



НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

на правах рукопису

УДК 577.214.3-577.113.4

577.218

578.242-578.828-616

578.280

ШВЕД Анатолій Давидович

СТРУКТУРА І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІНУКЛЕОТИДНИХ
ІНГІБІТОРІВ ВІРУСНОЇ РЕПРОДУКЦІЇ (алкілованих нуклеїнових
кислот, антисенсових РНК та рибозимів).

03.00.03 - молекулярна біологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеню
доктора біологічних наук

К И Ї В - 1996

047.2
Дисертацією є рукопис

46.36.217
Роботу виконано в Інституті молекулярної біології і генетики
Національної Академії Наук України ім. В. Стефаника



00757187 (Z)

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,
член-кор. НАН України Скрипаль І.Г.
доктор біологічних наук,
професор Малюта С.С.
доктор біологічних наук,
професор Радавський Ю.Л.

Провідна організація: Київська медична академія
післядипломної освіти

Захист відбудеться 24 червня 1996 на засіданні
спеціалізованої вченої ради Д 01.86.01 в захисту
докторських дисертацій в Інституті молекулярної біології
і генетики НАН України за адресою:
252143, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України

Автореферат розіслано 21 листопада 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Л. Л. Лукаш

Актуальність проблеми. Багаторічні дослідження біологічних властивостей полінуклеотидів, як природних, так і штучно синтезованих, виявили широкий спектр їх біологічної активності в різних модельних системах, позитивних результатів було досягнуто також при клінічних випробуваннях хімічно модифікованих полінуклеотидів (Chandra P., 1979).

Обнадійливим виявилось застосування екзогенних полінуклеотидів в рішенні проблеми пошуків селективних противірусних агентів (Pitha P., 1973). Розвиток робіт в цьому напрямку стимулювали результати досліджень, які показали здатність полінуклеотидів до індукції інтерферону та прямого пригнічення вірус-специфічних ферментів нуклеїнового синтезу, до того ж вони діяли як імуноадьюванти, оскільки були здатні суттєво підвищувати опір організму вірусним інфекціям (Pitha P., 1980).

З відкриттям механізму антисенсової регуляції експресії генів та каталітичних властивостей у певних РНК, названих рибозимами, стало можливим створення молекулярних конструкцій для внутріклітинного біосинтезу антисенсових РНК (асРНК) та (або) рибозимів, здатних блокувати експресію конкретного гену-мішені. Протягом останнього десятиріччя з'явилися інформаційні та методичні умови для розробки генотерапевтичних систем, в основу яких покладено створення внутріклітинного противірусного імунітету за допомогою асРНК і рибозимів (Baltimore D., 1988; Altman S., 1993). Приймаючи участь у виконанні програми Національного Комітету боротьби із СНІД, ми також спрямували свої зусилля на надання екстракорпоральним гемопоетичним клітинам людини імунітету проти ВІЛ на основі асРНК.

Подана робота відображає результати тривалих пошуків в обраному напрямку, які не могли уникнути впливу деяких його еволюційних змін, тому викладений в дисертації матеріал відображає як відомості, одержані емпіричним шляхом початкового пе-

ріоду досліджень, так і дані більш цілеспрямованих і детально спланованих експериментів останнього часу.

Мета та завдання досліджень. Метою представленої роботи було вивчення противірусної активності нуклеїнових кислот та продуктів їх хімічної модифікації, антисенсових РНК та рибозимів.

Відповідно до поставленої мети було сформульовано такі задачі, вирішення яких здійснювали із застосуванням ряду оригінальних експериментальних підходів та широкого спектру сучасних методів молекулярної біології, вірусології та генетичної інженерії:

- 1) вивчити противірусні властивості нуклеїнових кислот рівного походження та продуктів їх модифікації тіофосфамідом;
- 2) дослідити структуру, фізико-хімічні властивості та біологічну активність алкілованих нуклеїнових кислот;
- 3) створити еукаріотичну векторну конструкцію для пригнічення репродукції ВІЛ за допомогою антисенсових РНК проти ключових генів ВІЛ tat і rev.
- 4) створити молекулярно-структурні основи рибозимної конструкції, спрямованої проти ключових генів ВІЛ tat і rev.

Наукова новизна. Виявлено інгібіторну дію ряду нуклеїнових кислот проти деяких ДНК- та РНК-геномних вірусів в експериментах *in vitro*, *in ovo* та *in vivo*. Хімічна модифікація досліджуваних препаратів поліфункціональною алкілюючою сполукою тіофосфамідом (ТіоТФФ) підсилювала їх противірусну активність. Показано, що алкіловані нуклеїнові кислоти не впливають на імунокомпетентну систему тварин і не мають відчутних мутагенних потенцій та інтерферогенних властивостей.

