse 8/5, Moscow, 115093 Russia

³ Central Research Institute of Epidemiology, ul. Novogireevskaya 3a, Moscow, 111123 Russia

Possibilities of the application of gene therapy, based on the introduction of transgenes into patient's cell nuclei in order to express anti-HIV agents interfering the virus life cycle (by analogy with highly active antiretroviral therapy (HAART), are considered. In contrast to HAART, the anti-HIV agents are supposed to be expressed permanently after one treatment. These anti-HIV agents can represent various kinds of RNA like ribozymes, antisense RNA, RNA aptamers, RNA decoys and small interfering RNA (siRNA) or proteins such as RevM10, intracellular antibodies, and intrakines. The results of first clinical trials showed that it is difficult to achieve and maintain sufficient levels of anti-HIV activity in modified cells because of decaying (silencing) expression of anti-HIV agents from integrated vector genomes over time. It is probably safe to isolate somatic cells from a HIV infected patient, modify the cells genetically with vectors, and reinfuse them into the patient. There are several possible strategies in suppressing the expression of chemo-kine coreceptor CCR5 by means of gene therapy, but all are connected with the disadvantage of silencing expression of anti-CCR5 agents. The treatment of HIV infected cells with tre-recombinases leads to excision of the integrated HIV proviral DNA from the genome in experiments with cell lines and on mice. This is a promising way to destroy latent virus reservoirs and eradicate the virus from the body. Thus, gene therapy promises to be an important component on the long way to develop an effective treatment or even a cure of the HIV infection.

Key words: gene therapy; HIV infection