

Полінуклеотидні інгібітори вірусної репродукції (алкіловані нуклеїнові кислоти, антисенсові РНК та рибозими)

А. Д. Швед

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

В огляді наведено дані власних робіт з вивчення полінуклеотидних інгібіторів вірусної репродукції. На моделях ДНК- та РНК-генних вірусів показано противірусну активність ряду нуклеїнових кислот з різних природних джерел, а їхні алкіловані похідні виявилися значно ефективнішими інгібіторами вірусної репродукції. Ендогенний синтез антисенсових РНК забезпечував суттєве пригнічення репродукції ВІЛ-1 у культурах гемопоетичних клітин людини. Синтезовано та клоновано рибозим, здатний специфічно розрізати in vitro tat-РНК ВІЛ-1.

Інтереси і зусилля наукового колективу спочатку в межах лабораторії первинного скринінгу біологічно активних речовин, пізніше трансформованою в лабораторію, а далі — у відділ молекулярної вірусології, були пов'язані з вивченням структури і функціональних властивостей полінуклеотидних інгібіторів вірусної репродукції, а саме: алкілованих нуклеїнових кислот, антисенсових РНК та рибозимів.

Усебічні дослідження біологічних властивостей полінуклеотидів як природних, так і штучно синтезованих, виявили широкий спектр їхньої біологічної активності в різних модельних системах [1], а позитивні результати випробувань хімічно модифікованих полінуклеотидів при онкологічних та лейкозних захворюваннях [2] обіцяли успіхи їхнього застосування у широкій клінічній практиці.

Обнадійливим виявилось застосування екзогенних полінуклеотидів у вирішенні проблеми пошуку селективних противірусних агентів [1, 3]. На розгортання робіт у цьому напрямку надихали результати численних досліджень, по-перше, показавших [4] здатність дволанцюгових РНК до індукції інтерферону, по-друге, їхньою привабливою властивістю виявилася спроможність прямого пригнічення специфічних вірусних ферментів, а саме — реп-

ліказ та транскриптаз. Наступним аргументом для використання полінуклеотидів як засобу боротьби з вірусними інфекціями були ефекти їхнього впливу на імунну систему: вони діяли як імуноад'юванти, оскільки були здатні суттєво підвищувати опір організму вірусним інфекціям. Згадані аспекти противірусної дії екзогенних полінуклеотидів часто було нелегко розрізнити, в багатьох випадках позитивні результати розглядали як кумулятивні ефекти, проте переконливість проведених спостережень стимулювала дослідників до нових пошуків.

Численні дані літератури свідчать, що інгібіторний ефект конкретного полінуклеотиду на одній вірусній моделі часто не відтворювався при його випробуваннях проти інших вірусів. Цей факт наводив на думку, що в механізмі противірусної дії полінуклеотидів має місце якась специфічність. Останню пов'язували із взаємодією молекул екзогенних полінуклеотидів з певними клітинними або вірусспецифічними факторами.

Отже, виявлення активного противірусного полінуклеотидного інгібітора було результатом емпіричного пошуку, пов'язаного із скринінгом масиву препаратів на ряді вірусних моделей. Експериментальні роботи такого плану свідчать також, що противірусна активність полінуклеотидів часто суттєво підвищувалася після їхньої хімічної модифікації, але ефект цей також залежав від ряду умов, у тому числі від характеру модифікації і

природи модифікуючої сполуки, про що докладно йдеться в огляді [1]. У напрямку вивчення противірусних властивостей екзогенних полінуклеотидів ми й спрямували свої зусилля, взявши за основу нуклеїнові кислоти різного походження і тіотэф (тіофосфамід) як поліфункціональну алкілюючу сполуку для їхньої модифікації.

Противірусна активність нуклеїнових кислот та їхніх алкілованих похідних. Результати випробувань показали [5], що в культурі клітин HEp-2, інфікованих вірусом грипу А (Порт Чалмерс) 1/73 в розведенні $10^{-1} + 10^{-4}$, концентрація 24 мкг/мл середовища препарату гомологічної вірусної РНК забезпечувала 100 %-ве пригнічення гемаглютинуючої активності при всіх інфікуючих дозах вірусу як при профілактичному (до зараження), так і при лікувальному (після зараження) внесенні його до культури. Ефективнішим інгібітором виявився продукт алкілювання цієї РНК, який вже в половинній концентрації (12 мкг/мл) забезпечував пригнічення вірусної репродукції у 100 % пробірочних культур, інфікованих вірусом у розведенні 10^{-2} , і 50 % — при розведенні 10^{-1} . Препарати гетерологічної ДНК та її алкіловане похідне в еквівалентних концентраціях на цій моделі виявилися менш ефективними.

З 18 випробуваних у курячих ембріонах зразків нативних та модифікованих нуклеїнових кислот статистично достовірні рівні протигрипозної активності проявили дві нативні РНК і одна ДНК та вісім препаратів алкілованих нуклеїнових кислот різного походження [6]. Активність одного з препаратів алкілованих ДНК на $2,5 \lg_2$ перевищувала таку протигрипозного хіміопрепарату ремантадину. Показано також, що противірусний ефект алкілованих нуклеїнових кислот статистично достовірно перевищував противірусну активність алкілюючого агента тіотэфу.

Останнє свідчить про те, що активність модифікованих препаратів не пов'язана з можливими залишками в препаратах алкілюючої сполуки. Антивірусні властивості притаманні власне нуклеїновим кислотам, а хімічна модифікація підсилювала їхню противірусну дію.

Випробування ряду препаратів *in vivo* проводили на мишах, чутливих до використаного штаму вірусу грипу [5]. Інтраназальне введення 48 мкг гомологічної вихідної або алкілованої РНК за 6 год до зараження забезпечувало виразний профілактичний ефект: індекс захисту сягав 83,3 %, лікувальна дія препаратів була менш виразною (індекс захисту складав 50 %). Щодо активності препаратів гетерологічної ДНК, то одержані на цій

моделі показники можна розглядати лише як позитивну тенденцію, а не як достовірні результати.

На моделі вірусу гастроентериту свиней, також РНК-геномного, в культурі клітин досліджувані препарати зумовлювали зниження титру вірусу порівняно з контрольними культурами (без препаратів), а найактивнішими в цій моделі виявилися алкілована РНК вірусу грипу, вихідна ДНК вірусу віспавакцини та алкілована ДНК із сперми морського їжака, які знижували врожай вірусу на $2,5—3,0 \lg$ [7].

Давно було помічено, що при деяких фітовірусних інфекціях у рослинах з'являються неспецифічні фактори, здатні пригнічувати репродукцію як даного, так і інших рослинних вірусів [8]. Співізначалося [9] про випадки природного механізму імунізації рослин картоплі гомологічним ослабленим вірусом, у ряді робіт [10—14] доведено можливість захисту рослин шляхом штучної імунізації слабопатогенним штамом вірусу. Отже, «вакцинацію» розглядають як потенційний засіб боротьби із вірусними ураженнями рослин і зниження збитків у сільському господарстві, пов'язаних з фітовірусною патологією.

Позитивні результати в дослідженнях захисної дії хімічно модифікованих нуклеїнових кислот проти вірусів людини і тварин [5, 7, 15] навели нас на думку про випробування такого підходу стосовно фітовірусної патології [16, 17].

