

ФАРМАКОГЕНОМИКА АНТИРЕТРОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Д-р мед. наук М. М. ШЕГАЙ¹, канд. хим. наук А. ШНАЙДЕР²,
чл.-корр. РАН Н. Л. ШИМАНОВСКИЙ³

¹ Институт медико-биологических проблем РУДН, Москва,

² ООО «МедФармОткрытие», Москва,

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова,
Москва, Российская Федерация

Рассмотрены пути использования фармакогеномики антиретровирусных препаратов для оптимизации терапии ВИЧ-инфекции. Описаны анти-ВИЧ-вещества на основе различных типов РНК (рибозимы, антисмысловые РНК, аптамеры РНК, РНК-приманки, малые интерферирующие РНК) и белковые агенты – RevM10, внутриклеточные антитела и интракины.

Ключевые слова: фармакогеномика, антиретровирусные средства, генная терапия, ВИЧ-инфекция.

Широкое применение в развитых странах высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) превратило ВИЧ-инфекцию из смертельно опасного недуга в контролируемую хроническую, хотя неизлечимую болезнь. Непрерывная пожизненная и дорогостоящая ВААРТ сопряжена с долгосрочными побочными эффектами и появлением резистентных к терапии штаммов вируса [1].

ВИЧ-инфекция является тяжелым, потенциально смертельным заболеванием. В последние два десятилетия возможности 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, состоящий из нескольких этапов, достаточно хорошо изучен (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

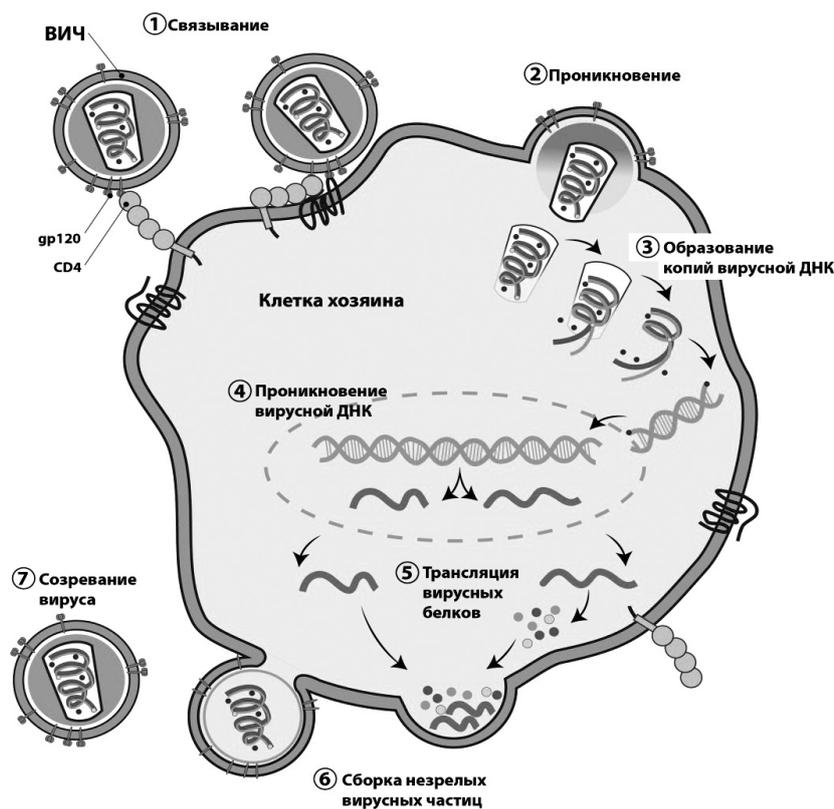


Рис. 1. Жизненный цикл ВИЧ: 1 – связывание частицы ВИЧ с поверхностью клетки хозяина; 2 – проникновение вирусной РНК, обратной транскриптазы, интегразы и других вирусных белков в клетку хозяина; 3 – образование копий вирусной ДНК путем обратной транскрипции; 4 – проникновение вирусной ДНК через ядро 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 [1]

