

Д.В. Глазкова¹, Е.В. Богословская¹, М.Л. Маркелов², Г.А. Шипулин¹, В.В. Покровский¹

¹ ФГБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

² ФГБУ «Институт медицины труда» РАМН, Москва

Лечение ВИЧ-инфекции с помощью генной терапии

Современные методы лечения ВИЧ-инфекции позволяют сдерживать скорость развития заболевания, но не приводят к его излечению. Антитретровирусная терапия является пожизненной, дорогостоящей и сопровождается накоплением побочных эффектов. Последние достижения науки позволили предложить принципиально новый подход к лечению ВИЧ-инфекции — генную терапию. Настоящая публикация посвящена одному из направлений генной терапии ВИЧ, которое получило название «внутриклеточная иммунизация». В основе этого направления лежит идея введения антивирусных генов в чувствительные к ВИЧ клетки. В статье рассмотрены механизмы действия различных антивирусных генетических агентов, обсуждаются вопросы, связанные с выбором клеток-мишеней и способом доставки терапевтических генов. Представлены результаты клинических испытаний некоторых генно-терапевтических препаратов для лечения ВИЧ-инфекции.
Ключевые слова: генная терапия, ВИЧ, вирусный вектор, антивирусные гены.

16

Введение

Современные успехи в лечении ВИЧ-инфекции были достигнуты с помощью препаратов, полученных традиционными методами химического синтеза активных молекул, блокирующих действие ферментов ВИЧ или препятствующих проникновению ВИЧ в CD4+ Т-лимфоциты — основную популяцию клеток, поражаемых вирусом. Одновременное применение нескольких препаратов разных типов, называемое высокоактивной антиретровирусной терапией (ВААРТ), подавляет репликацию ВИЧ и приводит к постепенному увеличению числа CD4+ клеток. Однако особенностью репликации ВИЧ является его способность интегрироваться в геном клеток и годами сохраняться в форме провируса в долгоживущих клетках, не подвергаясь действию антиретровирусных препаратов. При отмене терапии отдельные провирусы активируются, и вновь начинается размножение ВИЧ. В связи с этим современное лечение комбинацией препаратов должно проводиться пожизненно, что делает его исключительно дорогостоящим и приводит к накоплению побочных эффектов, связанных с токсичностью используемых химических препаратов.

В 2011 г. было опубликовано сообщение об уникальном случае полного излечения от ВИЧ-инфекции. Данный случай связан с активно развивающимся и перспективным подходом в лечении ВИЧ-инфекции, который называют генной терапией. Подход основан на введении в клетки генетических конструкций, экспрессия которых (т.е. образование функциональных молекул белка или РНК на основании кодируемой генетическими конструкциями информации) придает организму устойчивость к вирусу. Можно выделить три основных направления в генной терапии ВИЧ. Первое — введение генетических последовательностей, которые кодируют молекулярные агенты, подавляющие репликацию вируса в чувствительных клетках или защищающие эти клетки от проникновения вируса, — направление, получившее название «внутриклеточная иммунизация» [1]. Второе направление предполагает генетическую модификацию цитотоксических лимфоцитов и/или В-лимфоцитов за счет введения генов, кодирующих специфические к ВИЧ рецепторы, цитокины или другие агенты, усиливающие противовирусный иммунный ответ хозяина [2]. И, наконец, третье направление — это терапевтическая или профилактическая вакцинация, основанная на введении генов ВИЧ для

D.V. Glazkova¹, E.V. Bogoslovskaya¹, M.L. Markelov², G.A. Shipulin¹, V.V. Pokrovskiy¹

¹ Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federal service on customers' rights protection and human well-being surveillance

² Research Institute of Occupational Health of Russian Academy of Medical Sciences

Treatment Of HIV-Infection By Means Of Gene Therapy

Current methods of HIV treatment can contain a progression of the disease; however they do not lead to a cure. Lifelong antiretroviral therapy is therefore necessary, leading to problems of cost and toxicity of chemical drugs. The recent advances in science have allowed a new approach to the HIV-treatment — gene therapy. In the present publication we focus on one strategy of the gene therapy called «intracellular immunization». The strategy is based on the introducing of antiviral genes into the HIV-sensitive cells. We highlight the mechanisms of action of various antiviral genetic agents and discuss some issues concerning target cells and genes delivery. Finally we summarize the results of certain gene therapy clinical trials.

Key words: gene therapy, HIV, viral vector, antiviral genes.

экспрессии отдельных вирусных антигенов внутри клетки [3]. Данный обзор посвящен обсуждению работ, ведущихся в рамках первого направления, которое, на наш взгляд, на сегодняшний день является наиболее перспективным.

Внутриклеточная иммунизация предполагает введение терапевтических генов в клетки иммунной системы (клетки-мишени), которые поражает ВИЧ. Для этого используется метод *ex vivo*, который включает изоляцию данных клеток пациента, их генетическую модификацию в условиях культивирования *in vitro* и аутологичную трансплантацию. В настоящее время в качестве клеток-мишеней в генотерапии ВИЧ используют или CD4+ Т-лимфоциты, или гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Преимуществом использования Т-лимфоцитов является простота условий культивирования и относительная легкость наращивания *in vitro* этой популяции клеток, что позволяет получить Т-клеточную массу в количествах, достаточных для нескольких инфузий. Результаты клинических испытаний I фазы подтверждают безопасность процедуры пересадки Т-лимфоцитов [4–7]. Недостатком Т-клеточной терапии является ограниченный срок жизни лимфоцитов, что обуславливает необходимость повторных введений трансгенных клеток.