Досліджено фізико-хімічні властивості алкілованих ДНК рівного походження. Вперше методом електронної мікроскопії по-

казано значні структурні зміни молекул ДНК під дією тіофосфамду - утворення зшитків, шпильок, розривів та глибокої деполімерізації полінуклеотидів. Аналіз показав, що ці зміни супроводжуються зростанням вмісту в ДНК етиленімінних груп в процесі алкілювання тіофосфамідом. Його руйнівна дія на нуклеїнові кислоти призводила до втрати інфекційності ряду вірусів, що дало змогу запропонувати новий метод одержання інактивованих вірусних вакцин, захищений авторським свідоцтвом.

На основі адено-асоційованого вірусу людини створено векторну конструкцію, здатну індукувати в клітинах синтез асРНК проти ключових генів ВІЛ. Для побудови конструкції використано позбавлений енхансера власний промотор LTR ВІЛ, під контролем якого здійснюється транскрипція асРНК у відповідь на інтервенцію збудника в клітину і появу в ній вірусного білку tat, здатного багатократно підсилювати активність створеної транскрипційної одиниці. Трансфекція створеної антисенсової конструкції в гемопоетичні клітини людини забезпечувала пригнічення репродукції ВІЛ, що було підтверджено тестами на вірусний антиген p24 та наявність інфекційного вірусу. Гемопоетичні клітини людини, трансфіковані створеною конструкцією, на наш погляд, являють собою унікальну систему генної терапії СНІДу, придатну до клінічних випробувань.

В процесі вивчення чутливості ембріональних гемопоетичних клітин людини до ВІЛ-інфекції виявлено зраки в ознаках зниженої чутливості до збудника, що є першою ілюстрацією на клітинному рівні природної стійкості до вірусу індивідів, відомих як безсимптомних носіїв вірусу СНІДу.

Штучно синтезований рибозим типу "головка молотка" проявив активність в тестах *in vitro* на РНК-субстраті, що містить послідовності ключових tat- та rev-генів ВІЛ. Поєднання двох

засобів пригнічення експресії генів ВІЛ - асРНК та рибозиму - може стати, на наш погляд, відправною точкою для створення наступного покоління засобів генної терапії СНІДу.

Практична цінність роботи. Виявлене явище зниженої чутливості ембріональних гемопоетичних клітин до ВІЛ вказує на доцільність скринінгу різних джерел кровотворення людини (абортівних ембріонів, кордової крові, кісткового мозку) на чутливість до цього збудника. Це має забезпечити, по-перше, винайдення дослідницького об'єкту для вивчення механізмів і факторів природної стійкості і, по-друге, дасть можливість використовувати для трансплантацій хворим на СНІД стійкий до вірусу клітинний матеріал, додаткове забезпечення якого штучним імунітетом проти ВІЛ значно підвищить шанси пацієнтів на клінічну реабілітацію.

Створена система генної терапії СНІДу після завершення доклінічних тестів може бути використана в клініці для виробування у хворих на СНІД.

Розроблений спосіб інактивації вірусів не пов'язаний з суттєвою зміною технологічних регламентів виробництва вакцинних препаратів, отже може бути впроваджений в виробничу практику, оскільки не вимагає суттєвих матеріальних витрат і не створює значних організаційно-технічних проблем.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися на IV Міжнародному симпозиумі соціалістичних країн "Antiviral Substances" (Серед, Угорщина, 1980), на V Міжнародному симпозиумі соціалістичних країн "Antiviral Substances" (Рига, 1982), на Симпозиумі з біофізики нуклеїнових кислот і нуклеопротеїдів (Таллін, 1981), на Всесоюзній науково-практичній конференції "Профилактика природноочаговых инфекций" (Ставрополь, 1983), на VIII-й Всесоюзній нараді "Теория и практика исполь-

зовання імунитета сільськогосподарських культур к вірусним бо-
лезням" (Вільнюс, 1984), на Всесоюзній конференції з генетики
соматичних клітин (Москва, 1986), на V Українському біохіміч-
ному з'їзді (Івано-Франківськ, 1987), на Міжнародній конфе-
ренції "VII-th Symposium on Antiviral Substances", (Варна,
1987), на Першій національній науково-практичній конференції з
проблем ВІЛ/СНІД з міжнародною участю (Київ, 1995), на Треть-
ому Українському з'їзді гематологів і трансфузіологів (Суми,
1995), на Міжнародній конференції "The 3-rd International
Conference on AIDS in Asia and the Pacific" (Chiang Mai, Tai-
ланд, 1995).

Публікації. Дисертація відображає матеріали 32 наукових
публікацій, включаючи 1 авторське свідоцтво СРСР.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з
вступу, огляду літератури, трьох розділів результатів дослід-
жень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літе-
ратури. Роботу викладено на 342 сторінках машинопису. Вона
містить 18 таблиць та 37 малюнків. Список літератури включає
442 бібліографічних посилань.