На листях дурману, оброблених інактивованим тіофосфамідом Х-вірусом картоплі (аХВК) в певні строки відносно моменту інфікування інтактним вірусом, відбувалося відчутне пригнічення інфекційного процесу: з'являлися дрібні жовті (хлоротичні) плями, які пізніше перетворювалися у локальні крапкові некрози $0,2—0,3$ мм у діаметрі проти $1,0—2,0$ мм на контрольних (необроблених) листках рослин. Ці некрози не збільшувалися в діаметрі з перебігом інфекційного процесу, не відбувалося й відмирання листя. Імуноферментним аналізом у цих експериментах виявлено також значно нижчий вміст інфекційного вірусу в оброблених аХВК рослинах, ніж в необроблених листях у контролі.

Результати випробувань препаратів РНК ХВК (ХРНК) та її алкілованого похідного (аХРНК) на чутливих до цього збудника рослинах показали, що в залежності від моменту інфікування листків рослин відносно строку інкубації з препаратами відбувалося суттєве пригнічення патогенного процесу. Найвиразніше цей ефект спостерігався на моделі дурману, де інкубація листя з препаратом аХРНК за 48 год перед зараженням забезпечувала повне пригнічення репродукції ХВК.

Викладене вище свідчить, що нативна і модифікована тіотефом РНК ХВК та інактивований алкілюючою сполукою вірус є ефективними індукторами противірусної резистентності, а індукція стійкості найбільш виражена на 2—3-й день з моменту «вакцинації».

Дослідження противірусної дії нуклеїнових кислот проводилися також на ДНК-геномних вірусах. Виявилось, що препарат алкілованої ДНК вірусу вісповакцини забезпечував достовірне і залежне від концентрації пригнічення репродукції гомологічного вірусу при введенні його в ембріони до зараження вірусом [5]. При введенні одночасно з зараженням або після нього інтенсивність репродукції вірусу залишалася на рівні контролю.

У досліджах на моделі вірусу ларинготрахеїту птахів було також виявлено противірусну активність кількох з досліджуваних препаратів [15], які достовірно і приблизно рівною мірою пригнічували вірусну репродукцію при введенні їх у курячі ембріони за 6 год до моменту інфікування. Цікаво, що при аналізі морфології вірусних уражень хоріон-алантоїсних оболонок було відмічено такі зміни: при крайніх розведеннях вірусу, коли в ембріонах ще спостерігалися ознаки інфекції, замість типових для вірусу ларинготрахеїту птахів дрібних бляшок з'являлися суттєво більші бляшки. На оболонках з контрольних ембріонів поряд із численними дрібними також зрідка спостерігалися бляшки більшої величини, однак вони були значно менші за бляшки з дослідних ембріонів. В оригінальній публікації ми обговорювали питання про гетерогенність популяції даного вірусу і можливе практичне використання цього явища.

Вивчення структури та деяких біологічних властивостей алкілованих нуклеїнових кислот. Виявлена нами противірусна активність алкілованих нуклеїнових кислот викликала інтерес до вивчення деяких їхніх біологічних властивостей, а також структурних змін молекул полінуклеотидів у процесі хімічної модифікації.

Дослідження структурних перетворень молекул ДНК під дією тіотефу здійснювали, обравши за модель геном фага λ [18]. При електронно-мікроскопічному дослідженні ДНК з оброблених тіотефом фагів було виявлено наявність вздовж молекул різного розміру шпильок як наслідок зшитків різних ділянок молекул. Ці явища кількісно зростали із збільшенням тривалості алкілування, відбувалася також фрагментація молекул як результат дволанцюгових розривів та поява коротких потовщених утворень, які, напевне, являють собою багаторазово зшиті тіотефом ділянки молекул ДНК. За даними електронно-мікроскопічних вимі-

рювань, модальна довжина молекул очищеної ДНК фага λ в процесі алкілування зменшувалася з 17 мкм до 1,5—1,0 мкм протягом 96 год. Як показано хімічним аналізом динаміки алкілування трьох різних ДНК, за цей же час відбувалося також максимальне накопичення в препаратах ДНК етиленімінних груп тіотефу.

На клітинах китайського хом'ячка було показано [19, 20], що після обробки клітин РНК вірусу грипу частота мутантних колоній була в 5—6 разів вищою, ніж у контролі, а після обробки алкілованою РНК — лише в 2—3 рази. Відміни в мутагенній дії нативної і алкілованої РНК статистично достовірні. Мутагенна активність герпесвірусів також достовірно знижувалася після хімічної інактивації тіофосфамідом [21].

Одержані відомості повинні б застерегти медичних працівників від використання живих вірусних вакцин у певного контингенту населення, особливо репродуктивного віку, коли важливо використовувати інші засоби імунізацій або, принаймні, інактивовані вакцини.

З метою розширення уявлень про можливі механізми противірусної дії досліджуваних препаратів було перевірено вплив деяких з них на імунікомпетентну систему організму тварин за реакцією гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ). У цих тестах було встановлено [5], що жоден з препаратів не спричиняв імунодепресивної дії, у більшості випадків вони або підсилювали реакцію імунної відповіді, або не мали на неї суттєвого впливу.

Імуностимулююча активність ДНК практично завжди проявлялася при дії на аферентну ланку реакції ГСТ, тобто при введенні препаратів за 5 діб до ін'єкції сенсибілізуючої дози еритроцитів барана, а вплив модифікованих ДНК був виражений дещо сильніше, ніж вихідних. Препарати рибонуклеїнової природи на клітинну імунну відповідь у наших досліджах впливу не мали. Показано також, що досліджувані препарати в концентраціях, здатних пригнічувати віруси, продукції інтерферону в культурах клітин не викликали. Більш того, полірибонуклеотидний індуктор інтерферону полі(І):полі(С) після хімічної модифікації втрачав індукторну властивість.

Ці дослідження підтвердили дані інших авторів (див. огляд [1]) про непричетність інтерферону до механізму противірусної дії екзогенних полінуклеотидів та продуктів їхньої хімічної модифікації і дозволили зробити висновок, що в механізмі антивірусної дії досліджуваних нами препаратів індукція інтерферону також помітної ролі не виконує.

Щодо механізму протівірусної дії випробуваних нами препаратів, то найвірогідніші припущення, на нашу думку, можна пов'язати з уявленням про здатність екзогенних полінуклеотидів до функціонального блокування ферментів нуклеїнового синтезу. Ця гіпотеза визнається [4] як найбільш експериментально обґрунтована: екзогенні полінуклеотиди можуть або конкурувати з природною ендогенною матрицею за активні центри ферментів, або незворотно зв'язувати фермент без транскрибування («мертва матриця»). Крім того, екзогенні полімери можуть зв'язуватися з ендогенною матрицею — вірусним геномом або його РНК-транскриптами, надаючи їм форму, що не впізнається ферментами. Цей механізм обговорювався в літературі в межах відомої концепції «стратегічних послідовностей» [22] і саме він, напевне, мав місце в моделях, де ми випробовували гомологічні нуклеїнові кислоти (РНК вірусу грипу та ХВК, ДНК вірусу вісповакцини).