Помимо CD4+ Т-лимфоцитов ВИЧ может заражать и образовывать латентный резервуар в моноцитах/макрофагах, дендритных и некоторых других клетках. Генетическая модификация ГСК может защитить весь спектр восприимчивых клеток, поскольку они являются предшественниками всех клеток, вовлеченных в инфекцию вирусом. Модифицированные ГСК могут в течение всей жизни являться источником ВИЧ-устойчивых клеток. Однако на данный момент не существует надежных способов размножения ГСК в культуре, поскольку культивирование ГСК ведет к прогрессирующей потере стволовых свойств. Исследуется возможность использования и других клеточных популяций, например, общих предшественников лимфоцитов [8] или индуцированных стволовых клеток [9, 10].

Чтобы защитить всех потомков модифицированных клеток, терапевтический ген должен передаваться в дочерние клетки, что возможно только в том случае, если он интегрирован в хромосому. Осуществить встраивание генетических конструкций в хромосому позволили векторы, созданные на базе γ -ретровирусов и лентивирусов. γ -Ретровирусный вектор был первым вектором, который применили в клинических испытаниях [11]. Основной проблемой, с которой столкнулись при использовании этого вектора, оказалась генотоксичность, т.е. способность вызывать злокачественное перерождение клетки. Кроме того, с течением времени происходило уменьшение экспрессии, что приводило к ослаблению терапевтического эффекта [12]. Этим недостатком лишены лентивирусные векторы, которые, кроме того, в отличие от γ -ретровирусных векторов, способны переносить генетический материал в неделящиеся клетки, что особенно важно при манипуляциях с ГСК [12]. В связи с этим в последних клинических испытаниях отдают предпочтение именно этим векторам.

Антивирусные агенты

Первые генетические конструкции кодировали анти-вирусные агенты, которые были направлены на ингибирование вирусной транскрипции и трансляции на

поздних стадиях жизненного цикла вируса после встраивания вирусной ДНК в геном. К таким агентам относятся доминантно-негативные белки, внутриклеточные антитела (intrabodies) против белка Tat, TAR (trans-activating response region)-ловушка, антисмысловые последовательности, рибозимы, короткие интерферирующие РНК (киРНК), направленные против вируса и др.

Трансдоминантный белок Rev представляет собой мутированный вирусный белок, который сохраняет РНК-связывающую активность в отношении ВИЧ, однако задерживается в ядре и таким образом нарушает транспорт мРНК ВИЧ из ядра в цитоплазму. Было создано несколько вариантов трансдоминантного белка (RevM10, TdRev, huRevM10), которые эффективно работали *in vitro* и были использованы в клинических испытаниях [13]. Другой антивирусный агент, TAR-ловушка, представляет собой короткий фрагмент РНК ВИЧ, который связывает вирусный белок Tat, являющийся активатором транскрипции. Наличие в клетке TAR-ловушки приводит к снижению концентрации свободного белка Tat и во много раз уменьшает скорость репликации ВИЧ [14]. Механизм действия внутриклеточных антител, специфичных к белку Tat, также основан на связывании и инактивации этого белка [15]. Антисмысловые (антисенс) РНК — короткие или длинные РНК-последовательности, комплементарные последовательности РНК ВИЧ — образуют дуплексы с вирусной РНК, делая ее нефункциональной и приводя к деградации. Множество антисенс-конструкций, исследованных *in vitro*, обладали способностью подавлять размножение вируса [16]. Было показано, что молекулы РНК длиной более 800 п.н. (пар нуклеотидов) обладают большим антивирусным потенциалом, и опосредованное ими ингибирование менее чувствительно к возникновению мутированных вирусных вариантов [16]. Одна из конструкций, содержащая антисенс-последовательность, была протестирована во II фазе клинических испытаний (см. ниже).

Для внутриклеточной иммунизации были использованы также рибозимы — РНК-ферменты, способные расщеплять РНК-мишени. Связывание с мишенью и ее дальнейшее разрушение определяется комплементарностью плечей рибозима и РНК-молекулы. Рибозимы, сконструированные для специфического расщепления РНК ВИЧ, позволили ингибировать размножение вируса на нескольких экспериментальных моделях [7, 17, 18].

После открытия РНК-интерференции, которая заключается в специфическом подавлении экспрессии генов при помощи малых двухцепочечных молекул РНК, было исследовано огромное количество коротких интерферирующих РНК (киРНК), направленных против вирусной РНК, и показано ингибирование репликации вируса на различных модельных системах [19]. Существенным недостатком использования киРНК и рибозимов против ВИЧ является быстрое возникновение устойчивых вирусных мутантов. Для решения этой проблемы было предложено применять комбинации из нескольких анти-вирусных агентов, направленных против консервативных участков РНК вируса [20, 21].

Теоретически ингибирование ВИЧ на ранней стадии жизненного цикла имеет значительные преимущества. Использование механизмов, блокирующих вирус до интеграции провируса в геном, должно приводить к накоплению пула незараженных модифицированных клеток, которые могут нормально функционировать в орга-

низме, внося свой вклад в борьбу с ВИЧ. Было предложено несколько генетических агентов, предотвращающих интеграцию вируса в геном, среди которых модифицированные клеточные факторы рестрикции, ингибиторы слияния, а также различные агенты, нарушающие экспрессию корцептора ВИЧ CCR5.