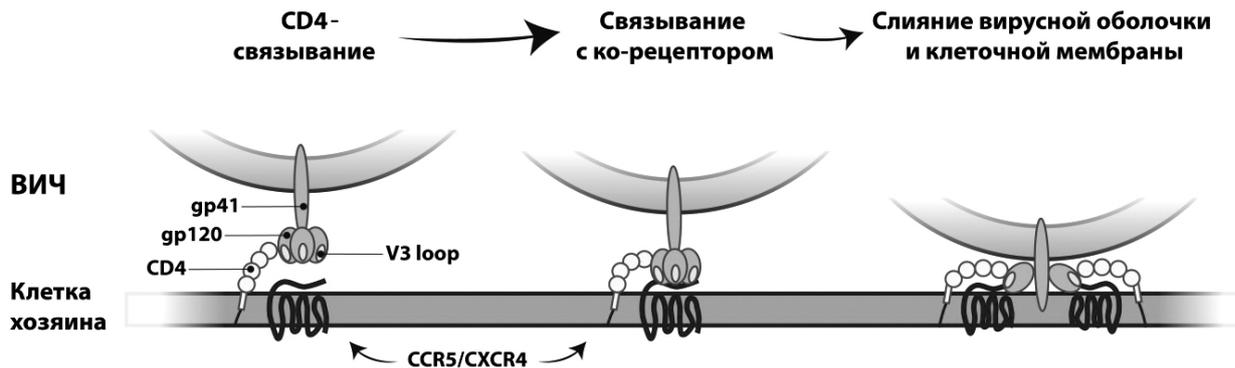


Рис. 2. Проникновение ВИЧ в клетку хозяина: *a* — CD4-связывание: вирусный поверхностный гликопротеин gp120 связывается с рецептором CD4 на поверхности клетки; *b* — связывание с ко-рецептором: gp120 связывается с ко-рецептором CCR5 или CXCR4 и претерпевает конформационные изменения; *в* — слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны: гидрофобная часть трансмембранного гликопротеина gp41 ВИЧ связывается с клеточной мембраной, инициируется слияние вируса с клеткой [1]

с ко-рецепторами 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 лекарственные средства ВААРТ группы ингибиторов связывания и проникновения вируса в клетку способны конкурентно связываться с ко-рецептором CCR5, например маравирик, другие взаимодействуют с вирусным трансмембранным гликопротеином gp41, в частности с фузеоном [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), интегразы и протеазы, а также транскрипции и обратной транскрипции.

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 три препарата, применяя два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы в сочетании с одним препаратом ингибитора протеазы или с одним препаратом нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы. Подобные схемы позволяют эффективно подавлять вирус, но существует ряд недостатков, обусловленных необходимостью пожизненной ежедневной терапии. В первую очередь прием препаратов ВААРТ приводит со временем к возникновению у пациентов 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. По неутешительной статистике, в 2013 г. в РФ только 140 тыс. из 780 тыс. зарегистрированных

ВИЧ-положительных пациентов получали ВААРТ. В результате нерегулярного приема или в недостаточных дозах вирус вырабатывает резистентность, появляются и распространяются штаммы вируса, устойчивые к препаратам нескольких классов. Если пациент инфицируется таким мультирезистентным штаммом ВИЧ, то подобрать эффективный вариант терапии очень трудно.

Постоянно ведется поиск менее токсичных и эффективных ингибиторов жизненного цикла ВИЧ, однако новые, более эффективные способы борьбы с вирусом по-прежнему очень актуальны [3].

Фармакогеномика побочных эффектов антиретровирусных препаратов

Одним из самых распространенных и наиболее эффективных антиретровирусных препаратов является абакавир, включенный во многие протоколы лечения ВИЧ, однако его широкое применение сдерживается возможностью развития тяжелых побочных реакций.

У 5% пациентов, принимающих абакавир, может наступить реакция гиперчувствительности (в том числе с летальным исходом), которая чаще наблюдается в первые 6 нед с начала приема препарата (в среднем через 11 дн) в виде симптомов полиорганного поражения. Проведенные исследования показали, что реакции гиперчувствительности при приеме абакавира связаны с наличием HLA-B*5701-аллельного варианта одного из генов главного комплекса гистосовместимости (HLA). Поэтому при назначении абакавира пациентам с ВИЧ-инфекцией рекомендуется проведение фармакогенетического теста, с помощью которого можно определить HLA-B*5701-аллельный вариант (полиморфный маркер).

Частота носительства аллельного варианта HLA-B*5701 в европейских этнических группах — до 5%.