Припускалося також [23, 24], що більш виражене пригнічення вірусної репродукції і активності полімераз модифікованими полінуклеотидами порівняно з вихідними пов'язане з їхньою підвищеною стійкістю до дії клітинних нуклеаз. У наших досліджах алкіловані нуклеїнові кислоти також мали підвищену протівірусну активність порівняно з вихідними, їхній вплив на імункомпетентну систему тварин мав ту саму тенденцію. Отже, одержані дані, вірогідно, також можна пов'язати з підвищеною стійкістю модифікованих полінуклеотидів до клітинних нуклеаз.

Створення та випробування антисенсової векторної конструкції проти збудника СНІДу. Вже кілька років існує думка про те, що трансплантація донорського кісткового мозку хворим на СНІД могла б сприяти реконституції їхньої імунної системи за умови занобігання розповсюдження ВІЛ на донорські гемопоетичні клітини в організмі реципієнта. Як один із шляхів виконання цієї умови пропонували за допомогою потужних цитостатичних препаратів здійснювати передтрансплантаційне пригнічення власної імуногематопоетичної системи реципієнта, яка є головним резервуаром ВІЛ. Наступна трансплантація донорського кісткового мозку разом з антиретровірусними засобами (АЗТ або інші) повинна в такому разі знизити кількість збудника в організмі хворого і в той же час забезпечити його донорською системою імунного нагляду. І дійсно, при такому підході було досягнуто деякого прогресу при лікуванні ВІЛ-серопозитивного хворого з судутньою лімфомою [25]. Проте тривалої ремісії такий підхід не забезпечував, оскільки донорські гемопоетичні клітини не мали

захисту проти ВІЛ, залишки якого в організмі реципієнта неминуче призводили до рецидиву інфекційного процесу.

На сьогодні серед усіх можливих підходів до розробки стратегії контролю ВІЛ-інфекції найлогічнішим і найперспективнішим вважається генотерапевтичний підхід, що забезпечує стійкість клітин крові до збудника СНІДу. Аналіз експериментальних даних [26] свідчить, що генна терапія СНІДу може бути спрямована на декілька стадій реплікаційного циклу ВІЛ. Це використання трансдомінантних мутантів по *gag* [27] та *env* [28] білках, які повинні інтерферувати із збіркою та формуванням інфекційних віріонів. Для пригнічення транскрипції та трансактивації ефективно використовували [29] суперекспресію у клітині послідовностей LTR ВІЛ, що містять у собі TAR-елемент, який інтенсивно зв'язується з білком ТАР, тобто виступає в ролі «пастки» на шляху реалізації його функцій, завдяки чому механізм такого роду інтерференції і було названо TAR-decoy (TAR-пастка). Як засіб для пригнічення процесингу вірусних РНК в експериментах використовували [30] суперекспресію у клітинах послідовностей RRE (RRE-decoy) та трансдомінантні мутанти по білку Rev [31]. Методологія надання клітинам стійкості до ВІЛ спирається також на побудову молекулярних векторних конструкцій для синтезу в клітині антисенсових РНК (асРНК) та/або рибозимів, здатних пригнічувати експресію окремих ВІЛ-специфічних мРНК.

Д. Балтімор [32] висловив впевненість, що такий підхід матиме реальні шанси на успіх і запропонував назвати його «внутрішньоклітинною імунізацією». Саме ця назва набула визнання у світових наукових колах і стало використовується для визначення генотерапевтичних заходів, заснованих на підході, сформульованому автором, який висловив також думку, що для реалізації стратегії внутрішньоклітинної імунізації не передбачається ніяких теоретичних перешкод, окрім проблем практичного плану. Ці проблеми є загальними для будь-яких заходів, пов'язаних з генотерапевтичним втручанням, а конкретний шлях здійснення останнього не відрізнятиметься від широко уживаного протоколу трансплантації кісткового мозку. Передбачалося, що модифіковані в такий спосіб стовбурові клітини та клітини — попередники гемопоезу після трансфузії хворому на СНІД будуть колонізувати органи кровотворення організму, в першу чергу кістковий мозок. Для надання достатнього простору для імплантації модифікованих гемопоетичних клітин кістковий мозок реципієнта мусить бути частково звільнений шляхом опромінення або

призначення цитотоксичних засобів. Якщо така стратегія буде успішною, трансплантовані клітини завдяки стійкості до ВІЛ матимуть переваги для розростання і виконання гемопоетичних функцій.

Базуючись на викладених міркуваннях, ми поставили за мету розробити підхід до генної терапії СНІДу, створивши молекулярну векторну конструкцію, здатну забезпечити в клітині синтез асРНК-транскриптів для пригнічення експресії ВІЛ-специфічних мРНК [33, 34].

На основі даних аналізу молекулярно-генетичних основ реалізації геному ВІЛ-1 за мішеней для антисенсового впливу було обрано ділянку 1-го екзона Tat\Rev, який найбільше відповідає поставленій меті, оскільки кодує важливі для репродукції вірусу регуляторні білки та ключові генетичні сигнали, а його послідовність є висококонсервативною серед багатьох проаналізованих ізолятів ВІЛ.

Важливим кроком у створенні анти-ВІЛ векторної конструкції був вибір промотора, здатного направляти синтез асРНК у відповідь на проникнення збудника в клітину. Це можливо, якщо синтез асРНК буде спрямованим промотором ВІЛ, який індукується ранніми продуктами вірусного геному, а саме — трансактиватором Tat. Виходячи з цих міркувань, було використано власну транскрипційну систему ВІЛ, видаливши з неї послідовності енхансера та негативних регуляторів транскрипції, з яких перші можуть впливати на нижче розташовані гени клітини, а другі — ускладнюють експресію генів під контролем LTR ВІЛ і обумовлюють їхню залежність від умов клітини-хазяїна.

Шляхом полімеразної ампліфікації ДНК було одержано продукт, з якого виділено *BamHI-HindIII*-фрагмент довжиною 165 п. н., очищено в поліакриламідному гелі та клоновано в полілінкер плазміді *pUC19*. Сиквенування клонованого фрагмента показало, що його послідовність відповідає транскрипційній одиниці ВІЛ з ТАТА-боксом, основними елементами ініціації транскрипції SP-1 та TAR-елементом (рис. 1).

У виборі еукаріотичного вектора ми зупинилися на адено-асоційованому вірусі (ААВ) людини, переваги і привабливі властивості якого (повна нешкідливість для людини, достатня векторна ємність, сайтспецифічна інтеграція у клітинний геном та ін.) широко висвітлені в публікаціях останнього десятиліття [35—39].

Створена антисенсова конструкція *pHIV-as-neo* представлена на рис. 2. Основою молекулярного вектора є геном ААВ, у який на місце генів структурних білків клоновано селективний ген *neo'* та ВІЛ-антисенсовий ген. Транскрипція асРНК з

цієї конструкції здійснюється власним промотором ВІЛ-1, а наявність TAR-елементу дозволяє багатократне підвищення транскрипції у відповідь на появу в клітині ВІЛ-специфічного регуляторного білка Tat. Таким чином, у створеній конструкції втілено ідею зворотного зв'язку між вірусною інтервенцією і функціональною активністю спрямованої проти ВІЛ антисенсової конструкції (рис. 3).