Выключение рецепторов

После того как было установлено, что для проникновения в клетку ВИЧ необходимо взаимодействие вирусной частицы с рецептором CD4 и корцептором CCR5 или CXCR4, возникла идея выключения этих рецепторов для защиты клетки от заражения. От манипуляций с рецепторами CD4 и CXCR4 в генной терапии пришлось отказаться, т.к. было показано, что они необходимы для нормального функционирования клеток [22]. Блокирование же CCR5, напротив, оказалось многообещающим. Было показано, что наличие полиморфного варианта гена *CCR5Δ32*, содержащего делецию 32 п.н. и кодирующего нефункциональный белок, уменьшает вероятность инфицирования и замедляет развитие заболевания [23]. Среди ВИЧ-инфицированных лиц частота встречаемости гетерозигот снижена по сравнению с таковой в популяции в 3 раза, а для гомозигот *CCR5Δ32* описаны лишь единичные случаи заражения вирусом [23, 24]. Важно отметить, что не было обнаружено патологий, ассоциированных с наличием делетированного варианта *CCR5*.

Ярким свидетельством эффективности в борьбе с вирусом и безопасности выключения *CCR5* является уникальный случай выздоровления ВИЧ-инфицированного пациента после трансплантации костного мозга, полученного от донора, гомозиготного по *CCR5Δ32*. Пересадка костного мозга, проведенная в связи с рецидивом острой миелодной лейкемии, привела к полному замещению пула CD4⁺-клеток крови и лимфоидных органов донорскими клетками без CCR5-рецептора. Позже произошло и замещение макрофагов. Несмотря на то, что ВААРТ была прервана сразу после трансплантации, наблюдение показало отсутствие вируса в плазме и провирусной ДНК в клетках периферической крови в течение 46 мес после операции [25].

Было предложено несколько различных способов выключения CCR5-рецептора с помощью терапевтических генов, в т.ч. РНК-интерференция, расщепление CCR5 РНК-рибозимами, нейтрализация рецептора внутриклеточными антителами, инактивация гена за счет внесения делеций в ДНК с использованием сайт-специфических нуклеаз [26].

В двух независимых лабораториях были созданы рибозимы, расщепляющие мРНК гена *CCR5*, уменьшающие выраженность экспрессии гена рецептора и тем самым ингибирующие размножение CCR5-тропного вируса *in vitro* [27, 28]. Другой подход позволил сконструировать ген, кодирующий внутриклеточное антитело, специфичное к *CCR5*. В этом случае внутриклеточные антитела связывают рецептор CCR5 и удерживают его в эндоплазматическом ретикулуме, таким образом значительно снижая количество рецепторов на поверхности клетки. В экспериментах *in vitro* было показано, что клетки, экспрессирующие данный ген, были устойчивы к заражению CCR5-тропным вирусом [29].

Были исследованы различные киРНК для стабильного выключения гена *CCR5* [30 – 33]. Введение в клетки киРНК эффективно снижало количество рецепторов

на поверхности клеток и обуславливало устойчивость клеток к ВИЧ. Однако высокий уровень экспрессии киРНК во многих случаях являлся цитотоксичным для клетки. Одна из причин токсичности — насыщение белковых комплексов, процессирующих клеточные киРНК, и конкуренция искусственных киРНК с эндогенными [34]. Кроме того, при высоких концентрациях киРНК возможно ингибирование других клеточных генов за счет частичной комплементарности [35]. Для того, чтобы избежать цитотоксичности, было предложено применять вектор, содержащий высокоэффективную киРНК под более слабым промотором. Исследования *in vivo* показали, что пересадка модифицированных этим вектором ГСК человека гуманизированным мышам приводила к уменьшению выраженности экспрессии гена рецептора в дифференцированных Т-лимфоцитах и моноцитах, при этом побочных эффектов не наблюдалось [33].

Еще более привлекательной альтернативой может послужить использование киРНК, сконструированных в форме искусственных микроРНК, имитирующих эндогенные микроРНК. Такие микроРНК более эффективны по сравнению с киРНК: значительно меньшее число молекул микроРНК в клетке приводит к аналогичному уровню ингибирования при отсутствии цитотоксичности [36 – 38]. Кроме того, в составе одного транскрипта могут быть экспрессированы несколько искусственных микроРНК, направленных против различных участков гена, что позволяет увеличить их эффективность [38].

Недавно был предложен и испытан новый метод выключения рецептора при помощи искусственно созданной сайт-специфической дезоксирибонуклеазы (фермента, расщепляющего ДНК) [39]. Такая нуклеаза способна избирательно связываться с последовательностью гена *CCR5* в хромосоме и вносить в нее двухцепочечный разрыв. После репарации в этой области ДНК образуются делеции или вставки, приводящие к инактивации гена. Оптимизированный метод обработки клеток с помощью данной нуклеазы позволяет модифицировать около 17% клеток, при этом у 5–7% клеток разрушаются оба аллеля. В экспериментах на гуманизированных мышах, зараженных ВИЧ, происходила быстрая селекция клеток без рецептора, и наблюдалось уменьшение вирусной нагрузки у животных [40]. Результаты I фазы клинических испытаний вектора, кодирующего CCR5-нуклеазу, использованного для модификации Т-лимфоцитов, достаточно оптимистичны (см. ниже).