Результаты крупного мультицентрового проспективного исследования PREDICT-1 показали,

Рекомендации по применению абакавира в зависимости от генотипа HLA-B

Вероятный фенотип	Генотипы	Примеры диплотипов	Значимость фенотипа	Лечение абакавиром	Классификация рекомендаций
Очень низкий риск развития гиперчувствительности (~94 % от всех пациентов)	Отсутствие аллелей *57:01 (отрицательный результат при генотипировании)	*X/*X ^C	Низкий или уменьшенный риск развития гиперчувствительности к абакавиру	Применение в стандартной дозе	Сильная
Высокий риск развития гиперчувствительности (~6 % от всех пациентов)	Присутствие хотя бы одной аллели *57:01 (положительный результат при генотипировании)	*57:01/*X ^C *57:01/*57:01	Значительно увеличенный риск развития гиперчувствительности к абакавиру	Применение не рекомендуется	Сильная

что скрининг пациентов на носительство аллельного варианта HLA-B*5701 позволяет снизить частоту развития синдрома гиперчувствительности при приеме абакавира с 7–12 % до 0–2 %, при этом данный подход оказался экономически оправданным.

Носительство аллельного варианта HLA-B*5701 (гомозиготное или гетерозиготное) ассоциируется с синдромом гиперчувствительности при применении абакавира у 50 % пациентов, с помощью скрининга частоту развития данного синдрома можно снизить до 0 %.

При выявлении носительства аллельного варианта HLA-B*5701 (гомозиготного или гетерозиготного) следует отказаться от применения абакавира.

Рекомендации по использованию абакавира в зависимости от генотипа HLA-B представлены в табл. 1.

Возможности генной терапии ВИЧ-инфекции

Генная терапия, впервые разработанная для лечения наследственных моногенных патологий, обладает сегодня большим потенциалом 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.

Для массового применения уже одобрено три генно-терапевтических препарата — глибера (ЕС), гендицин (Китай), неоваскулген (РФ). Россия и Китай входят в число формальных лидеров по разработке подобных препаратов, наибольшее число которых сосредоточено в США.

Генная терапия определяется как введение трансгена, кодирующего РНК или белковые агенты, в клетки пациентов с помощью векторов переноса (табл. 2).

По своей природе все клетки в организме человека содержат генетический материал, что делает их потенциальной мишенью для генной терапии. Однако эти клетки могут быть разде-

лены на две основные категории: соматические, к которым принадлежит большинство клеток тела, и зародышевые (половые), 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 генимишень. 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 иметь 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».

Применение генной терапии к соматическим клеткам рассматривается как более консервативный и безопасный подход, поскольку генетической модификации подвергаются только целевые клетки пациента. Соматические клетки непродуктивны, 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 эффекта. Клетки большинства тканей в конечном счете умирают и заменяются новыми, поэтому постоянно необходимы повторные курсы лечения на протяжении всей жизни пациента. Введение генетической информации в клетки-мишени или ткани пациента

Основные группы векторных систем, применяемых в генной терапии [4]

Вектор	Генетический материал	Максимальный размер вставки, т. п. о.	Тропизм	Воспалительный ответ	Форма существования генома вируса в клетках	Основные ограничения	Преимущества
<i>Оболочечные вирусы</i>							
Ретровирусы	РНК	8	Только делящиеся клетки	Низкий	Интегрирован в геном	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
<i>Безоболочечные вирусы</i>							
AAV	оцДНК	< 5	Широкий	Низкий	Эписомальная (> 90%) Интегрирован в геном (< 10%)	Маленькая емкость для встройки чужеродной ДНК	Нетоксичный; низкий воспалительный ответ
Аденовирус	дцДНК	8 ^a 30 000 ^b	Широкий	Высокий	Эписомальная	Капсид вызывает мощный воспалительный ответ	Очень эффективная трансдукция для большинства тканей

Примечание. ^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

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) конкретного пациента и исключение передачи генетической модификации его детям. Генетические модификации зародышевых клеток, считающиеся спорными, запрещены, например, в Европейском Союзе, в основном из-за серьезных этических проблем.

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. Генная терапия *ex vivo* представляет собой технологию, основанную на трансплантации (инфузии)

генетически модифицированных клеток пациенту. При этом из организма изымаются 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 пациента. В настоящее время в большинстве допущенных к клиническим испытаниям программ генной терапии используется именно этот подход [5].

