

ПЕРЕНОС ГЕНОВ В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПОМОЩЬЮ РЕТРОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Н. В. Томялин, В. М. Кавсан

Идея лечения наследственных и ненаследственных заболеваний человека, обусловленных недостаточным количеством в организме определенных белков, с помощью введения нормальных генов в соматические клетки (генотерапия) достаточно очевидна, однако большие технические трудности, связанные с ее осуществлением, многие годы тормозили прогресс в этой области.

Существенный шаг вперед был сделан в 1977 году, когда была принципиально доказана возможность переноса генов в соматические клетки млекопитающих [1], что стимулировало работы по разработке новых, более эффективных методов введения генов, в частности с помощью вирусов.

В идеале генотерапия предполагает замещение дефектного гена в его естественном окружении в хромосоме нормальным геном во всех тех клетках, где проявляется дефект, приводящий к патологии. Хотя такие операции принципиально осуществимы на клетках млекопитающих, культивируемых *in vitro* [2], их эффективность пока весьма мала (около 10^{-8}), тогда как для генотерапии желательна сайт-специфическая интеграция вводимого гена в большей части определенной клеточной популяции, т. е. генетическая трансформация с эффективностью до единицы. Близкая к этой величине эффективность трансформации была достигнута в настоящее время при переносе генов в клетки костного мозга только с помощью ретровирусных векторов [3, 4], однако интеграция, по-видимому, происходила во многие различные сайты в хромосомах клеток различных трансформантных клонов, и пока неясно, каким образом можно повысить специфичность интеграции ретровирусов. Клон соматических клеток с нужным сайтом интеграции может быть отобран манипуляциями *in vitro* и затем трансплантирован в организм, в котором дефектные клоны были уничтожены облучением или химиотерапией, однако процедура отбора клона с нужным сайтом интеграции потребует длительного культивирования *in vitro*, что, с одной стороны, может привести к истощению клоногенного потенциала, а с другой — к злокачественной трансформации клеток. Это препятствие было бы преодолено, если бы удалось вызывать иммортализацию клеток без проявления других признаков злокачественной трансформации [5].

Специфичность интеграции не является, однако, абсолютным требованием для генотерапии, поскольку при многих заболеваниях терапевтический эффект может быть достигнут просто появлением в организме (в кровотоке) достаточной концентрации нужного белка. Он может синтезироваться и нормально созревать, даже если соответствующий ген интегрирован в необычный для него хромосомный локус или при введении гена не в тот тип клеток, где белок обычно синтезируется. Важно лишь, чтобы была достаточная концентрация этого белка (замещающего дефектный) в ткани-мишени.

При введении генов в клетки млекопитающих с помощью ретровирусных векторов за счет различной специфичности интеграции в разных клонах наблюдается значительная гетерогенность экспрессии вводимого гена в клонах-потомках трансформированных стволовых клеток [6], что может существенно понижать реальную эффективность трансформации ретровирусами, поскольку стабильные субклоны образуются лишь с небольшой частотой. Это препятствие может быть отчасти преодолено за счет правильного конструирования вектора [6], а также, вероятно, за счет предварительной селекции стабильных субклонов-продуцентов вне организма.

Жизненный цикл ретровирусов и использование его особенностей для переноса генов. Детали жизненного цикла ретровирусов и их структуры описаны в книге Р. Б. Хесина [7], где можно найти ссылки на оригинальные работы, однако некоторые ключевые моменты уместно рассмотреть в этом обзоре. Ретровирус представляет собой частицу, окруженную фосфолипидной мембраной, в которую встроены белки. Внутри частицы упакована РНК, кодирующая несколько белков, группоспецифический антиген и обратная транскриптаза (ревертаза). Содержимое частицы попадает в клетку, когда поверхностный белок, взаимодействуя со специфическим рецепторным белком клеток, вызывает прилипание вируса к клетке. После проникновения вируса в клетку ревертаза с вирусной РНК синтезирует обратный транскрипт, который кольцуется и встраивается в клеточную ДНК с помощью интегразы (также кодируемой вирусной РНК). Высокая эффективность трансформации клеток ретровирусами обусловлена эффективным рецепторным механизмом их проникновения в клетку, а также эффективным ферментным механизмом интеграции. Рассмотрим регуляцию синтеза вирусных белков на примере вируса лейкемии Молони.

С интегрированной ДНК-копии ретровируса (провируса) начинается синтез вирусной РНК, для чего требуется промотор и усилитель транскрипции, расположенный в длинном 5'-концевом повторе (long terminal repeat, LTR), а также терминатор транскрипции, расположенный в правом конце провируса — 3'-LTR. Важной составной частью 5'- и 3'-LTR является так называемая область U3, содержащая специфический для каждого ретровируса и типа клеток усилитель транскрипции. РНК, синтезированная с провируса, может подвергаться сплайсингу, что приводит к синтезу белка оболочки, кодирующая последовательность которого расположена ближе к 3'-LTR (*env*), либо транскрибироваться без сплайсинга, что приводит к образованию группоспецифического антигена (*gag*-белка) и ревертазы с интегразой. Для вырезания (сплайсинга) части транскрипта, соответствующей *gag*- и *pol*-генам, в геноме ретровирусов имеются две сигнальные последовательности, одна из которых расположена ближе к 5'-LTR (5'-сайт для сплайсинга — 5'-ss), другая — перед геном *env* (3'-ss). Эффективность сплайсинга определяется не только 5'- и 3'-ss-сигналами, но и какими-то другими сигналами, не вполне ясными, что может существенно влиять на эффективность экспрессии чужеродных генов, вставленных вместо *gag-pol* или вместо *env*-генов. Несплайсированная вирусная РНК может упаковываться внутри клетки, давая начало предшественникам вирусных частиц, которые формируются при экструзии предшественников через клеточную мембрану во внеклеточное пространство. Для упаковки РНК необходима специфическая короткая последовательность, расположенная рядом с 5'-LTR, так называемый Ψ-сайт. Благодаря особому механизму репликации и интеграции в потомстве ретровируса область U3 5'-LTR восстанавливается за счет U3 3'-LTR вируса предшествующего поколения, и это обстоятельство иногда используется для инактивации вирусного промотора [8].