Ингибиторы слияния ВИЧ с клеткой

Белок вирусной оболочки gp41 участвует в слиянии вирусной и клеточной мембраны, причем сближение с клеткой происходит за счет взаимодействия его С- и N-концевых участков. Был сконструирован короткий пептид, повторяющий С-концевую часть gp41 (С-пептид), который, связываясь с N-концевой частью вирусного gp41, блокирует конформационные изменения, необходимые для слияния мембран. В результате заражения клетки не происходит. Один из вариантов С-пептида (С36) длиной 36 аминокислот является основой антиретровирусного препарата энфувиртид (Т20, Фузеон) и одобрен для применения в клинической практике в 2003 г. [41]. Недостатком препарата является быстрое образование устойчивых к нему вариантов вируса, а также парентеральный способ введения, из-за чего клиническое его использование ограничено.

Для использования С-пептида в генной терапии von Laer и соавт. разработали вектор, кодирующий С46-пептид, который экспонируется на поверхности клеточной мембраны, обеспечивая высокую концентрацию белка непосредственно в области взаимодействия с вирусом. Увеличенный на 10 аминокислотных остатков С46-пептид обладал антивирусной активностью в отношении вирусов, устойчивых к Т20. Его высокая ингибирующая активность была показана на культуре первичных лимфоцитов [42].

Клеточные факторы рестрикции

В процессе изучения механизмов устойчивости клеток приматов к ВИЧ были обнаружены факторы рестрикции — клеточные белки, способные ингибировать размножение вируса. Установлено, что в клетках макака-резус (*Macaca mulatta*) защиту от вируса обеспечивает обезьяний белок *hTRIM5a*, который связывается с капсидом вириона и вызывает его деградацию до образования провируса [43]. Исследование человеческого гомолога белка *huTRIM5a* показало, что он неэффективен по отношению к ВИЧ, однако изменение всего одного аминокислотного остатка в области связывания капсида делает клетки более устойчивыми к ВИЧ [44]. Замена 11 аминокислотных остатков в белке *huTRIM5a* на 13 остатков из белка обезьян позволила получить химерный белок, активность которого была показана на нескольких модельных системах, в том числе *in vivo* на модели гуманизированных мышей [45]. У другого представителя обезьян, трехполосого дурукули (*owl monkey*), клетки от заражения ВИЧ защищает белок *TRIM-Cyp*, первая часть аминокислотной последовательности которого гомологична белку *TRIM*, а вторая — белку циклофилин А (*cyclophilin A*) [46]. В процессе работы Neagu et al. был сконструирован человеческий аналог, соединивший *huTRIM5a* и циклофилин А человека в один белок, и продемонстрировано ингибирование ВИЧ в CD4⁺-клетках и макрофагах, модифицированных данным геном [47].

Обнаружены и другие противовирусные клеточные факторы, которые могут быть использованы как потенциальные агенты в генной терапии — это белки *APOBEC3G* и *Tetherin*. Однако ВИЧ обладает естественной защитой от этих факторов в виде белков *vif* и *vpr*, которые нейтрализуют действие *APOBEC3G* и *Tetherin*, соответственно. Несколько исследователей предложили использовать *vif*-устойчивый *APOBEC3G*, полученный посредством единичной аминокислотной замены [48, 49], а в работе Gupta получен *Tetherin*, устойчивый к вирусному *vpr* [50]. Показано, что в процессе репликации ВИЧ взаимодействует с сотнями клеточных генов, некоторые из которых могут проявлять ингибирующую активность, как, например, гены *Mov10* [51] и *CPSF6* [52].

Комбинирование антивирусных генов

Вследствие высокой изменчивости ВИЧ введение в клетку одного противовирусного гена во многих случаях приводит к появлению устойчивых к этому агенту вариантов вируса. В случае ингибирования рецептора *CCR5* сохраняется вероятность размножения вариантов ВИЧ, тропных к *CXCR4*-рецептору, которые обнаруживаются у пациентов, имеющих давнюю историю инфицирования ВИЧ. Решением данной проблемы может стать исполь-

зование в структуре одного вектора комбинации генов, механизм действия которых различен. Такие векторы были разработаны в нескольких лабораториях [30, 53, 54]. «Тройной» вектор (*triple vector*), содержащий три различных РНК-гена (*CCR5*-рибозим, *TAR*-ловушку и киРНК против *gag*), показал хорошие результаты на модели иммунодефицитных гуманизированных мышей и дошел до клинического испытания I фазы [53]. Другой вариант комбинированного вектора, появившийся позже, также включал три элемента — *CCR5* киРНК, химерный белок *TRIM5a* и *TAR*-ловушку — и эффективно ингибировал ВИЧ в макрофагах и CD4⁺-лимфоцитах, дифференцированных из ГСК [30]. Предотвратить возникновение устойчивых вариантов вируса при использовании РНК-интерференции позволило введение четырех киРНК, направленных против различных участков вирусного транскрипта [20]. Продемонстрировано успешное подавление вируса при помощи комбинации ингибитора слияния С46 и двух киРНК, направленных против ВИЧ РНК [54]. В целом накопленные данные показывают, что включение в вектор генетических последовательностей, кодирующих несколько антиВИЧ-агентов, позволяет блокировать появление устойчивых мутантов и усиливает антивирусный эффект.