На продолжительность действия препаратов генной терапии влияют различные факторы. Так,

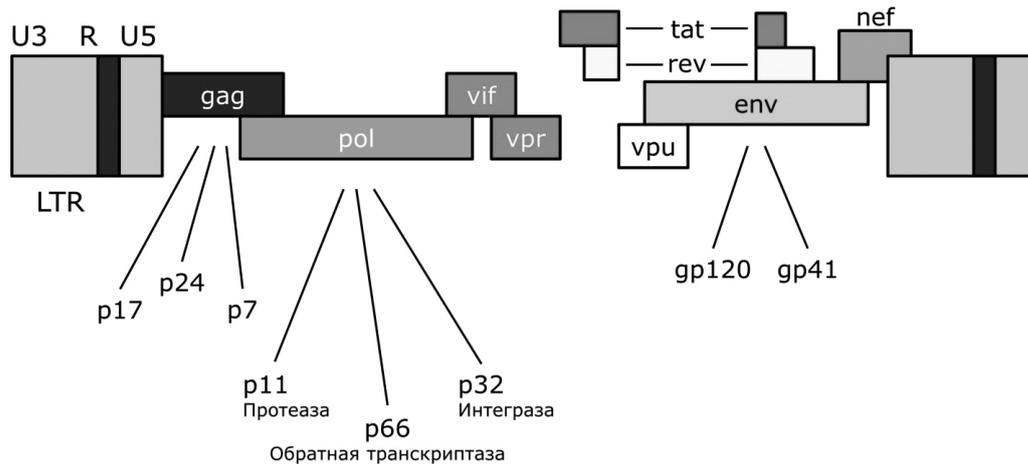


Рис. 3. Схема генома ВИЧ и кодируемые вирусом белки [1]

имеет значение, интегрирован ли трансген в хроматин клетки хозяина, как в случае онкоретровирусных и лентивирусных векторов, или находится в ядре в виде внехромосомных эписом (аденоассоциированные вирусы, аденовирусы и вирусы герпеса). Необходимо отметить, что интеграция не является гарантией стабильной экспрессии, трансген может «замолчать» с течением времени.

Очень важно то, в какой вид клеток будет встроена терапевтический ген. HSC представляют собой привлекательную мишень для генной терапии ВИЧ-1, поскольку данные стволовые клетки производят все клетки, участвующие в его патогенезе (CD4+, Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и микроглии), а их генетическая модификация обеспечивает защиту всего спектра ВИЧ-восприимчивых клеток. Продолжительность существования HSC-клеток насчитывает годы, поэтому они могут служить надежным источником ВИЧ-1-устойчивых клеток крови [6].

CD4+ Т-лимфоциты также являются перспективными мишенями для генной терапии ВИЧ. В последнее десятилетие были достигнуты значительные успехи в технологии поддержания и выращивания Т-клеток крови вне организма. Была 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, однако было отмечено, что у больных, получавших модифицированные Т-лимфоциты, вирусная нагрузка не возрастала.

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 фаз [7]. 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.

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 [8].

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* [9]. Хотя использование анти-ВИЧ-аптамеров выглядит многообещающим, их 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, созданный на основе *Rev*-ингибирующей

РНК-приманки, успешно прошел клинические испытания.

Малые интерферирующие РНК (siRNA) — класс двуцепочечных РНК длиной 21–22 нуклеотида с двумя 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 использованием обычных вирусных векторов, используемых для генной терапии [9].

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. 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 [10]. Одним из подходов, позволяющих избежать данную проблему, является 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- κ B), ВИЧ-рецептор CD4 и ВИЧ и ко-рецепторы CCR5 (C-C мотив) и CXCR4 (C-X-C мотив). Это позволяет блокировать вирусную репликацию или проникновение вируса в клетку [11]. 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-ко-рецептор, тропный к макрофагам, перспективный в качестве мишени, так как нарушения в структуре CCR5-рецептора не оказывают влияния на иммунную систему.

Целевые мишени для белковых агентов генной терапии ВИЧ. Белковые ингибиторы

Как и РНК-ингибиторы ВИЧ, белковые агенты способны блокировать и клеточную, и вирусную мишени. Мутантная форма ВИЧ Rev-белка, названная M10, стала первым белком, используемым в генной терапии ВИЧ. 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 [12]. Эти белки связываются с клеточными или вирусными белками-мишенями, что в большинстве случаев приводит к протеасомному расщеплению белков-мишеней. На сегодня клинические испытания на человеке проведены только для генотерапевтического препарата на основе белка Rev-M10.