Эффективность экспрессии генов провируса существенно зависит от структуры 5'-LTR, точнее говоря, от области U3, содержащей усилитель транскрипции, и сильно варьирует в разных типах клеток. Во многих ретровирусных векторах поэтому введен другой, менее специфичный промотор, который слабее подвержен регуляторным влияниям со стороны клетки. Клетки, содержащие интегрированные недефектные провирусы, становятся продуцентами ретровирусов, способных далее инфицировать другие клеточные популяции.

В принципе возможны два подхода к переносу генов ретровирусами. С помощью манипуляций на клонированной ДНК ген можно вводить в нормальный (недефектный) ретровирус, вставляя его в участки генома (между 5'- и 3'-LTR), несущественные для полного жизненного цикла ретровируса. В этом подходе, поскольку трансформированные клетки будут далее продуцировать вирус, имеется опасность не-

контролируемого распространения гена в организме, в том числе его интеграция в клетки зародышевого пути, а следовательно, неконтролируемого распространения гена в популяции. Ясно, что для целей генотерапии недефектные ретровирусы, трансдуцирующие чужеродные гены, вряд ли смогут найти широкое применение.

Принципиально важной поэтому была разработка [9] второго альтернативного подхода к ретровирусному переносу генов, когда ген вводится в дефектный вирус, способный к интеграции в инфицированных клетках, но не способный к дальнейшей репликации и распространению. С помощью ко-трансформации, используя селективный ген гуанинфосфорибозилтрансферазы (*gpt*) и обычный кальций-фосфатный метод трансформации, в фибробласты мышей линии *NIH 3T3* вводили клонированный геном вируса лейкоза Молони с мутацией в сигнальной последовательности (Ψ), необходимой для упаковки ретровирусной РНК. Один из *gpt*⁺ трансформантных клонов, отобранный на среде с микофенольной кислотой, не продуцировал инфекционного ретровируса, но выделял в среду много обратной транскриптазы в составе свободных от РНК вирусных частиц. Последующая трансфекция клеток этого клона (Ψ 2) плазмидой, содержащей 5'- и 3'-LTR, Ψ -сайт и селектируемый ген *gpt*, приводила через 20 ч к продукции этими клетками довольно высокого титра инфекционного ретровируса, трансдуцирующего ген *gpt*, что проверялось путем генетической трансформации клеток *NIH 3T3* [9]. Таким образом, был получен клон культивируемых клеток, способный к упаковке в вирусные частицы транскриптов с чужеродного гена и не продуцирующий вирус, способных к дальнейшей репликации и распространению. В этой системе все необходимые для упаковки ретровируса белки синтезировались с РНК дефектного по Ψ -сайту интегрированного вируса, а в вирусные частицы упаковывались только транскрипты с экзогенной плазмиды, содержащей клонированный геном другого дефектного ретровируса с Ψ -сайтом [9]. В дальнейшем система была усовершенствована теми же авторами [10] за счет введения в плазмиду с Ψ -сайтом и 5'- и 3'-LTR другого селективного гена (*neo*), кодирующего неомидилфосфотрансферазу и обеспечивающего устойчивость клеток к антибиотику G418 [10]. Такие плазмиды и получили название векторных плазмид для ретровирусного переноса генов. Это позволило получать трансформантные субклоны Ψ 2, стабильно продуцирующие высокий титр (10^5 — 10^6 частиц в 1 мл) рекомбинантного ретровируса, трансдуцирующего ген *neo*.

Клон Ψ 2 был использован во многих работах по ретровирусному переносу генов в клетки мышей [11—13]. После трансфекции в него различных плазмидных конструкций с *neo*-геном и селекции продуцентов рекомбинантного ретровируса были обнаружены значительные вариации титра ретровируса в разных субклонах [6, 10], а выход высокопродуктивных клонов зависел от структуры плазмидного вектора. Различия, в частности, были выявлены для векторных плазмид, содержащих (класс II) или не содержащих (класс I) внутренних промоторов для экспрессии селективного или неселективного гена и расположенных между 5'- и 3'-LTR [6].

Дефектный вирус Молони, интегрированный в клоне Ψ 2, является экотропным ретровирусом с узкой специфичностью и способностью инфицировать только клетки мышей. Для получения ретровирусов, способных переносить гены в клетки других видов млекопитающих и человека, сделаны упаковывающие клоны (Ψ AM, PA12), содержащие дефектный амфотропный ретровирус с широкой специфичностью [14, 15].