В настоящее время в России во ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора ведется разработка противовирусной конструкции, в состав которой должны войти микроРНК против рецептора *CCR5*, гибридный белок *TRIM5a*, антисмысловая последовательность, а также *TAR*-ловушка. Доставка этой конструкции в клетку будет осуществляться с помощью лентивирусного вектора. Для ингибирования *CCR5*-рецептора создана комбинация из двух искусственных микроРНК, ее эффективность продемонстрирована на индикаторной линии клеток человека [55]. Антивирусная активность других генов показана на модели лимфобластоидных клеточных линий [56].

Клинические испытания

Результаты первого клинического испытания антивирусного трансгена (*RevM10*) были опубликованы в 1996 г. [57]. С тех пор в рамках направления по внутриклеточной иммунизации было инициировано более 30 клинических испытаний, в которых протестировано не менее 20 генно-терапевтических препаратов [58]. Большая часть исследований была проведена с целью оценки безопасности и осуществимости трансплантации пациентам CD4⁺ Т-лимфоцитов или CD34⁺ ГСК, модифицированных антиВИЧ-генетическими конструкциями, т.е. они являлись клиническими испытаниями I фазы. В ранних исследованиях в качестве антивирусных агентов использовали трансдоминантный белок *RevM10* или рибозим, которые вводили в клетки при помощи γ -ретровирусного вектора [13]. Пациенты хорошо переносили трансплантацию, серьезных побочных эффектов не наблюдалось. Во всех исследованиях после инфузии в крови пациентов наблюдалось селективное выживание клеток, экспрессирующих терапевтические гены. Однако процент модифицированных клеток оказался очень низким, и терапевтического эффекта достигнуто не было.

Увеличение эффективности отдельных препаратов было продемонстрировано в последующих исследованиях. Десять пациентов на поздней стадии развития СПИДа участвовали в клиническом испытании препа-

рата, включающего ингибитор слияния С46 в составе γ -ретровирусного вектора. Изолированные CD4+ Т-клетки были модифицированы вектором и введены обратно пациентам. Маркеры трансгена обнаруживали в клетках периферической крови на протяжении одного года [59]. Вирусная нагрузка не изменилась, однако наблюдалось увеличение числа и функциональной активности CD4+ Т-лимфоцитов. С учетом несостоятельности ВААРТ и низкого числа CD4+-клеток до лечения (<200 кл/мкл) результаты испытания представляются достаточно оптимистичными: через год число CD4+-клеток было выше или находилось на первоначальном уровне, у 4 из 7 пациентов после смены антиретровирусных препаратов вирусную нагрузку удалось снизить до неопределяемой. По прошествии двух лет все пациенты оставались живы [59].

В 2009 г. были опубликованы результаты первого клинического испытания II фазы препарата для анти-ВИЧ-терапии [60]. В рандомизированном двойном слепом плацебоконтролируемом многоцентровом исследовании участвовало 74 человека (38 пациентов в исследуемой и 36 — в контрольной группах). γ -Ретровирусный вектор был использован для переноса в ГСК гена, кодирующего рибозим OZ1, расщепляющий геномную РНК ВИЧ в области, кодирующей белки tat/vpr. Клетки CD34+, мобилизованные из костного мозга, собирали из периферической крови, модифицировали *in vitro* и вводили обратно в кровь пациентам без предварительного применения химиотерапевтических препаратов, направленных на частичное удаление эндогенных клеток костного мозга (циторедуктивного кондиционирования). Протокол испытания включал два перерыва в приеме антиретровирусных препаратов, целью которых было обеспечить селективный отбор защищенных трансгеном клеток. После трансплантации пациентов наблюдали в течение 46 мес, измеряя вирусную нагрузку, оценивая присутствие в периферической крови модифицированных клеток, содержащих ДНК и РНК рибозима, абсолютное число CD4+-лимфоцитов в крови, а также функцию тимуса. Серьезных побочных эффектов зафиксировано не было. Через 4 нед после инфузии ДНК и РНК рибозима можно было обнаружить в клетках крови у 94% пациентов, а через 100 дней — только у 7% пациентов. Несмотря на то, что уровни ДНК и РНК-трансгена оказались ниже уровня, достаточного для количественного определения, через 100 дней у пациентов исследуемой группы отмечалось статистически значимое снижение титра вирусных частиц. Абсолютное число клеток CD4+ у больных из OZ1 группы в среднем было выше, чем в контрольной группе, но разница оказалась статистически недостоверной. Средняя продолжительность времени после аналитического прерывания ВААРТ до появления вируса в крови, требующего возобновления терапии, в OZ1 группе составила более 60 нед, тогда как в контрольной группе — 29,4 нед. Была установлена обратная корреляция между вирусной нагрузкой и уровнем экспрессии рибозима, а также количеством пересаженных клеток [60].

С 2003 г. в клинических испытаниях для доставки трансгенов начали использовать лентивирусные векторы, которые способны обеспечить стабильную экспрессию генов. Впервые лентивирусный вектор был применен для переноса в CD4+ Т-лимфоциты антисмысловой РНК против гена *ENV* ВИЧ (вектор VRX496) [5]. В клиническом испытании II фазы препарата VRX496 компании VIRxSYS участвовали 17 ВИЧ-инфицированных пациентов, находившихся на ВААРТ. Каждый больной получал от 3 до 6 вливаний модифицированных клеток, через 6 нед

после последней процедуры проводили запланированный перерыв в приеме антиретровирусных препаратов. Для оценки результатов исследования учитывали время после отмены ВААРТ, через которое вирус вновь обнаруживался в крови, а также уровень установившейся вирусной нагрузки. Прерывание ВААРТ оказалось возможным у 13 из 17 пациентов, а получить конечные показатели эффективности удалось у 8 из них. У 7 из 8 больных наблюдали уменьшение вирусной нагрузки на 0,2–0,98 логарифма по сравнению с результатами анализов до назначения ВААРТ, число CD4+-клеток оставалось стабильным. У одного из пациентов на протяжении 104 дней уровень вирусной нагрузки находился ниже предела детекции (50 копий/мл), а число CD4+ Т-лимфоцитов составляло более 1200 клеток/мкл, при начальном 772 кл/мкл на фоне ВААРТ [61].