Исследование механизмов, ограничивающих распространение ВИЧ в клетках, расширяет арсенал пригодных для терапии молекулярных подходов. Хорошо изучены свойства белка TRIM5 α (Tripartite Interaction Motif 5), обнаруженного у многих приматов и выполняющего функцию подавления ретровирусных инфекций. У некоторых видов макаков (резус макаков) белок TRIM5 α подавляет репликацию ВИЧ-1 в клетках, в то время как ортологичный TRIM5 α белок человека не способен препятствовать жизненному циклу ВИЧ [13]. Выяснено, что тримерный белок TRIM5 α gh макака взаимодействует с гексамерным капсидом вируса с формированием комплекса «вирус — TRIM5 α gh», что блокирует этап «разведения» вируса и перенос его нуклеиновой кислоты в ядро клетки [14].

Всего лишь одна-две ключевые аминокислоты определяют разницу в специфической активности человеческого и резус-TRIM5 α белков и ответственны за возможность взаимодействия с ВИЧ-1-капсидом [15]. Кроме того, TRIM5 α ограничивает ВИЧ-1 на поздней фазе репликации вируса [16]. 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 TRIM5 α белка [17]. Результаты данных исследований поддержали идею использования для генотерапии химерных человек-резус TRIM5 α -вариантов (TRIM5 α gh-xu) или искусственно модифицированных вариантов TRIM5 α белка человека, что минимизирует антигенность при проведении генотерапии. Использование модифицированного TRIM5 α как части комбинированной антиВИЧ генотерапии представляется очень многообещающим [18].

Некоторые члены APOBEC3 (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 генома. Белок A3G способен упаковываться в вирион и блокировать обратную транскрипцию дезаминированием минус-цепи.

Однако фактор Vif (viral infectivity factor) вируса образует комплекс с APOBEC3G и блокирует его активность. При наличии Vif белка APOBEC3G связывается, убиквитинируется, подвергается деградации и теряет возможность встраиваться в новые вирусные частицы [19].

Изучение биологических функций и особенностей участия APOBEC3-белков в репликации ВИЧ-1 в различных типах клеток продолжается [20].

Разрабатываются некоторые генотерапевтические стратегии, использующие активность APOBEC3G-белка, например, применение специфических ингибиторов, блокирующих взаимодействие Vif и APOBEC3G или препятствующих внутриклеточному распаду APOBEC3G. Терапия данными агентами потенциально может нанести вред пациенту и благодаря высокой скорости мутагенеза способствовать эволюции ВИЧ-1 и развитию устойчивости, поэтому в данном случае подчеркивается необходимость тщательной оценки безопасности [21]. 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. Изучение молекулярной биологии взаимодействия Vif белка ВИЧ-1 с хозяйским белком BST-2 (тетерин, костномозговой стромальный клеточный антиген 2) является предметом пристального интереса специалистов и может дать новое поколение ВИЧ-1-ингибиторов [22].

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

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. Данные белковые ингибиторы могут быть экспрессированы с использованием ретро- или лентивирусных векторов, являются удобным объектом для разработки на их основе препаратов генной терапии.

Адресное воздействие на CCR5-мишень

Цитокиновый рецептор 5 (CCR5) — основной молекулярный ко-рецептор, используемый ВИЧ для проникновения в клетки. 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. Данное наблюдение послужило толчком к разработке против-ВИЧ лекарственных препаратов, действие которых основано на нарушении взаимодействия вируса и CCR5 ко-рецептора. Примером является одобренный к применению препарат ВААРТ маравирик [23].

Ныне ведутся многочисленные исследования, направленные на разработку генотерапевтических препаратов, действие которых заключается в существенном снижении или полном подавлении экспрессии CCR5, и результаты позволяют надеяться на успех. Так, у известного «берлинского пациента», которому трансплантировали гемопоэтические стволовые прогениторные клетки (HSC) от донора, несущего CCR5Δ32-мутацию, наблюдалось полное удаление ВИЧ-1-инфекции при отсутствии обычной противовирусной терапии. 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.