Основные плазмидные конструкции для ретровирусного переноса генов. Рассмотрим два класса векторных плазмид, используемых для введения генов в упаковывающие клетки и получения субклонов — продуцентов ретровирусов. Как уже отмечалось, векторы первого класса содержат единственный промотор, расположенный в 5'-LTR, под контролем которого транскрибируются все гены, расположенные между 5'- и 3'-LTR, и внутренних промоторов не имеется либо они несущественны

для экспрессии. Наиболее известный вектор первого класса — *pZip(neo)SV(X)I* [10] содержит нормальные 5'- и 3'-LTR вируса лейкоза Молоди, *neo*-ген без промотора в ориентации 5'—3' и уникальный сайт для рестриктазы *BamHI*, расположенный между 5'- и 3'-ss, в который можно встраивать интронированные или кДНК гены. Показано, что в этом векторе интроны эффективно вырезаются из генов, клонированных в *BamHI*-сайте, и транскрипты, упакованные в рекомбинантный ретровирус, их не содержат, что может служить эффективным методом получения безынтронных генов [10]. Продукт *neo*-гена синтезируется со сплайсированной РНК, так как он расположен между 3'-ss и 3'-LTR в зоне, соответствующей *env*-гену. При помещении в *BamHI*-сайт некоторых генов экспрессия *neo*-гена может нарушаться, вероятно, из-за нарушения сплайсинга (пока неясно, какие свойства вставляемого гена приводят к таким последствиям), и тогда титр ретровируса, трансдуцирующего *neo*-ген, после временной трансфекции соответствующей плазмиды в клетки Ψ2 резко падает. Обычно же титр составляет 10^3 трансдуцируемых единиц (те) в 1 мл среды, но за счет введения в вектор точки начала репликации вируса полиомы титр может быть повышен до 10^5 те/мл. Стабильные Ψ2 трансформанты продуцируют 10^4 — 10^6 те/мл, однако получение хорошего продуцента является непростой задачей.

Для возможности «спасения» интегрированной плазмиды из Ψ2 продуцентов в вектор *SV(X)* между *neo*-геном и 3'-LTR введена точка начала репликации вируса *SV40* и *pBR322*: при слиянии с клетками *COS* плазида вырезается из хромосомы и может быть выделена после ее введения в клетки кишечной палочки. Это позволяет легко выделить и анализировать фланкирующие последовательности хромосомной ДНК и изучать специфичность интеграции.

Одновременно был создан другой вариант этого вектора *pZip(neo)SV(B)I*, в котором сплайсингу за счет вирусных сигналов подвергаются последовательности, считанные с неомицинового гена, а со сплайсированной РНК считываются кДНК-последовательности, вводимые в уникальный сайт для рестриктазы *XhoI*, расположенный между 3'-ss и 3'-LTR [10]. Иногда в векторы I класса добавляют какой-нибудь усилитель транскрипции, например генов тяжелых цепей иммуноглобулинов [6], который должен усиливать экспрессию в лимфоидных клетках. Правда, принципиального улучшения процедуры при этом не наблюдалось.

Векторы I класса были использованы для успешного переноса ряда генов: кДНК интерлейкина 2 в Т-лимфоидные клетки мышей [13], человеческого гена аденозиндезаминазы (АДА) (кДНК) в клетки костного мозга [16], онкогена *c-myc* в клетки мышей (кДНК) [17], однако стабильного продуцента рекомбинантного ретровируса после введения в клетки Ψ2 вектора со вставкой интронированного гена пока не получено.

Вариантным вектором I класса является вектор *N2*, не содержащий (в обычном варианте) внутренних промоторов, в котором *neo*-ген не содержит собственного иницирующего кодона и слит с начальной частью вирусного гена *gag* [18]. По непонятным причинам вектор *N2* после стабильной трансформации пакующих клеток Ψ2 или *PA12* дает весьма высокий титр вируса, трансдуцирующего неомициновый ген ($5 \cdot 10^5$ — 10^6 те/мл в 50 % клонов), что, вероятно, связано с присутствием в нем начальной части *gag*-гена. Вектор *N2* может быть превращен в вектор II класса путем введения в него транскрипционной единицы со своим промотором. В работе [19] в *N2* была введена кДНК АДА с промотором *SV40*, причем титр трансдуцирующего ретровируса после упаковки РНК в отобранных на G418 субклонах *PA12* был $(2-5) \times 10^6$ те/мл, и эти субклоны не продуцировали инфекционного (способного к репликации) вируса-помощника. С исходным вектором *N2* при упаковке в *PA12* иногда получают клоны, продуцирующие и вирус-помощник [20].

Главная проблема в работе с векторами I класса — ограничения в спектре клеток, в которых трансдуцируемый ген может экспрессироваться, зависящие от специфичности промотора, расположенного в вирусном 5'-LTR. Это обстоятельство было основной причиной, побудившей исследователей к разработке векторов II класса (содержащих внутренний промотор для селективного или неселективного гена или для того и другого). Основное их преимущество состоит в том, что внутренний промотор для интересующего нас гена может быть подобран так, чтобы этот ген работал или во всех клетках, или только в тех, где это нужно (за счет тканеспецифического усилителя). Например, в векторе II класса (*MMCV-neo*) экспрессия неомидинового гена под контролем промотора тимидинкиназного (*tk*) гена вируса герпеса наблюдалась во всех тканях трансгенных мышей, полученных после обработки ретровирусом эмбрионов [21].