Весьма обнадеживающими являются результаты испытания генно-терапевтического препарата, который кодирует нуклеазу, специфически расщепляющую ген рецептора CCR5 [62]. В испытаниях I фазы приняли участие 6 пациентов, находящихся на антиретровирусной терапии, у которых число CD4+ Т-лимфоцитов составляло от 200 до 500 кл/мкл. Т-клетки были собраны из периферической крови и трансдуцированы аденовирусным вектором, в состав которого входил ген нуклеазы, затем введены обратно в кровоток. В данном случае действие фермента должно быть одноразовым, поэтому использовался вектор, не встраивающий ген в хромосому. У 5 из 6 пациентов наблюдалось увеличение числа CD4+ на 14-й день после инфузии, после чего на протяжении 1 года оставалось выше, чем до инфузии на 86–911 кл/мкл. У 3 из 5 пациентов произошла нормализация соотношения числа CD4+/CD8+-клеток. Т-лимфоциты с разрушенным CCR5-геном были обнаружены в слизистой оболочке кишечника, что свидетельствует о нормальной способности модифицированных клеток мигрировать в периферические лимфоидные органы [62]. На основании полученных результатов инициировано клиническое исследование II фазы.

Описанные выше клинические испытания свидетельствуют о безопасности применяемых подходов и о постепенном увеличении эффективности тестируемых препаратов и процедур введения клеток. Основной проблемой остается низкое процентное содержание модифицированных клеток, достигаемое после трансплантации. При использовании Т-лимфоцитов важным условием преодоления этой проблемы является сохранение репликативного срока жизни возвращаемых пациенту клеток. По результатам проведенных недавно исследований можно говорить о том, что на функциональную активность и время жизни клеток, вводимых пациентам, драматически влияют фенотип вводимых лимфоцитов (наивные Т-лимфоциты — непримированные Т-клетки, клетки памяти, эффекторы) и выбор метода манипуляции *in vitro* [63–65]. Уже предложены оптимизированные способы получения клеточной массы, обогащенной клетками памяти [64, 65]. Также необходимо отметить, что у пациентов с поздними стадиями СПИДа Т-клеточная терапия может быть менее эффективна, поскольку ВИЧ-инфекция вызывает нарушение функций лимфоцитов, а также уменьшение Т-клеточного репертуара [66]. Модификацию CD4+-клеток часто рассматривают как первый этап в клинических испытаниях трансгенов, поскольку метод позволяет быстро достигнуть терапевтического эффекта, а процедура является более безопасной и простой по сравнению с трансплантацией модифицированных ГСК.

Применение лентивирусных векторов решило проблему низкой эффективности трансдукции клеток CD34+ и нестабильной экспрессии трансгена. Однако, как уже упоминалось, получение большого количества ГСК пока затруднительно, а селективного давления недостаточно для того, чтобы процент этих клеток увеличивался после трансплантации, как, например, в случае тяжелого комбинированного иммунодефицита, сцепленного с X-хромосомой [67]. Значительно увеличить процент приживления и фракцию трансгенных клеток в циркулирующей крови позволяет циторедуктивное кондиционирование, используемое в онкогематологии, но высокая токсичность процедуры ограничивает ее применение только у пациентов со злокачественными заболеваниями крови. В то же время опыт лечения генетических заболеваний при помощи трансплантации ГСК показал, что уменьшенные дозы химиотерапевтических препаратов хорошо переносятся пациентами и заметно увеличивают процент приживляемости трансгенных ГСК [12, 68], открывая перспективу их использования и в генотерапии ВИЧ. Кроме того, ведется разработка принципиально новых, безопасных методов кондиционирования, основанных на применении антител, специфичных к ГСК [69].

Заключение

На сегодняшний день создано множество генетических конструкций, внутриклеточная экспрессия которых подавляет размножение ВИЧ или защищает чувствительные клетки от заражения вирусом. При исследовании *in vitro* и на животных моделях отдельные генетические конструкции продемонстрировали высокую антивирусную активность, а также позволили предотвратить развитие резистентности вируса. Некоторые из них были протестированы в клинических испытаниях, где была показана безопасность генно-терапевтических препаратов и процедур введения генов, однако достичь желаемой эффективности пока не удалось. В связи с этим продолжается работа по дальнейшему совершенствованию терапевтических генов и их комбинированию, проводится оптимизация технологий работы с клетками и клинических протоколов трансплантации. На стыке этих направлений в ближайшем будущем можно ожидать разработки эффективного генно-терапевтического лекарственного препарата, позволяющего не только проводить поддерживающую терапию, но и излечивать пациентов с ВИЧ-инфекцией.