Вивченню впливу антисенсової конструкції на перебіг ВІЛ-інфекції передувало випробування чутливості інтактних гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини до цього збудника. Було показано [40—41], що з 25 досліджених зразків клітин з різних ембріонів лише у двох синтез антигена р24 та титри інфекційного вірусу були порівнянними з цими показниками вірусної репродукції у стандартній культурі клітин MT-4, що традиційно використовуються в експериментах з виділення та титрування ВІЛ. Рівні репродукції ВІЛ у клітинах інших двох зразків дають підстави стверджувати, що вони мають виражену стійкість до цього збудника. В культурах клітин з решти ембріональних зразків інфекційні показники були досить високими — часом на $2 \lg ID_{50}$ перевищували титр ВІЛ у клітинах MT-4.

З літератури відомо [42], що 5—10 % інфікованих ВІЛ людей стають носіями збудника без зменшення кількості Т4⁺ лімфоцитів і розвитку імунodefіциту, тобто не хворіють на СНІД. Приблизно у 10 % інфікованих осіб процес розвивається з драматичною швидкістю, у решти хворих перебіг інфекції вважається типовим. Наші дані на клітинному рівні підтверджують існування природних механізмів стійкості до ВІЛ-інфекції.

Несприйнятливості до ВІЛ-інфекції залишається нез'ясованою проблемою, хоча вже відомо принаймні сім генетичних маркерів, причетних до чутливості клітин до ВІЛ-інфекції [43—45]. Тому є всі підстави сподіватися, що виявлення з будь-якого джерела організму людини гемопоетичних клітин з ознаками зниженої чутливості до ВІЛ матиме неабияке значення як для вирішення дослідницьких завдань, так і для практичної медицини. В першому випадку такі клітини дали б змогу виявлення клітинних факторів і механізмів стримування інфекції. В клініці ж трансфузії стійких до ВІЛ стовбурових гемопоетичних клітин могли б сприяти реконституції імунної системи організму і в такий спосіб значною мірою полегшити долю хворих на СНІД, а додаткове забезпечення таких клітин штучним внутрішньоклітинним імунітетом проти ВІЛ суттєво підвищуватиме шанси хворих на видужання або, принаймні, віддалення фатального кінця.

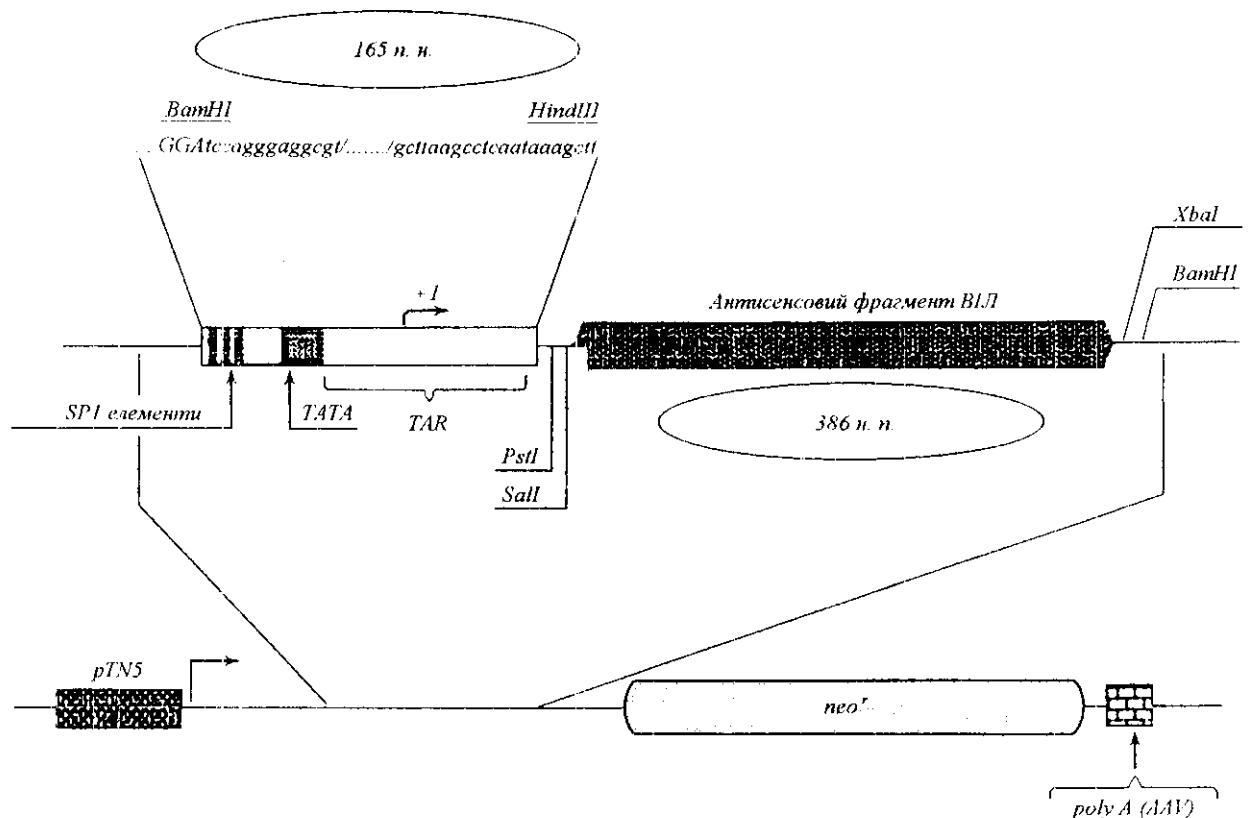


Рис. 1. Транскрипційна одиниця створеного антисенсового гена. 165-нуклеотидний фрагмент — безхансерний промотор LTR ВІЛ-1 з сайтами зв'язування транскрипційних факторів SP-1, TATA-боксом та TAR-елементом промотора ВІЛ; +1 — старт транскрипції; 386-нуклеотидний фрагмент — послідовність геному ВІЛ, клонувана в антисенсовій орієнтації відносно промотора ВІЛ

Дані досліджень протівірусної активності антисенсової конструкції представлені на рис. 4, звідки видно, що в популяції клітин, трансфікованих створеною нами конструкцією *pHIV-as-neo* та культивованих у присутності селективного антибіотика (рис. 4, а, крива 3), спостерігалось достовірне ($p < 0.01$) зменшення продукції як антигена р24, так і інфекційного титру ВІЛ порівняно з контрольною (не трансфікованою) культурою (рис. 4, а, крива 1).

У клітинах, трансфікованих векторною плазмідною *pDL52-91neo*, яка несе послідовності Рер-білка ААВ, але не має антисенсового фрагмента, при культивуванні з антибіотиком G-418 також

відбувалося суттєве пригнічення репродукції ВІЛ (рис. 4, а, крива 2). Протівірусний ефект у даному досліді (контроль вектора) може бути зумовлений дією саме Рер-білка ААВ. У контрольних дослідях, де в клітини трансфікували плазмиду, що містила лише кінцеві повтори ААВ (тобто не здатну синтезувати Рер-білок ААВ), помітного впливу на ВІЛ-інфекцію не відбувалося. Це опосередковано підтверджує дані літератури [46—48] про здатність ААВ-специфічного Рер-білка пригнічувати репродукцію ВІЛ.