Похожий вектор II класса с *tk*-промотором (*MoTN*) давал на клетках $\Psi 2$ весьма высокий титр вируса ($5 \cdot 10^6$ те/мл), что существенно повышало эффективность трансформации стволовых клеток костного мозга и уменьшало гетерогенность экспрессии неомидинового гена в потомстве стволовых клеток [6]. Причины существенного повышения титра трансдуцирующего вируса в указанных системах с внутренним *tk*-промотором не совсем ясны, так как транскрипты с этого промотора не должны перекрывать Ψ -сигнал для упаковки и, следовательно, не должны упаковываться в вирусные частицы. Возможно, что в этих системах имеет место какой-то цис-эффект, повышающий интенсивность транскрипции с промотора в 5'-LTR.

В опытах с другим вектором (*MLV NEO. I*), содержащим внутренний промотор вируса *SV40*, вставленный перед неомидиновым геном в обратной по отношению к 5'-LTR ориентации, титр трансдуцирующего ретровируса был на порядок ниже, чем с вектором *MoTN* [6]. Это может быть связано с интерференцией промоторов 5'-LTR и *SV40*, стимулирующих встречную транскрипцию или с ограниченной эффективностью промотора *SV40* в клетках костного мозга мышей. Тем не менее на векторе с внутренним промотором *SV40* удалось получить хорошую экспрессию гена АДА в культивируемых Т- и В-лимфоидных линиях человека [19].

Индукцибельный дексаметазоном внутренний промотор гена гормона роста крысы, подшитый к кДНК-последовательности того же гена, был вставлен в вектор [22], где селективный ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (ГФРТ) транскрибировался с 5'-LTR. С использованием в качестве вируса-помощника вируса лейкоза Молони при повторных пассажах достигнут титр трансдуцирующего ретровируса 10^6 те/мл, однако и титр вируса-помощника был весьма высоким. Главная проблема с векторами второго класса состоит в супрессии переселектируемого гена при селективном давлении в отношении второго гена [23]. Эта супрессия имеет эпигенетический характер, зависит от относительной силы промоторов в данном типе клеток и от их положения в векторе [23].

Другая серьезная проблема, общая для векторов обоих классов, состоит в том, что пакующие штаммы после введения в них некоторых векторов, начинают продуцировать не только дефектный рекомбинантный ретровирус, но и недефектный ретровирус, способный к репликации и распространению, что, вероятно, обусловлено рекомбинацией с интегрированным провирусом и восстановлением Ψ -сайта. Один из путей преодоления этой проблемы состоит в конструировании самоинактивирующихся векторов, не способных к распространению без вируса-помощника ни при каких обстоятельствах. Идея такого вектора основана на том, что область U3 3'-LTR передается и в 3'- и в 5'-LTR ретровирусов следующей генерации (см. выше). Если в ретровирус вводится дефектный 3'-LTR, то вирусы следующего поколения не будут способны ни к экспрессии, ни к распространению. На этой основе созданы векторы с нормальным 5'-LTR, нормальным внутренним промо-

тором и дефектным 3'-LTR [8]. С этими векторами можно получить продуцент рекомбинантного ретровируса, но за счет дефекта его 5'-LTR гены, которые он переносит, могут экспрессироваться только с внутреннего промотора, и транскрипты не могут паковаться вообще. Обратные транскрипты с этих транскриптов не могут за счет рекомбинации восстановить Ψ-сайт в каком-либо дефектном провирусе, находящемся в реципиентных клетках. Поэтому, если на пакующем штамме получена продукция только дефектного рекомбинантного вируса, последний при дальнейшей инфекции не может активировать какой-нибудь латентный дефектный провирус или активировать онкоген за счет своего промотора в 5'-LTR. Рекомбинационное восстановление нормальных 3'-LTR при введении векторной плазмиды в пакующие клетки, в принципе, возможно. Однако это очень редкое событие и легко можно отобрать клон, продуцирующий только дефектный ретровирус. Полученные к настоящему времени самоинактивирующиеся векторы, к сожалению, дают весьма небольшой титр рекомбинантного ретровируса (10^4 те/мл) и пока не могут быть использованы для переноса генов с целью компенсации дефекта какого-либо гена в организме. Эта трудность, по-видимому, будет преодолена.