REFERENCES

- Baltimore D. Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature*. 1988; 335(6189):395–396.
- Engels B, Uckert W. Redirecting T lymphocyte specificity by T cell receptor gene transfer- a new era for immunotherapy. *Mol. Aspects Med*. 2007; 28(1):115–142.
- Puls R.L., Emery S. Therapeutic vaccination against HIV: current progress and future possibilities. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(1): 59–71.
- June C.H., Blazar B.R., Riley J.L. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations. *Nat. Rev. Immunol*. 2009; 9(10): 704–716
- Levine B.L., Humeau L.M., Boyer J. et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(46):17372–17377.
- van Lunzen J., Glaunsinger T., Stahmer I. et al. Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Mol. Ther*. 2007; 15(5):1024–1033.
- Macpherson J.L., Boyd M.P., Arndt A.J. et al. Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4+ T-lymphocytes in HIV-infected patients. *J. Gene Med*. 2005; 7(5): 552–564.
- Payne K.J., Crooks G.M. Immune-cell lineage commitment: translation from mice to humans. *Immunity*. 2007; 26(6): 674–677.
- Kambal A., Mitchell G., Cary W. et al. Generation of HIV-1 resistant and functional macrophages from hematopoietic stem cell-derived induced pluripotent stem cells. *Mol. Ther*. 2011; 19(3): 584–593.
- Park I.H., Zhao R., West J.A. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; 451(7175): 141–146.
- Rosenberg S.A., Aebersold P., Cornetta K. et al. Gene transfer into humans — immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med*. 1990; 323(9): 570–578.
- Pluta K., Kacprzak M.M. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim. Pol*. 2009; 56(4): 531–595.
- Marathe J.G., Wooley D.P. Is gene therapy a good therapeutic approach for HIV-positive patients? *Genet. Vaccines Ther*. 2007; 5: 5.
- Michienzi A., Li S., Zaia J.A., Rossi J.J. A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(22): 14047–14052.
- Mhashilkar A.M., LaVecchio J., Eberhardt B. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type 1 Tat single-chain variable fragment intrabodies. *Hum. Gene Ther*. 1999; 10(9): 1453–1467.
- Lamothe B., Joshi S. Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies. *Front. Biosci*. 2000; 5: 527–555.
- Castanotto D., Li J.R., Michienzi A. et al. Intracellular ribozyme applications. *Biochem. Soc. Trans*. 2002; 30(Pt. 6): 1140–1145.
- Amado R.G., Mitsuyasu R.T., Rosenblatt J.D. et al. Anti-human immunodeficiency virus hematopoietic progenitor cell-delivered ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Hum. Gene Ther*. 2004; 15: 251–262.
- Lee N.S., Rossi J.J. Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res*. 2004; 102(1): 53–58.
- ter Brake O., 't Hooft K., Liu Y.P. et al. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition. *Mol. Ther*. 2008; 16(3): 557–564.
- Aagaard L.A., Zhang J., von Eije K.J. et al. Engineering and optimization of the miR-106b cluster for ectopic expression of multiplexed anti-HIV RNAs. *Gene Ther*. 2008; 15(23): 1536–1549.
- Lapidot T., Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immunodeficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*. 2002; 16: 1992–2003.
- O'Brien S.J., Moore J.P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol. Rev*. 2000; 177: 99–111.
- Biti R., French R., Young J. et al. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nature Medicine*. 1997; 3: 252–253.
- Allers K., Hutter G., Hofmann J. et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood*. 2011; 117(10): 2791–2799.