Подавление CCR5-экспрессии путем генной терапии

Такие подходы, как РНК-интерференция, рибозимы, антисмысловые РНК и секвестрация белка, последующая за экспрессией внутриклеточных антител к CCR5, 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. Альтернативный подход заключается в достижении постоянной экспрессии предшественников малых интерферирующих РНК, shRNA с помощью модификации клеток лентивирусными векторами [24]. Стратегия по направленной доставке лентивирусных векторов, экспрессирующих shRNA в CCR5⁺-клетки, была продемонстрирована на примере РВМС-трансплантированных мышей.

Описан пример объединения анти-CCR5 shRNA с химерным геном TRIM5α белка и геном TAR-приманки в одном 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 TRIM5 α -агент) и после интеграции (TAR-приманка-агент) был опробован в *in vitro* и *in vivo* на мышах.

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 летнивирусным вектором к CD34+-гемопоэтическим стволовым клеткам из лимфомы больных СПИДом, перенесших химиотерапию и подвергшихся трансплантации своих же собственных гемопоэтических стволовых клеток. Присутствие в организме клеток, экспрессирующих рекомбинантный ген, через 24 мес после трансплантации демонстрирует обоснованность применения данного подхода.

Больные СПИДом 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 подходов, процесс достижения и поддержания достаточного уровня анти-CCR5-активности является трудозатратным, а часто вообще невыполнимым. Ограничения вышеупомянутых методов способны преодолеть подход, основанный на использовании метода редактирования генома с помощью нуклеаз типа «цинковых пальцев» (Zinc Finger Nucleases, ZFN). Данная стратегия обеспечит постоянное отключение CCR5-гена без необходимости поддержания долгосрочной экспрессии ZFN-агента в клетках [25].

Редактирование генома.

Выключение гена CCR5 с использованием нуклеаз с «цинковыми пальцами»

На протяжении последних лет ученым удалось добиться значительного прогресса в области генной инженерии. Теперь стало возможным редактирование генетической информации не только подопытных животных, но и людей.

Ученые из Массачусетского госпиталя предложили использовать особые димерные РНК-направляющие нуклеазы для коррекции генетической информации. Такие элементы обладают способностью распознавания больших последовательностей нуклеотидов ДНК с редактированием нужных генов. Успешность манипуляций по коррекции генотипа клеток во многом определяется точностью присоединения участков димерных

молекул ДНК и РНК. При этом должна совпадать как последовательность, так и ориентация молекул. Только при соблюдении всех этих факторов можно добиться получения предсказуемого результата. В противном случае повышается возможность формирования ошибочных соединений, дефектных молекул, что приводит к неблагоприятным последствиям.

Однонитевые молекулы РНК способны распознавать короткие фрагменты ДНК и разделять их при помощи ферментов нуклеаз. Впоследствии молекула ДНК восстанавливает свою структуру на определенной матрице. Ученые смогли создать нужные им цепочки РНК, в которых последовательности нуклеотидов кодируют необходимые гены.

Нуклеазы с «цинковыми пальцами» — это рекомбинантные белки, состоящие из двух доменов: ДНК-связывающего домена типа «цинковые пальцы» и домена с активностью эндонуклеазы рестрикции первого типа.

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. Применение данного подхода позволяет сконструировать нуклеазу ZFN, способную с высокой специфичностью связываться только с уникальной целевой последовательностью в геноме человека [26].

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 двунитовых 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, позволяет удалять ген чувствительности ВИЧ. В данном случае в результате репарации ДНК с высокой вероятностью дублируется 5bp-фрагмент целевой последовательности. Это приводит к появлению двух соседних стоп-кодонов 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 двуцепочечной ДНК будет завершено, клеткой хозяина 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 [27].

Принимая во внимание проблемы, связанные с необходимостью непрерывной борьбы за здоровье ВИЧ-инфицированных пациентов и, соответственно, большие экономические затраты в условиях эпидемии ВИЧ-1, 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, ныне быстро теряющих необходимую эффективность. При этом комбинированное использование генномодифицированных CD4+ Т-лимфоцитов и CD34+ стволовых клеток может дать 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.

Список литературы

1. Проблемы и перспективы генной терапии против ВИЧ (обзор) / А. Шнайдер, А. Вагнер, Е. Е. Давыдова [и др.] // Хим.-фарм. журн.— 2013.— Т. 47, № 12.— С. 3–12.

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-эпидемии, эффективно и безопасно лечить СПИД.