Таким образом, суммируя, можно считать, что в настоящее время ретровирусы по ряду причин, изложенных ниже, представляют собой наиболее перспективные векторы для переноса генов в соматические клетки: 1) ретровирусы могут эффективно переносить гены в большое количество клеток в популяции; 2) стоки многих сотен миллилитров, содержащие 10^6 — 10^7 частиц в 1 мл, могут быть наработаны для получения огромного количества векторов для переноса; 3) клетки, инфицированные ретровирусами, повреждаются незначительно; 4) организация вирусного генома сохраняется при интеграции в хозяйскую ДНК, даже несмотря на то, что ретровирусы интегрируют в случайные сайты; 5) однажды интегрировав, ретровирусы становятся интегральной частью генома и ведут себя как клеточные гены; 6) чужеродная ДНК может быть упакована в ретровирусный вектор в больших вариациях по размерам (любая ДНК от около 1000 до 7000 н.н.); 7) репликативно дефектные ретровирусные векторы могут быть введены в клетки в отсутствие вируса-помощника; в этом случае они интегрируются и не двигаются с места. Таким образом, если клетки в культуре обработать ретровирусными векторами и затем вернуть обратно пациенту, очень невелика вероятность распространения вектора в другие ткани; 8) ретровирусы могут инфицировать широкий круг видов животных и типов тканей. Ретровирусные векторы могут также быть сконструированы для инфицирования клеток мышей, крыс, кошек, собак, обезьян, человека. Эти векторы можно изучать на животных моделях, а затем прямо использовать на людях; 9) можно сконструировать линии клеток, стабильно продуцирующих вектор с высоким титром, и хранить эти клетки замороженными, размораживая по мере надобности, т. е. такие линии могут быть созданы однажды и нет необходимости конструировать их каждый раз заново [24].

Перспективы использования в генной терапии человека. Костный мозг является идеальной мишенью для терапевтического переноса генов ввиду легкого получения и реимплантации обратно этой ткани, присутствия плюрипотентных самообновляющихся стволовых клеток в костном мозгу, а также наличия большого количества наследственных нарушений, поражающих клетки гемопоэтического происхождения [25].

Эксперименты на мышах показали, что ретровирусы могут быть использованы для экспрессии перенесенных генов в гемопоэтических тканях [11, 14, 18, 26—28] и что плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки действительно могут быть инфицированы этими вирусами [11, 18]. Однако появляется целый ряд пока нерешенных вопросов при попытке использования этой техники для человека. Инженерия гемопоэтических клеток мышей была продемонстрирована, главным образом, с использованием векторов, содержащих элементы мы-

шинных вирусов, способных заражать только грызунов. Амфотрофные векторы могут инфицировать клетки человека, но способность эффективно инфицировать гемопоэтические клетки человека для них пока не показана. Для решения подобных вопросов в качестве предклинической модели генной терапии человека предлагается введение генетической информации в гемопоэтические прогениторные клетки большому аутобредному животному, например собаке. Таким образом был осуществлен перенос и получена экспрессия *neo* и дигидрофолатредуктазных генов [29]. Поскольку собака является традиционной предклинической моделью трансплантации костного мозга у человека [30], в дальнейшем предполагается аутологичная имплантация таким образом инфицированного костного мозга.

Тем не менее многие вопросы не могут быть решены на модельных животных и только при использовании этой техники для человека можно будет коррелировать те или иные ее недостатки. Несколько исследовательских групп США близки к составлению протоколов клинических испытаний. Это — группа Т. Фридмана в Калифорн. ун-те (Сан-Диего); лаборатория В. Ф. Андерсона в Нац. ин-те сердца, легких и крови; лаборатория Р. Муллигана в Ин-те биомед. исследований (Кэмбридж); группа Д. Мартина в Генентеке (Сан-Франциско); а также группы А. Д. Миллер в Центре исследований рака (Сиэтл); И Верма в Ин-те Солка (Сан-Диего); С. Т. Каски в Бэймервекском мед. колледже (Хаустон) [31]. Работают над этим вопросом в Канаде (Госпиталь Маунт Синай и Госпиталь детских заболеваний в Торонто) [32].

Выбор наследственного заболевания, для лечения которого предполагается в первую очередь применить генную терапию, определяется несколькими факторами: во-первых, необходимо знать в достаточной степени молекулярные механизмы развития данной болезни; во-вторых, уметь определять генетические дефекты, приводящие к этому заболеванию в каждом конкретном случае; в-третьих, пока не созданы тканеспецифические векторы, нужно уметь культивировать клетки, в которые собираемся вводить нужный ген; в-четвертых, патогенез заболевания должен быть таким, чтобы была возможность вернуть организм в нормальное состояние; в-пятых, заболевание должно быть настолько серьезным, чтобы оправдать неизбежный в той или иной степени риск, связанный с обычным несовершенством новой методологии лечения. Для начальных исследований не обязательно, чтобы это было широко распространенное заболевание. Затраты, которые пойдут на исследования, в любом случае полностью будут компенсированы полученными результатами.

Легче, конечно, начать лечение рецессивного заболевания, в основе которого лежит, например, дефект какого-нибудь фермента, т. е. когда дефектный ген не продуцирует функциональный фермент. Введение нормальной аллели дефектного гена, позволяющее хотя бы биохимически ввести какую-то корреляцию в лечение доминантных болезней, в результате присутствия ненормального гена, доминирующего над нормальным, для генной терапии значительно более трудная задача. Здесь должна быть прервана экспрессия ненормального гена, что подразумевает развитие технологии сайт-специфической интеграции. И хотя в последнее время достигнут некоторый прогресс в понимании, каким образом интегрировать генетический материал в специфические хромосомные сайты в клетках млекопитающих, пока нет надежных методов прекращения экспрессии дефектного гена.