У трансфікованих клітинах в разі культивування без селективного антибіотика G-418 помітного пригнічення вірусної репродукції не відбу-

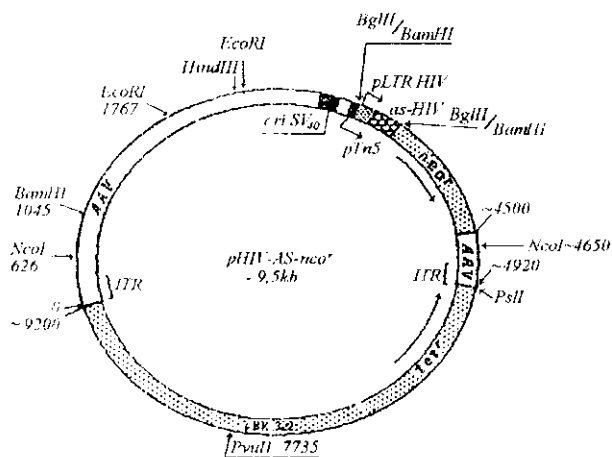


Рис. 2. Схема вектора *pHIV-as-neo*, що експресує проти-ВІЛ асРНК

валояся (рис. 4, б). Це зумовлено тим, що лише 3—5 % (ефективність використаного методу трансфекції) популяції інфікованих клітин були забезпечені антисенсовим внутрішньоклітинним імунітетом. Більша частина клітин популяції не трансфікована і за відсутності антиметаболіту зберігає нормальний рівень життєздатності, а відтак і звичайну чутливість до ВІЛ-інфекції. В умовах селективного тиску клітини, що несуть у собі антисенсову конструкцію разом з геном стійкості до антибіотика, залишаються життєздатними, але репродукція ВІЛ в них заблокована асРНК.

Враховуючи досягнуті позитивні результати з пригнічення *in vitro* реплікації ВІЛ в гемопоетичних клітинах людини, що несуть у собі антисенсові векторні конструкції, є підстави очікувати, що при трансфузії хворому на СНІД вони братимуть на себе функції імунного захисту організму, а по мірі заповнення такими клітинами кров'яного русла кров реципієнта буде поступово звільнятися від збудника. Можна припустити також, що протягом такого контролюваного інфекційного процесу в організмі нароблюватимуться противірусні антитіла, що сприятиме формуванню власного імунного захисту. Якщо передбачувані ефекти матимуть місце в організмі пацієнта, можна сподіватися, що трансплантація стійких до ВІЛ гемопоетичних клітин продовжить йому життя або хоча б полегшить страждання. Підтвердження (або спростування) викладених вище припущень можна одержати шля-

хом клінічних випробувань створеної системи генної терапії СНІДу.

Таким чином, розробка молекулярної векторної конструкції для створення штучного внутрішньоклітинного імунітету проти ВІЛ досягла поставленої мети: в трансфікованій нею популяції клітин спостерігалояся суттєве пригнічення репродукції збудника СНІДу. Ці результати дають право стверджувати, що на основі гемопоетичних клітин людини створено систему генної терапії СНІДу, яка після завершення доклінічних тестів може бути передана на клінічні випробування у хворих на СНІД.

Створення та випробування *in vitro* рибозиму проти *tat*-РНК ВІЛ-1. Каталітичні РНК, здатні розрізати фосфодієфірні зв'язки в молекулах РНК, дістали назву «рибозими» [49]. Рибозими у вигляді «головки молотка» було відкрито в геномах віроїдів і вірусоїдів та показано можливість їхнього використання для специфічного розрізання обраних РНК-мішеней [50—52]. Сайт ферментативної активності такого рибозиму складає послідовність з 22 нуклеотидів, а його специфічність визначається певною послідовністю кількох нуклеотидів у сайті розрізання молекули-субстрату та комплементарністю прилеглих з обох боків до рибозиму коротких фланків.

Рибозим, що відповідає моделі «головка молотка» і є специфічним до ділянки першого експресуючого екзона *tat*-РНК (точка розщеплення відповідає позиції 5376 п. о. послідовності ВІЛ-1 ізоляту ВН10), було штучно синтезовано та клонувало у транскрипційному векторі *pGEM-4Z* під промотором Т7 РНК-полімерази [53]. Фрагмент гена *tat*-ВІЛ-1 довжиною 384 п. о. виділяли з плазмиди *pВН10* і клонували у векторі *pGEM-3Z*. Шляхом безклітинної препаративної транскрипції плазмідних ДНК-матриць одержували *tat*-РНК-транскрипти та РНК-транскрипти рибозиму.

Каталітичну активність створеного рибозиму в канонічних умовах реакції виявити не вдалося. Добір умов оптимізації реакції розщеплення *tat*-РНК-субстрату виявив [53—55] залежність активності рибозиму від іонів Mg^{2+} та полікатіона спермідину, а також іонів лужних металів, які за здатністю до її активації у фізіологічних концентраціях (0,1 М) чергуються в ряду: $K^+ > Li^+ > Na^+$. Максимальна дія рибозиму спостерігалояся при нейтральних значеннях рН (6,9—7,2) та іонній силі біля 0,1 М. У розробленій системі *in vitro* розщеплення транскрипта *tat*-РНК створеним рибозимом каталітична активність останнього складала близько 25—30 % за 180 хв при 28 °С. І хоча ефективність реакції була порівняно невеликою, вияв-