26. Swan C.H., Torbett B.E. Can gene delivery close the door to HIV-1 entry after escape? *J. Med. Primatol.* 2006; 35: 236–247.
27. Feng Y., Leavitt M., Tritz R. et al. Inhibition of CCR5-dependent HIV-1 infection by hairpin ribozyme gene therapy against CC-chemokine receptor 5. *Virology.* 2000; 276(2): 271–278.
28. Cagnon L., Rossi J.J. Downregulation of the CCR5 beta-chemokine receptor and inhibition of HIV-1 infection by stable VA1-ribozyme chimeric transcripts. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000; 10(4): 251–261.
29. Swan C.H., Buhler B., Steinberger P. et al. T-cell protection and enrichment through lentiviral CCR5 intrabody gene delivery. *Gene Ther.* 2006; 13(20): 1480–1492.
30. Anderson J.S., Javien J., Nolta J.A., Bauer G. Preintegration HIV-1 inhibition by a combination lentiviral vector containing a chimeric TRIM5 alpha protein, a CCR5 shRNA, and a TAR decoy. *Mol. Ther.* 2009; 17(12): 2103–2114.
31. Buttica C., Ciuffi A., Munoz M. et al. Protection from HIV-1 infection of primary CD4 T cells by CCR5 silencing is effective for the full spectrum of CCR5 expression. *Antivir. Ther.* 2003; 8(5): 373–377.
32. Kim S.S., Peer D., Kumar P. et al. RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. *Mol. Ther.* 2010; 18(2): 370–376.
33. Shimizu S., Hong P., Arumugam B. et al. A highly efficient short hairpin RNA potently down-regulates CCR5 expression in systemic lymphoid organs in the hu-BLT mouse model. *Blood.* 2010; 115(8): 1534–1544.
34. Grimm D., Wang L., Lee J.S. et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J. Clin. Invest.* 2010; 120(9): 3106–3119.
35. Jackson A.L., Linsley P.S. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* 2004; 20(11): 521–524.
36. Silva J.M., Li M.Z., Chang K. et al. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat. Genet.* 2005; 37(11): 1281–1288.
37. Boden D., Pusch O., Silbermann R. et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(3): 1154–1158.
38. Liu Y.P., Haasnoot J., ter Brake O. et al. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(9): 2811–2824.
39. Perez E.E., Wang J., Miller J.C. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26(7): 808–816.
40. Holt N., Wang J., Kim K. et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28(8): 839–847.
41. Lalezari J.P., DeJesus E., Northfelt D.W. et al. A controlled phase II trial assessing three doses of enfuvirtide (T-20) in combination with abacavir, amprenavir, ritonavir and efavirenz in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-naïve HIV-infected adults. *Antivir. Ther.* 2003; 8: 279–287.
42. Egelhofer M., Brandenburg G., Martinius H. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* 2004; 78: 568–575.
43. Strebel K., Luban J., Jeang K.T. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med.* 2009; 7: 48.
44. Li Y., Li X., Stremelau M. et al. Removal of arginine 332 allows human TRIM56 to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection. *J. Virol.* 2006; 80: 6738–6744.
45. Anderson J., Akkina R. Human immunodeficiency virus type 1 restriction by human-rhesus chimeric tripartite motif 5alpha (TRIM 5alpha) in CD34(+) cell-derived macrophages in vitro and in T cells in vivo in severe combined immunodeficient (SCID-hu) mice transplanted with human fetal tissue. *Hum. Gene Ther.* 2008; 19(3): 217–228.
46. Sayah D.M., Sokolskaja E., Berthoux L., Luban J. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature.* 2004; 430(6999): 569–573.
47. Neagu M.R., Ziegler P., Pertel T. et al. Potent inhibition of HIV-1 by TRIM5-cyclophilin fusion proteins engineered from human components. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(10): 3035–3047.
48. Bogerd H.P., Doehle B.P., Wiegand H.L., Cullen B.R. A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(11): 3770–3774.
49. Xu H., Svarovskaia E.S., Barr R. et al. A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(15): 5652–5657.
50. Gupta R.K., Hue S., Schaller T. et al. Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5).
51. Burdick R., Smith J.L., Chaipan C. et al. P body-associated protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages. *J. Virol.* 2010; 84(19): 10241–102453.
52. Lee K., Ambrose Z., Martin T.D. et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(3): 221–233.
53. DiGiusto D.L., Krishnan A., Li L. et al. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 2010; 2(36).
54. Kiem H.P., Wu R.A., Sun G. et al. Foamy combinatorial anti-HIV vectors with MGMTP140K potently inhibit HIV-1 and SHIV replication and mediate selection in vivo. *Gene Ther.* 2010; 17(1): 37–49.
55. Woffendin C., Ranga U., Yang Z. et al. Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93(7): 2889–2894.
56. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
57. van Lunzen J., Glaunsinger T., Stahmer I. et al. Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Mol. Ther.* 2007; 15: 1024–1033.
58. Mitsuyasu R.T., Merigan T.C., Carr A. et al. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nat. Med.* 2009; 15(3): 285–292.
59. Tebas P., Stein D., Zifchak et al. Prolonged Control of Viremia After Transfer of Autologous CD4 T Cells Genetically Modified with a Lentiviral Vector Expressing Long Antisense to HIV env (VRX496). Abstract. — 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection, February 2010.
60. Lalezari J. et al. Successful and persistent engraftment of ZFN-M-R5-D autologous CD4 T Cells (SB-728-T) in aviremic HIV-infected subjects on HAART. — CROI 2011. — Abstract 46.
61. Hinrichs C.S., Borman Z.A., Gattinoni L. et al. Human effector CD8+ T cells derived from naïve rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood.* 2011; 117(3): 808–814.
62. Kaneko S., Mastaglio S., Bondanza A. et al. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T-lymphocytes. *Blood* 2009; 113(5): 1006–1015.
63. Berry L.J., Moeller M., Darcy P.K. Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells. *Tissue Antigens.* 2009; 74(4): 277–289.
64. van Baarle D., Tsegaye A., Miedema F., Akbar A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol Lett.* 2005; 97(1): 19–29.
65. Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000; 288(5466): 669–672.

66. Aiuti A., Slavin S., Aker M. et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002; 296: 2410–2413.
67. Czechowicz A., Kraft D., Weissman I.L., Bhattacharya D. Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science*. 2007; 318(5854): 1296–1299.
68. Glazkova D., Vetchinova A., Zhogina Y. et al. Stable reduction of CCR5 by lentiviral vector-expressed artificial microRNAs. — ESGCT and BSGT collaborative Congress. — Brighton UK, 2011.
69. Glazkova D.V., Vetchinova A.S., Bogoslovskaia E.V. i dr. Geneticheskie konstrukcii dlia antiVICH-terapii. Patent na izobretenie RF № 2426788, 01 marta 2010 g.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Глазкова Дина Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А

E-mail: glazkova@pcr.ru

Тел./ факс: (495) 305-54-23

Богословская Елена Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

E-mail: lenabo@pcr.ru

Тел./ факс: (495) 305-54-23

Маркелов Михаил Леонидович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории постгеномных технологий Института медицины труда РАМН

Адрес: 105275, Москва, проспект Буденного, 31

E-mail: markelov@pcr.ru

Тел./ факс: (495) 305-54-23

Шипулин Герман Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А

E-mail: german@pcr.ru

Тел./ факс: (495) 305-54-23

Покровский Вадим Валентинович, академик РАМН, заместитель директора ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора по научной работе

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А

E-mail: info@pcr.ru

Тел.: (495) 974-96-46, **факс:** (495) 305-54-23