Исходя из приведенных критериев, сейчас имеется несколько кандидатов на генную терапию. Это моногенные наследственные заболевания, в первую очередь, синдром комбинированного иммунного дефицита (СКИД), обусловленный мутацией в одном рецессивном гене АДА. В норме этот ген в Т-клетках всегда во «включенном» состоянии. Если Т-клетки не синтезируют АДА, они погибают вскоре после образования, а без Т-клеток и В-клетки иммунной системы не могут работать соответствующим образом. СКИД поражает всего от 40 до 50 че-

человек в год во всем мире, но отличается крайне тяжелым протеканием. Иммуная система у больных СКИД практически не функционирует, и потому активация продукции АДА даже в небольшом числе плюрипотентных стволовых клеток гематопоеза смогла бы обеспечить хотя бы какую-то резистентность пациента к заболеваниям. Больных с этим синдромом сейчас поддерживают трансплантацией костного мозга от компетентного донора. Однако далеко не всегда такой донор имеется в нужную минуту, а пересадка костного мозга от некомпетентного донора часто приводит к смертельному исходу [24].

Недостаточность пуриинуклеозидфосфорилазы (ПНФ), так же как и предыдущее заболевание, относится к аутосомным рецессивным болезням, т. е. поврежденные гены находятся на аутосомах. У нормальных людей эти ферменты имеются во всех тканях. Недостаточность ПНФ, проявляющаяся в виде иммунного дефицита, обнаруживается в год примерно у девяти пациентов из всего населения земного шара.

Эти болезни легко распознаются по своему уникальному фенотипу материю и, поскольку имеются легкие тесты на соответствующие ферменты, они всесторонне изучались длительное время, соответствующие гены выделены и исследованы.

Синдром Леш-Найхэна имеет место каждый год примерно у 200 новорожденных мужского пола. Он возникает в результате мутации единственного рецессивного гена, находящегося на X-хромосоме. Этот ген все время «включен» в норме и кодирует фермент ГФРТ. Это заболевание, кроме целого ряда других тяжелых симптомов, вызывает у пациентов мучительное стремление к самоувечью (больные обкусывают пальцы, губы, вплоть до кровотечений). И хотя артрит снимается пересадкой костного мозга или переливанием крови, продуцирующей ГФРТ, тем не менее неврологические нарушения не исправляются. Однако облегчение течения заболевания все же может быть получено и, кроме того, если ГФРТ даже в небольшом количестве будет проникать через гематоэнцефальный барьер, это может сказаться и на снятии более жестких симптомов. Более того, ген ГФРТ представляет собой прекрасный маркер, с помощью которого можно отбирать соответствующие клетки костного мозга. Таким образом, наличие этого гена в клетках дает удобную модель для изучения судьбы введенного гена, реверсий, селекции для эпигенетического контроля и т. д. [24].

Моногенные заболевания в результате недостаточности продукции аргининосукцинатсинтетазы (53 случая) и орнитинкарбамоилтрансферазы (110 случаев) также являются объектами, на которые сейчас направлены усилия генных терапевтов [31].

Лечение всех этих болезней включает взятие костного мозга у пациентов, «инфицирование» их ретровирусной конструкцией с инсерцированным в нее соответствующим геном и затем возвращение клеток костного мозга обратно тому же больному. Конечно, такое манипулирование с клетками-реципиентами *in vitro* значительно легче, безопасней и, кроме того, позволяет механически сузить круг клеток-мишеней. Пока клетки костного мозга и клетки кожи — единственные клетки человека, которые удастся культивировать вне организма в течение относительно длительного промежутка времени.

Основные приемы получения вектора, переносящего соответствующий ген в эритроидные клетки с большим титром, высокой эффективностью заражения клеток-мишеней, безопасного для больного и окружающих, рассматривались в предыдущих разделах. Стабильная интеграция нового гена в ретровирусном векторе в клеточный геном может быть большой проблемой. Однако, хотя показано, что в некоторых случаях интегрированные проретровирусы могут исчезать из генома клетки [33—35], фактов, указывающих на подвижность инсерцированных ретровирусных последовательностей, описано довольно немного. Таким образом, провирус, однажды инсерцированный в геном клетки, обычно остается там навсегда.

Целый ряд других дефектных генов являются кандидатами на исправление генноинженерным способом, однако их очередь, по-видимому, несколько позже. Сюда относятся гены, связанные с возникновением мышечной дистрофии Дюшенпа [36], ретинобластомы [37], ведется интенсивный поиск гена, нарушения в котором вызывают фиброз мочевого пузыря [38] и др. Однако предварительно нужно ответить на многие пока нерешенные вопросы. Например, если ген нормально экспрессируется в данном типе клеток, то что произойдет при введении его в составе ретровирусного вектора в сто различных мест ста стволовых клеток? Будут ли, к примеру, Т-лимфоциты экспрессировать β -глобин или он все-таки будет экспрессироваться только в эритроидных клетках? Генная терапия заболеваний с поражением генов глобинов, хотя вначале считавшаяся делом сегодняшнего дня, оказалась значительно сложнее в связи с обнаружением целых ансамблей последовательностей, регулирующих координированную их экспрессию. Поэтому генному терапевту необходимо иметь всю систему, прежде чем приступить к лечению гемоглобинопатий.

На очереди объектами генной терапии стоят заболевания печени и поджелудочной железы. Затем, возможно, наступит черед фенилкетонурии, семейной гиперхолестеринемии. Конструирование тканеспецифических векторов позволит инъекции нужных генов прямо пациентам, а не в реимплантирующиеся культивируемые *in vitro* клетки. Таким образом, откроется возможность для генной терапии в амбулаторных условиях [31].