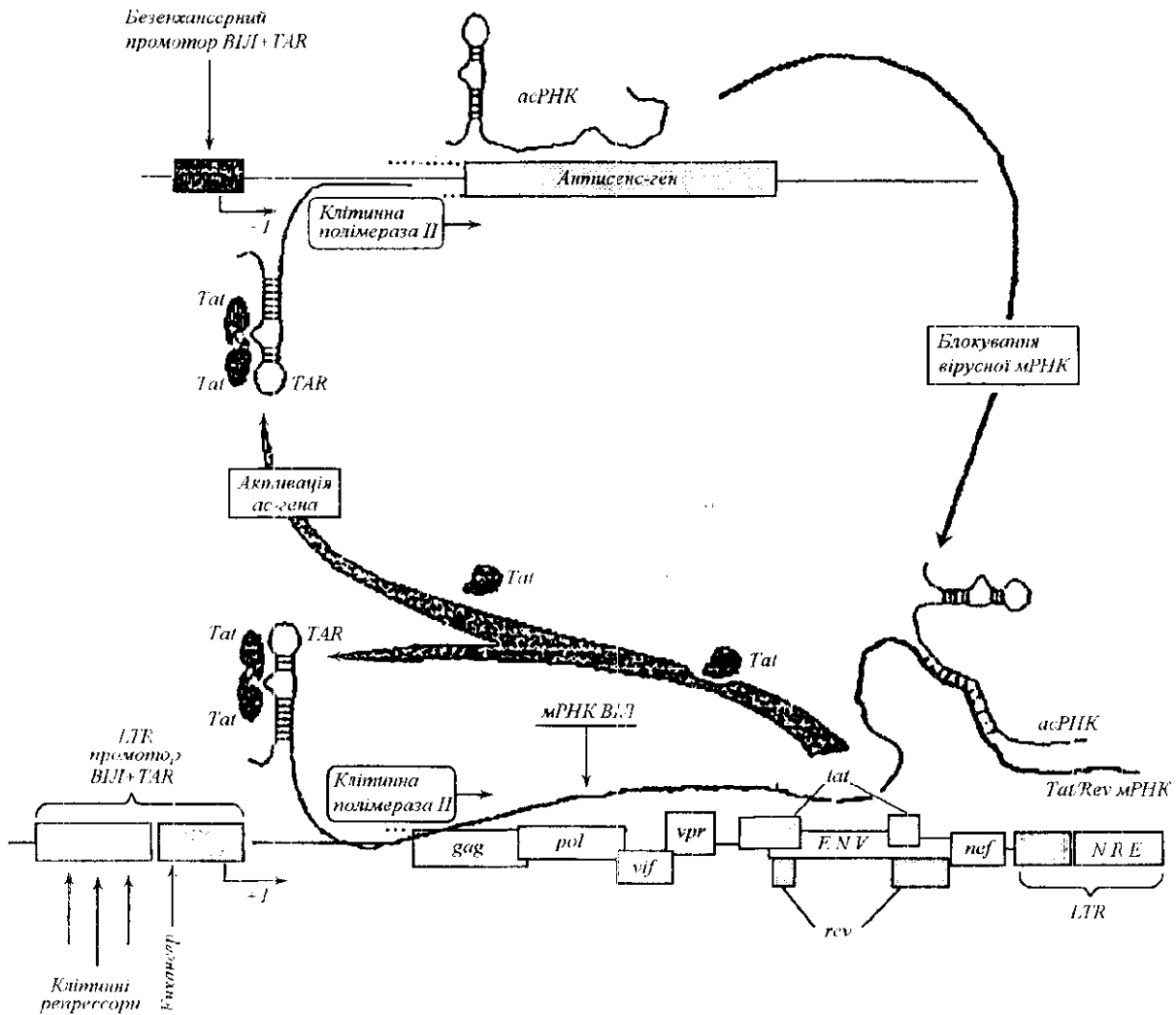


Рис. 3. Схема регуляції транскрипції acРНК у клітині в залежності від експресії регуляторних генів ВІЛ. Верхня частина рисунка відображає схему транскрипції антисенсового гена, нижня I — геному провірусу

лена *in vitro* каталітична активність рибозиму, спрямованого проти тієї ж мішені в геномі ВІЛ, що й антисенсова РНК, дає можливість удосконалення умов її реалізації, а також складає підстави сподіватися на наступне поєднання в одній векторній конструкції двох інструментів боротьби з ВІЛ-

інфекцією — антисенсових РНК та рибозимів, що, за існуючих уявлень, повинно позбавити збудника СНІДу можливості репродукції і припинити інфекційний процес.

Отже, даний огляд відображає результати тривалих пошуків у галузі вірусологічних досліджень,

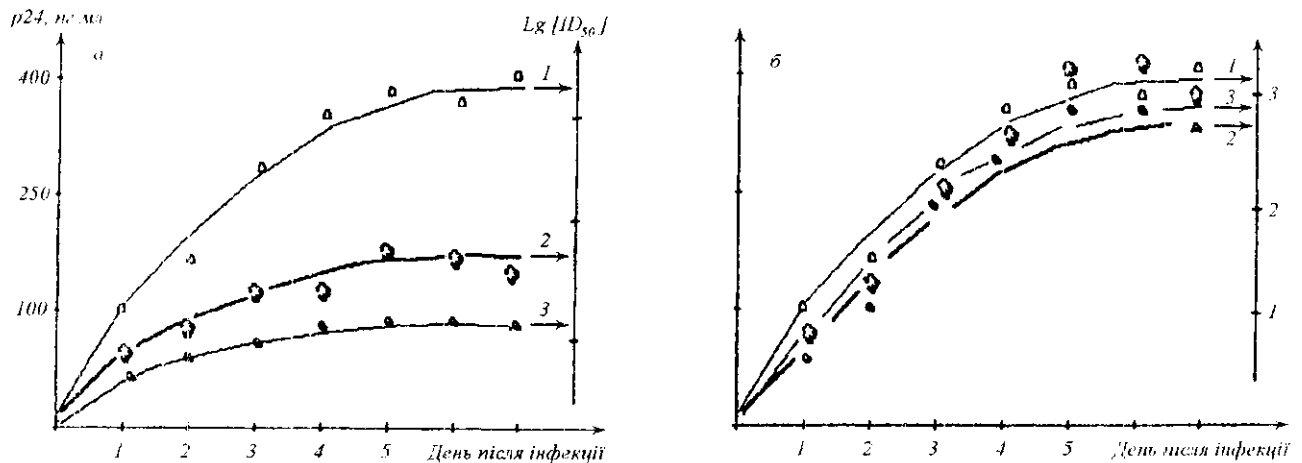


Рис. 4. Вплив антисенсової векторної конструкції на репродукцію ВІЛ в гемопоетичних клітинах: а — у присутності антибіотика G-418; б — без антибіотика (1 — нетрансфіковані клітини; 2 — клітини, трансфіковані векторною конструкцією pD152-91neo; 3 — клітини, трансфіковані антисенсовою векторною конструкцією pNIV-as-neo

які виконувалися паралельно і на рівні аналогічних робіт свого часу. Одержані дані свідчать про те, що серед нуклеїнових кислот різного походження шляхом ретельного скринінгу можна виявити зразки, активні проти деяких РНК- та ДНК-геомних вірусів. Показано також, що хімічна модифікація нуклеїнових кислот за допомогою тіоетеру підсилює ефекти їхньої противірусної дії.

Доведено, що за мутагенними властивостями алкілованих нуклеїнових кислот та інактивованих цією сполукою віруси достовірно поступаються вихідним, немодифікованим, препаратам. Ця обставина свідчить, з одного боку, про безпечність медичного або ветеринарного застосування модифікованих нуклеїнових кислот; з другого боку, одержані дані переконують в доцільності використання інактивованих вірусних вакцин замість живих або атенуйованих.

Виявлені ознаки стійкості до збудника СНІДу гемопоетичних клітин від окремих ембріонів на клітинному рівні *in vitro* підтверджують відомий феномен носійства вірусу без ознак синдрому імунodefіциту і свідчать про наявність внутрішньоклітинних механізмів (факторів) гальмування репродукції ВІЛ. Подальші фундаментальні дослідження в цьому напрямку, можливо, сприятимуть ідентифікації ще не відомих природних факторів внутрішньоклітинного проти-ВІЛ імунітету, що

збагатило б як наші уявлення про молекулярні механізми вірусно-клітинної взаємодії, так і арсенал засобів подолання СНІДу.