Генная терапия позволяет вносить в клетки пациента трансгены, экспрессирующие анти-ВИЧ-агенты, влияющие, аналогично ВААРТ, на жизненный цикл вируса. В отличие от ВААРТ, действие генотерапевтических препаратов долговременно, так как анти-ВИЧ-агенты появляются в клетках пациента уже после однократного приема и продолжают экспрессироваться в течение всей жизни модифицированных клеток. Известны анти-ВИЧ-агенты на основе различных типов РНК (рибозимы, антисмысловые РНК, аптамеры РНК, РНК-приманки, малые интерферирующие РНК) и белковые агенты (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 ко-рецептора хемокина CCR5, но со временем активность интегрированных в геном анти-CCR5-агентов снижается («сайленсинг генов»).

Большое внимание общественности к CCR5 в качестве мишени генной терапии привлек так называемый «берлинский пациент», с использованием в качестве анти-CCR5-агента нуклеаз «цинковых пальцев» (ZFN) можно вносить изменения, позволяющие модифицированным клеткам в течение всего срока жизни генерировать ВИЧ-устойчивые лимфоциты, как у людей с мутацией CCR5Δ32. Клинические испытания этого подхода продолжаются.

Особого внимания заслуживает разработка метода лечения ВИЧ-инфицированных клеток с использованием Тре-рекомбиназных агентов. Предварительные результаты экспериментов показали, что применение данных препаратов приводит к удалению интегрированной провирусной ДНК вируса из генома в клеточных линиях и у мышей. Этот важный шаг позволяет уничтожить скрытые резервуары вируса и полностью убрать его из организма.

Таким образом, генная терапия ВИЧ-инфекции привлекает многих ученых, фармацевтов и фармакологов, так как потенциально способна обеспечить эффективное лечение или даже полное излечение этого пока еще неизлечимого заболевания.

2. *Meanwell N. A.* Maraviroc, a chemokine CCR5 receptor antagonist for the treatment of HIV infection and AIDS / N. A. Meanwell, J. F. Kadow // *Curr. Opin. Investig. Drugs.*— 2007.— № 8 (8)— P. 669–681.