По целому ряду соображений значительно менее понятна перспектива вмешательства в зародышевые клетки человека. Замещение дефектных генов при доминантных наследственных заболеваниях или когда родители, гомозиготные по рецессивному признаку, хотят иметь детей без этого дефекта, представляет собой специальный случай тканеспецифической терапии. Однако ввиду необозримых проблем, связанных с возможными изменениями во всей системе и ее регуляции, никто из исследователей пока не может взять на себя ответственность за неизбежные последствия, к которым может привести подобное вмешательство.

GENES TRANSFER TO MAMMALIAN CELLS BY RETROVIRUS VECTORS

N. V. Tomilin, V. M. Kavsan

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

There are some reasons for the modern retrovirus vectors to be the most promising ones in genes transfer to mammalian cells. These vectors are intensively studied on different model animals. The first reports of tests of these vectors for the treatment of some hereditary human diseases are expected to appear in the near future.

1. Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes / M. Wigler, R. Sweet, G. K. Sim et al. // *Cell*.—1979.—16, N 4.— P. 777—785.
2. Томили Н. В. Новые системы генетической трансформации соматических клеток млекопитающих // *Биотехнология*.—1987.—3, № 3.— С. 343—351.
3. Parkman R. The application of bone marrow transplantation to the treatment of genetic diseases // *Science*.—1986.—232, N 4756.— P. 1373—1378.
4. Retroviral vector mediated gene transfer into human hematopoietic progenitor cells / H. E. Gruber, K. D. Finley, R. M. Hershsberg et al. // *Ibid.*—1985.—230, N 4729.— P. 1057—1061.
5. Perturbed hemopoiesis and the generation of multipotential stem cell clones in *src*-infected bone marrow cultures is an indirect of transient effect of the oncogene / J. A. Wyke, A. W. Stoker, S. Searle et al. // *Mol. and Celi. Biol.*—1986.—6, N 3.— P. 953—963.
6. Modulation of gene expression in multiple haematopoietic cell lineages following

- retroviral vector gene transfer / M.-C. Magli, J. E. Dick, D. Huszar et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 3.—P. 789—793.
7. Хесин П. Б. Непостоянство генома.— М.: Наука, 1984.—472 с.
 8. *Self-inactivating* retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells / S.-F. Yu, T. von Ruden, P. W. Kantoff et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 10.—P. 3194—3198.
 9. Mann R., Mulligan R. C., Baltimore D. Construction of retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus // Cell.—1983.—33, N 1.—P. 153—159.
 10. Cepko C. L., Roberts B. E., Mulligan R. C. Construction and application of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector // Ibid.—1984.—37, N 3.—P. 1053—1062.
 11. *Introduction* of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstruction of the hemopoietic system W/W^v mice / J. E. Dick, M. C. Magli, D. Huszar et al. // Ibid.—1985.—42, N 1.—P. 71—79.
 12. *Tissue-specific* expression of functionally rearranged lambda 1 Ig gene through a retrovirus vector / R. D. Conf, E. B. Reilly, H. N. Eisen, R. C. Mulligan // Science.—1987.—236, N 4804.—P. 954—957.
 13. *Retroviral* expression of the human IL-2 gene in a murine T cell line results in cell growth autonomy and tumorigenicity / G. Yamada, Y. Kitamura, H. Sonoda et al. // EMBO J.—1987.—6, N 9.—P. 2705—2709.
 14. *Expression* of a retrovirus encoding human HPRT in mice / A. D. Miller, R. J. Eckner, D. J. Jolley et al. // Science.—1984.—225, N 4662.—P. 630—632.
 15. Hock R. A., Miller A. D. Retrovirus-mediated transfer and expression of drug-resistance genes in human haematopoietic progenitor cells // Nature.—1986.—320, N 6059.—P. 275—277.
 16. Belmont J. W., Henkel-Tigges J., Chang S. M. W. Expression of human adenosine deaminase in murine haematopoietic progenitor cells following retroviral gene transfer // Ibid.—322, N 6077.—P. 385—387.
 17. *Potentiation* of growth factor activity by exogenous *c-myc* expression / V. Sorrentino, V. Drosdoff, M. D. McKinney, L. Zeitz // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 21.—P. 8167—8171.
 18. *Expression* of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors / G. Keller, C. Paige, E. Gilboa, E. F. Wagner // Nature.—1985.—318, N 6042.—P. 149—154.
 19. *Correction* of adenosine deficiency in cultured T and B cells by retrovirus-mediated gene transfer / P. W. Kantoff, D. B. Kohn, H. Mitsuya et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 17.—P. 6563—6567.
 20. *Expression* of retrovirally transduced genes in primary cultures of adult rat hepatocytes / J. A. Wolff, J.-K. Yee, H. F. Skelly et al. // Ibid.—1987.—84, N 10.—P. 3344—3348.
 21. *Expression* of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection / C. L. Stewart, S. Schultze, M. Vanek, E. F. Wagner // EMBO J.—1987.—6, N 2.—P. 387—388.
 22. *Infectious* and selectable retrovirus containing an inducible rat growth hormone minigene / D. A. Miller, E. S. Ong, M. G. Rosenfeld et al. // Science.—1984.—225, N 4666.—P. 993—997.
 23. Emerman M., Temin H. M. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism // Cell.—1984.—39, N 3.—P. 459—467.
 24. Milewski E. A. Discussion on human gene therapy // Recombinant DNA technical bulletin.—1986.—9, N 2.—P. 88—130.
 25. *The metabolic* basis of inherited disease.—New York: McGraw Hill, 1983.—450 p.
 26. *Retrovirus-mediated* transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor / A. Joyner, G. Keller, R. A. Phillips, A. Bernstein // Nature.—1983.—305, N 5934.—P. 556—558.
 27. *Introduction* of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse / D. A. Williams, J. K. Lemischka, D. G. Nathan, K. C. Mulligan // Ibid.—1984.—310, N 5977.—P. 476—480.
 28. Narayanan R., Jastreboff M. M., Berlino J. R. Development of an amphotropic, high-titer retrovirus vector expressing the dihydrofolate reductase gene and conferring methotrexate resistance // Gene.—1986.—48, N 1.—P. 71—80.
 29. *Retroviral* transfer of genes into canine hemopoietic progenitor cells in culture: a model for human gene therapy / W. W. Kwok, F. Schuening, R. B. Stead, A. D. Miller // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 12.—P. 4552—4556.
 30. Deeg H. J., Storb R., Thomas E. D. Recent advances in bone marrow transplantation.—New York: Alan R. Liss, 1983.—546 p.
 31. McCornick D. Human gene therapy: the first round // Biotechnology.—1985.—3, N 8.—P. 689—693.
 32. *Engineering* in humans // Biotechnology Can Res.—1986.—19, N 6.—P. 6.
 33. *Loss* of viral gene expression and retention of tumorigenicity by Abelson lymphoma cells / D. J. Grunwald, B. Dale, J. Dudley et al. // J. Virol.—1982.—43, N 1.—P. 92—103.
 34. *Отсутствие* генов вирусов саркомы птиц в трансформированных ими клетках млекопитающих / А. В. Рындич, Б. А. Яцула, И. Герик и др. // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 2.—С. 92—99.