В популяції гемопоетичних клітин, трансфікованих створеною антисенсовою векторною конструкцією, відбувалося суттєве пригнічення репродукції ВІЛ-1, що обумовлено рядом складових факторів. По-перше, обрана послідовність для антисенсового впливу (*tat/rev* екзон) найбільше відповідає відомим умовам пригнічення експресії гена-мішені: вона належить до ключових вірусних генів, консервативна серед багатьох вивчених ізолятів ВІЛ, має незначну структурованість як сама, так і антисенсовий до неї РНК-транскрипт. По-друге, використання власного промотора ВІЛ для транскрипції антисенсових РНК у клітині забезпечило реалізацію експресії створеної конструкції за принципом зворотного зв'язку між антисенсовим геном та геномом ВІЛ-1 через взаємодію ранніх продуктів вірусного геному, а саме — трансактиватора Tat, з TAR-елементом. Далі, проти-ВІЛ інгібіторна дія створеної конструкції підсилюється Рер-білком, що експресується з відповідного гена ААВ, використаного в конструкції як вектор. Можна сподіватися також і на додатковий вплив на ВІЛ з боку TAR-елементу, що згадується в літературі як виконавча ланка механізму блоку реплікації ВІЛ під назвою TAR-decoy.

Таким чином, гемопоетичні клітини людини, трансфоровані створеною антисенсовою векторною конструкцією, можна розглядати як систему генної терапії СНІДу, вартої клінічних випробувань у хворих на СНІД.

Подальші роботи в напрямку удосконалення структури рибозиму та умов прояву його каталітичної активності, можливо, дадуть змогу підсилити створену антисенсову конструкцію додатковим інструментом захисту проти ВІЛ.

А. Д. Швед

Полинуклеотидные ингибиторы вирусной репродукции (алкилированные нуклеиновые кислоты, антисмысловые РНК и рибозимы)

Резюме

В обзоре приведены данные собственных работ по изучению полинуклеотидных ингибиторов вирусной репродукции. На моделях ДНК- и РНК-геномных вирусов показана антивирусная активность ряда алкилированных нуклеиновых кислот из различных природных источников, а их алкилированные производные оказались более эффективными ингибиторами вирусной репродукции. Эндогенный синтез антисмысловых РНК обеспечивал существенное усиление репродукции ВИЧ-1 в культурах гемопоэтически клеток человека. Синтезирован и клонирован рибозим, способный специфически разрезать *in vitro* tat-РНК ВИЧ-1.

A. D. Shved

Polynucleotide inhibitors of virus reproduction (alkylated nucleic acids, antisense RNAs and ribozyme)

Summary

The review contains previously obtained data on the experimental research of polynucleotide inhibitors of virus reproduction in models of RNA and DNA containing viruses. The antiviral properties of nucleic acids isolated from various sources were revealed, but their alkylated derivatives inhibited virus reproduction more efficiently. The endogenous synthesis of antisense RNA provided essential inhibition of HIV-1 replication in human hematopoietic cell cultures. The ribozyme capable to cleave specifically HIV-1 tat RNA *in vitro* was synthesized and cloned.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Швед А. Д. Антивирусные свойства полинуклеотидов, не связанные с индукцией интерферона // Микробиол. журн.—1982.—44, № 3.—С. 75—85.
2. Chandra P., Kornhuber B., Ebener U. Biological and clinical effects of a partially thiolated polycytidylic acid (AMC): a potent inhibitor of DNA synthesis in RNA tumor viruses // *Mod. Trends Hum. Leuk.* 3.—Berlin etc., 1979.—P. 145—155.
3. Pitha P. M. Analogues of viral genomes // *Selective inhibitors of viral function* / Ed. W. A. Carter. —Cleveland: CRC press 1973.—P. 394—360.
4. Pitha P. M., Pitha J. Polynucleotide analogs as inhibitors of DNA and RNA polymerases // *Inhibitors of DNA and RNA polymerases* / Ed. P. Sarin, R. Gallo.—New York: Pergamon press, 1980.—P. 235—247.
5. Швед А. Д., Спивак Н. Я., Онищук Ф. Д. и др. Изучение антивирусной активности экзогенных нуклеиновых кислот и их химически модифицированных производных // *Макромолекулы клеток и вирусов.*—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 47—60.
6. Швед А. Д. Структура і функціональні властивості полі-нуклеотидних інгібиторів вірусної репродукції (алкілованих нуклеїнових кислот, антисенсових РНК та рибозимів): Автореф. ... д-ра біол. наук.—Київ, 1996.—43 с.
7. Потопальский А. И., Спивак Н. Я., Швед А. Д. и др. Активность некоторых химиопрепаратов в отношении вируса трансмиссивного гастроэнтерита и энтерита свиней // *Микробиол. журн.*—1983.—45, № 5.—С. 75—78.
8. Sela I., Applebaum S. W. Occurrence of antiviral factor in virus-infected plants // *Virology.*—1962.—17, N 4.—P. 543—548.
9. Романова С. А., Леднева В. А. Случай естественной вакцинации картофеля слабым штаммом Х-вируса картофеля (ХВК) // *Теория и практика использования иммунитета с.-х. культур к вирусным болезням: Тез. докл. VIII Всесоюз. совещ.*—Вильнюс, 1984.—С. 79—80.
10. Власов Ю. И., Катин И. А. Влияние вакцинного штамма ВТМ на образование антивирусных веществ в растениях томатов // *Бюл. ВИЗР.*—1983.—№ 54.—С. 85—89.
11. Власов Ю. И., Паршин В. Г. Биологические основы и пути практического использования индуцированного иммунитета растений к вредителям и болезням // *Тр. ВИЗР.*—1981.—№ 30.—С. 3—5.
12. Рейфман В. Г., Романова С. А. Вакцинация картофеля слаботогенным штаммом Х-вируса // *Теория и практика использования иммунитета с.-х. культур к вирусным болезням: Тез. докл. VIII Всесоюз. совещ.*—Вильнюс, 1984.—С. 78—79.
13. Катин И. А. Метод вакцинации и антивирусное вещество // *Там же.*—С. 109—111.
14. Родина К. И. Устойчивость томатов к Х-вирусу картофеля, индуцированная слабым штаммом // *Там же.*—С. 115—117.
15. Швед А. Д., Бабкин В. Ф., Потопальский А. И. и др. Ингибирование химически модифицированными нуклеиновыми кислотами репродукции вируса инфекционного ларинготрахеита птиц // *Вопр. вирусологии.*—1982.—№ 3.—С. 117—119.
16. Семерникова Л. И., Диденко Л. Ф., Швед А. Д. и др. Задержка репродукции Х-вируса картофеля с помощью инактивированного гомологичного вируса // *Теория и практика использования иммунитета с.-х. культур к вирусным болезням: Тез. докл. VIII Всесоюз. совещ.*—Вильнюс, 1984.—С. 23—24.
17. Семерникова Л. И., Диденко Л. Ф., Краса В. Г. *та ін.* Про можливість індукції стійкості рослин до Х-вірусу картоплі алкілюваними препаратами гомологічного вірусу та його РНК // *Мікробіол. журн.*—1996.—58, № 6.—С. 29—37.
18. Швед А. Д., Соломко А. П., Потопальский А. И. и др. Структурно-функциональные особенности модифицированных нуклеиновых кислот // *Молекуляр. биология.*—1980.—Вып. 26.—С. 64—78.
19. Бужиевская Г. И., Лукаш Л. Л., Мельниченко В. С., Швед А. Д. Индукция тенных мутаций в клетках млекопитающих под действием РНК вируса гриппа // *Докл. АН УССР. Сер. Б.*—1981.—№ 9.—С. 65—68.
20. Бужиевська Г. І., Лукаш Л. Л., Швед А. Д. *та ін.* Мутагенний ефект нативної і модифікованої РНК вірусу грипу // *ДАН УРСР. Сер. Б.*—1985.—№ 7.—С. 58—60.
21. Рубашевский Е. Л., Лукаш Л. Л., Швед А. Д. и др. Мутагенная активность нативного и инактивированного вируса простого герпеса // *Биол. науки*—1988.—№ 9.—С. 83—87.