3. Pharmacogenetics as a tool to tailor antiretroviral therapy: A review / A. Aceti, L. Gianserra, L. Lambiase [et al.] // *World J. Virol.*— 2015.— Vol. 12, № 4 (3).— P. 198–208.
4. *Clare E. T.* Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy / E. T. Clare, A. Ehrhardt, M. A. Kay // *Nature.*— 2003.— № 4.— P. 346–358.
5. *Rossi J. J.* Genetic therapies against HIV / J. J. Rossi, C. H. June, D. B. Kohn // *Nature Biotechnology.*— 2007.— № 12.— P. 1444–1454.
6. Gene therapy for HIV infection / C. de Mendoza, P. Barreiro, L. Benitez, V. Soriano // *Expert. Opin. Biol. Ther.*— 2015.— № 15 (3).— P. 319–327.
7. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells / R. T. Mitsuyasu, T. C. Merigan, A. Carr [et al.] // *Nature Medicine.*— 2009.— № 15 (3).— P. 285–292.
8. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector / B. L. Levine, L. M. Humeau, J. Boyer [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2006.— № 103.— P. 17372–17377.
9. *Zeller S. J.* RNA-based gene therapy for the treatment and prevention of HIV: from bench to bedside / S. J. Zeller, P. Kumar // *Yale J. Biol. Med.*— 2011.— № 84 (3).— P. 301–309.
10. Sequence homology required by human immunodeficiency virus type 1 to escape from short interfering RNAs / R. Sabariego, M. Gimenez-Barcons, N. Tapia [et al.] // *J. Virol.*— 2006.— № 80.— P. 571–577.
11. *Cannon P.* Chemokine receptor 5 knockout strategies / P. Cannon, C. June // *Curr. Opin. HIV AIDS.*— 2011.— № 6 (1).— P. 74–79.
12. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis / A. B. Balazs, J. Chen, C. M. Hong [et al.] // *Nature.*— 2012.— № 481.— P. 81–86.
13. Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients / C. Woffendin, U. Ranga, Z. Yang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1996.— № 93.— P. 2889–2894.
14. Hexagonal assembly of a restricting TRIM5alpha protein / B. K. Ganser-Pornillos, V. Chandrasekaran, O. Pornillos [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2011.— № 108.— P. 534–539.
15. Structural insight into HIV-1 capsid recognition by rhesus TRIM5α / H. Yang, X. Ji, G. Zhao, J. Ning [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2012.— № 109 (45).— P. 18372–18377.
16. Retroviral restriction factors TRIM5α: therapeutic strategy to inhibit HIV-1 replication / J. Zhang, W. Ge, P. Zhan [et al.] // *Curr. Med. Chem.*— 2011.— № 18 (17).— P. 2649–2654.
17. A single amino acid substitution of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein affects viral sensitivity to TRIM5 alpha / A. Kuroishi, K. Bozek, T. Shioda [et al.] // *Retrovirology.*— 2010.— № 7.— P. 58.
18. An HIV-1 resistance polymorphism in TRIM5α gene among Chinese intravenous drug users / F. L. Liu, Y. Q. Qiu, H. Li [et al.] // *Acquir. Immune Defic. Syndr.*— 2011.— № 56.— P. 306–311.
19. Adaptation of HIV-1 to cells expressing rhesus monkey TRIM5α / B. Pacheco, A. Finzi, M. Stremlau, J. Sodroski // *Virology.*— 2010.— № 408.— P. 204–212.
20. *Albin J. S.* Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics / J. S. Albin, R. S. Harris // *Exp. Rev. Mol. Med.*— 2010.— № 12.— P. 4.
21. *Mbisa J. L.* APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms / J. L. Mbisa, W. Bu, V. K. Pathak // *J. Virol.*— 2010.— № 84.— P. 5250–5259.
22. APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis / H. A. Sadler, M. D. Stenglein, R. S. Harris [et al.] // *J. Virol.*— 2010.— № 84.— P. 7396–7404.
23. *Tokarev A. A.* Serine-threonine ubiquitination mediates downregulation of BST-2 tetherin and relief of restricted virion release by HIV-1 Vpu / A. A. Tokarev, J. Munguia, J. C. Guatelli // *J. Virol.*— 2011.— № 85.— P. 51–63.
24. *Westby M.* CCR5 antagonists: host-targeted antiviral agents for the treatment of HIV infection, 4 years on / M. Westby, E. van der Ryst // *Antivir. Chem. Chemother.*— 2010.— № 20.— P. 179–192.
25. Engineering HIV-1-resistant T-cells from short-hairpin RNA-expressing hematopoietic stem/progenitor cells in humanized BLT mice / G. E. Ringpis, S. Shimizu, H. Arokium [et al.]— 2012, *PLoS ONE.*— № 7 (12).— P. e53492.
26. *Cannon P.* Chemokine receptor 5 knockout strategies / P. Cannon, C. June // *Curr. Opin. HIV AIDS.*— 2011.— № 6 (1).— P. 74–79.
27. Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5 / D. A. Maier, A. L. Brennan, S. Jiang [et al.] // *Human Gene Therapy.*— 2013.— № 24.— P. 245–258.

ФАРМАКОГЕНОМІКА АНТИРЕТРОВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ, ГЕННА ТЕРАПІЯ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ І РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМУ

М. М. ШЕГАЙ, А. ШНАЙДЕР, Н. Л. ШИМАНОВСЬКИЙ

Розглянуто шляхи використання фармакогенетики антиретровірусних препаратів для оптимізації терапії ВІЛ-інфекції. Описано анти-ВІЛ-речовини на основі різних типів РНК (рибозими, антисмислові РНК, аптамери РНК, РНК-приманки, малі інтерферуючі РНК) і білкові агенти – RevM10, внутрішньоклітинні антитіла й інтракіни.

Ключові слова: фармакогенетика, антиретровірусні засоби, генна терапія, ВІЛ-інфекція.

**PHARMACOGENOMICS OF ANTIRETROVIRAL DRUGS,
GENETIC THERAPY AGAINST HIV INFECTION AND GENOME EDITION**

M. M. SHEGAI, A. SHNAIDER, N. L. SHIMANOVSKY

Application of phramcogenomics of antiretroviral drugs and genetic therapy to optimize the treatment for HIV infection are featured. Anti-HIV agents based on different kinds of RNA (ribozymes, antisense RNA, RNA aptamers, RNA decoys, small interfering RNA) and protein agents (RevM10, intracellular antibodies and intrakines) are described.

Key words: phramcogenomics, anti-HIV agents, genetic therapy, HIV infections.

Поступила 06.10.2015