35. *Instability of ASV genomes structure in mammalian and duck cells* / A. Rynditch, B. Yatsula, I. Hlozancik, J. Svoboda // 17th FEBS meeting: Abstr.— Berlin, 1986.— Vol. 367.— P. 226.
36. *Robertson M.* Mapping the disease phenotype // Nature.— 1986.—327.— P. 372—373.
37. *Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence* / V. H. Lee, R. Bookstein, F. Hong et al. // Science.— 1987.—235, N 4794.— P. 1394—1399.
38. *White R.* The search for the cystic fibrosis gene // Ibid.— 1986.—234, N 4780.— P. 1054—1055.

Ин-т цитологии АН СССР, Ленинград

Получено 01.03.88

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

УДК 575.155:575.224.46

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК SV40 ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ

С. М. Ландау

Благодаря развитию генной инженерии и использованию эукариотических векторов и, в частности, векторов на основе генома вакуолизирующего вируса SV40 появилась возможность подойти к изучению экспрессии генов в организме животных и даже, в перспективе, в организме человека. Хотя эти исследования еще далеки от использования их результатов на практике, однако, несомненно, они относятся к первым попыткам в развитии нового направления — генной терапии.

Чтобы оценить реальные возможности SV40 как вектора для генной терапии, необходимо рассмотреть молекулярные основы вирусной инфекции. В связи с этим представляет интерес изучение некоторых основных свойств вируса SV40 и его ДНК.

Общие свойства вируса и его ДНК. Обезьяний вирус 40, относящийся к семейству *Paroviridae* и роду *Polyomavirus*, впервые обнаружен Суитом и Хиллеманом в 1960 г. в клетках почки обезьян, используемых для производства вакцины против полиомиелита.

Геном вируса SV40 состоит из 5224 пар оснований (п. о.). В настоящее время определена полная нуклеотидная последовательность ДНК SV40. На рис. 1 показана генетическая карта SV40 [1]. ДНК SV40 имеет раннюю и позднюю области и регуляторный район, состоящий из «ориджина» репликации, раннего и позднего промоторов и усилителей. В состав контролирующих элементов SV40 входит блок палиндромов 17, 15 и 27 п. о., ТАТА-бокс (АТ-обогащенная область 17 п. о.), три копии повторов по 21 п. о. и две копии повторов по 72 п. о. (рис. 2) [2]. «Ориджин» ДНК SV40 разделен на две области с определенными границами: первая включает 17, 15 и 27 п. о. палиндромы и АТ-обогащенную последовательность, необходимые для репликации; другая — несет вспомогательные функции и включает повторы 21 п. о., повышающие эффективность репликации.

Ранний промотор SV40 перекрывается с поздним и с «ориджином» репликации. Ранний промотор эффективнее позднего. Два повтора по 72 п. о. являются энхансерами (усилителями) транскрипции. В регуляторном районе SV40 имеются I, II и III сайты для связывания с ранним белком T-антигеном.

Ранняя область SV40 несет информацию о двух белках. Это большой (T) и малый (t) антигены. Основные функции T-антигена заключаются в его необходимости для: 1) усиления репликации клеточной ДНК; 2) инициации репликации вирусной ДНК; 3) авторегуляции ранней транскрипции; 4) индукции поздней транскрипции; 5) детерминации круга хозяев; 6) неопластической трансформации клеток. При