22. Stebbing N., Grantham C. A., Lindley I. J. D. et al. In vivo antiviral activity of polynucleotide mimics of strategic regions in viral RNA // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1977.—248.—P. 682—696.
23. Muzo A. A., Avdonina T. A., Mashkova T. D., Kiselev L. L. Directed cleavage of ribopolynucleotides with nucleases restricted by multiple modification of substrate // *Biochim. et biophys. acta.*—1976.—432, N 3.—P. 353—360.
24. Sagi J., Oivos J. Modified polynucleotides. 5. Slow-down of nuclease action by 5-alkyluracil-containing DNAs // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1980.—95, N 1.—P. 156.
25. Appelbaum F. R., Sullivan K., Buckner C. D. et al. Treatment of malignant lymphoma in 100 patients with chemotherapy, total body irradiation and marrow transplantation // *J. Clin. Oncol.*—1987.—5.—P. 1340—1347.
26. Yamada O., Yu M., Yee J.-K. et al. Intracellular immunization of human T cells with a hairpin ribozyme against human immunodeficiency virus type 1 // *Gene Therapy.*—1994.—1, N 1.—P. 38—45.
27. Trono D., Feinberg M. B., Baltimore D. HIV-1 gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus // *Cell.*—1989.—59, N 1.—P. 113—120.
28. Steffy K. R., Wong-Staal F. Transdominant inhibition of wild-type human immunodeficiency virus type 2 replication by an envelope deletion mutant // *J. Virol.*—1993.—67, N 4.—P. 1854—1859.
29. Sullenger B. A., Gallardo H. F., Ungeres G. E., Gilboa E. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus // *Cell.*—1990.—63, N 2.—P. 601—608.
30. Lee T. C., Sullenger B. A., Gallardo H. F. et al. Overexpression of RRI-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells // *New Biol.*—1992.—4, N 1.—P. 66—74.
31. Malim M. H., Bohnelein B., Hauber J., Cullen B. R. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator-derivation of a trans-dominant repressor of Rev function // *Cell.*—1989.—58, N 1.—P. 205—214.
32. Baltimore D. Intracellular immunization // *Nature.*—1988.—335, N 6189.—P. 395—396.
33. Кухарченко О., Лукаш Л., Іванська Н. та ін. Конструювання еукаріотичного вектора на основі ААВ, який здійснює синтез у клітині антисенсових РНК проти ВІЛ // 36. тез Першої нац. наук.-практ. конф. з проблем ВІЛ/СНІД з міжнарод. участю (Київ, 24—26 січня 1995 р.).—Київ, 1995.—С. 61—62.
34. Кухарченко О. П., Рибалко С. Л., Лукаш Л. Л. та ін. Створення модельної векторної конструкції, що експресує антисенсові РНК проти ВІЛ-1, для внутрішньоклітинної імунізації гемопоетичних клітин // *Інфекц. хвороби.*—1997.—№ 1.—С. 16—20.
35. Muzyczka N. Use of α adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*—1992.—158.—P. 98—108.
36. Chatterjee S., Johnson P. R., Wong K. K. Dual-target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of an adeno-associated virus antisense vector // *Science.*—1992.—258.—P. 1485—1488.
37. Walsh C. E., Liu J. M., Xiao X. et al. Regulated high level expression of a human γ -globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1992.—89, N 15.—P. 7257—7261.
38. Ponnazhagan S., Nallari M. L., Srivastava A. Suppression of human α -globin gene expression mediated by the recombinant adeno-associated virus 2-based antisense vectors // *J. Exp. Med.*—1994.—179.—P. 733—738.
39. Zhou S. Z., Cooper S., Kang L. Y. et al. Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood // *Ibid.*—N 6.—P. 1867—1875.
40. Іванська Н., Сухорада О., Лукаш Л. та ін. Чутливість ембріональних клітин людини до ВІЛ інфекції // 36. тез Першої нац. наук.-практ. конф. з проблем ВІЛ/СНІД з міжнарод. участю (Київ, 24—26 січня 1995 р.).—Київ, 1995.—С. 56—57.
41. Іванська Н. В., Лукаш Л. Л., Рибалко С. Л. Чутливість гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини до ВІЛ-інфекції // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 3.—С. 245—249.
42. Haynes B. F., Pantaleo G., Fauci A. S. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection // *Science.*—1996.—271, N 5274.—P. 324—328.
43. Feng Y., Broder C. C., Kennedy P. E., Berger E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor // *Ibid.*—272.—P. 872—877.
44. Clapham P. R., Weiss R. A. Spoilt for choice of co-receptors // *Nature.*—1997.—388.—P. 230—231.
45. Deng H., Unutmaz D., KewalRamani V. L., Littman D. R. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses // *Ibid.*—P. 296—300.
46. Antony B. A., Rabson B. A., Miller I. L. et al. Adeno-associated virus Rep protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in human cells // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 396—404.
47. Rittner K., Heilbronn R., Kleinschmidt J. A., Sczakiel G. Adeno-associated virus type 2-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: involvement of p78^{REP}/p68^{REP} and the HIV-1 long terminal repeat // *J. Gen. Virol.*—1992.—73.—P. 2977—2981.
48. Oelze I., Rittner K., Sczakiel G. Adeno-associated virus type 2 rep gene-mediated inhibition of basal expression of human immunodeficiency virus type 1 involves its negative regulatory functions // *J. Virol.*—1994.—68, N 2.—P. 1229—1233.
49. Cech T. R. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes // *Science.*—1987.—236.—P. 1532—1539.
50. Forster A. C., Symons R. H. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites // *Cell.*—1987.—49.—P. 211—220.
51. Uhlenbeck O. C. A small catalytic oligoribonucleotide // *Nature.*—1987.—328.—P. 596—600.
52. Haseloff J., Gerlach W. L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities // *Ibid.*—1988.—334.—P. 585—591.
53. Бурьяновский Л. Н., Швед А. Д. Специфическая деструкция *tat*-РНК ВИЧ-1 *in vitro* с помощью каталитически активного полирибонуклеотида, рибозима // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 3.—С. 20—23.
54. Бурьяновский Л. Н., Швед А. Д. Характеристика каталитической активности *in vitro* рибозима, специфического к *tat*-РНК вируса иммунодефицита человека типа 1 // Там же.—№ 6.—С. 69—73.
55. Бурьяновский Л. Н. Влияние рН, ионной силы и ионного состава реакционной среды на эффективность расщепления *in vitro* *tat*-РНК ВИЧ-1 рибозимом модели «головка молотка» // Там же.—1997.—13, № 1.—С. 30—35.

Надійшла до редакції 10.03.98