Дослідження виконано з ініціативи автора та за його без-
посередньою участю в експериментах та аналізі результатів. Ок-
ремі фрагменти роботи з тестування досліджуваних препаратів
виконано при участі М.Я.Співака (Інститут мікробіології і ві-
русології НАНУ) - випробування інтерферогенної активності;
В.Г.Лісовенко (той же інститут) - аналіз впливу на імунікомпе-
тентну систему; В.Г.Краєва та Л.Ф.Діденко (той же інститут) -
випробування на моделі X-вірусу картоплі; В.Ф.Бабкіна (Укра-
їнський НДІ експериментальної ветеринарії) - тестування на мо-
делі вірусу ларинготрахеїту птахів; Т.І.Бужівської та
Ю.М.Александрова (Інститут молекулярної біології і генетики

НАНУ) - випробування мутагенної активності; С.Л.Рибалко (Київський НДІ епідеміології і інфекційних хвороб) - допомога в експериментах із збудником СНІДу.

Основні положення, що вносяться на захист.

1. Природні нуклеїнові кислоти, здатні пригнічувати репродукцію РНК- та ДНК-геномних вірусів. Хімічна модифікація нуклеїнових кислот тіофосфамідом підсилює їх противірусну активність.

2. Чутливість до ВІЛ гемопоетичних клітин від різних осіб коливається в широкому діапазоні - від надзвичайної чутливості до майже повної стійкості до інфекції.

Матеріали і методи дослідження.

В роботі було використано тіофосфамід (ТіоТЕФ) - N',N'',N'''-три (етилен)-триамід тіофосфорної кислоти - поліфункціональна алкілююча сполука, похідне етиленіміну (виробництво експериментального заводу Інституту органічної хімії АН Латв.РСР); препарати нуклеїнових кислот, виділених із різних джерел фенольно-детергентним методом. Хімічну модифікацію препаратів здійснювали згідно Росс (1964). Фізико-хімічні дослідження вихідних та алкілованих нуклеїнових кислот проводили за методами (Спирин А.С., 1959; Поверенный А.М., 1964; Margur J., 1959; Кириченко О.П., 1976; Kleinschmidt A.K., 1959; Маазин А.Л., 1975).

Випробування активності досліджуваних препаратів проводилося під шифрами:

- В - ДНК вірусу вісповакцини, ВВ - II алкіловане похідне.
- Е - ДНК сперми морського їжака, ЕЕ - II алкіловане похідне.
- Р - РНК вірусу грипу, РР - алкілована РНК вірусу грипу.

Дослідження протигрипової активності інтактних та алкілованих нуклеїнових кислот проводили на культурах клітин

HEp-2, в 11-денних курячих ембріонах та на мишах згідно Ильенко (1977). Експерименти з вірусами висповакцини та ларинготрахеїту птахів проводили на курячих ембріонах, вірусом ентериту свиней - на первинних клітинах нирки поросяти. Досліди з X-вірусом картоплі проводили на листях дурману і гомфрени, імуноферментний аналіз здійснювали за Бобковим (1983). Облік результатів та статистичну обробку даних у вірусологічних дослідженнях проводили згідно загально прийнятим методам (Практическая вирусология, 1970).

Мутагенез вивчали на мутаціях резистентності до 6-меркаптопурину в культурі фібробластів китайського хом'ячка за Бужевською (1979). Вплив досліджуваних препаратів на клітинну імунну відповідь оцінювали за реакцією гіперчутливості сповільненого типу, яку відтворювали за Lagrange (1974).

Для створення антисенсової векторної конструкції використано плазмідів HIV-CAT, pDL52-91neo та pBH10. Всі процедури з клонування виконували за традиційними протоколами (Maniatic, 1984). Етапи клонування та отримані конструкції перевірялися сиквенуванням ДНК за методом Сенгера.

Ембріональні гемопоетичні клітини одержували за методом, розробленим в Інституті кріобіології і кріомедицини НАН України (Грищенко, 1991).

Чутливість до ВІЛ-інфекції оцінювали методом імуноферментного визначення рівню вірус-специфічного антигену р24, а також інфекційного титру ВІЛ в гемопоетичних клітинах, трансфікованих антисенсовою векторною конструкцією pHIV-as-neo методом кальцій-фосфатної преципітації (Graham, 1973).

Дезоксиолігонуклеотиди, що відповідають послідовності рибозиму, синтезували на ДНК-синтезаторі DNA Assembler Special (Pharmacia, Швеція), гібридували і одержаний дуплекс клону-

вали в транскрипційному векторі pGEM-4Z (Promega). tat-фрагмент ВІЛ клонували в векторі pGEM-3Z, препаративну транскрипцію лінеаризованих ДНК-матриць проводили в стандартній безклітинній системі *in vitro*. Каталітичні властивості рибозиму випробовували в 10 мкл канонічної реакційної суміші або різних її варіантів. Продукти реакції виявляли електрофорезом в 6%-му поліакриламідному гелі, активність рибозиму визначали шляхом вимірювання черенковського випромінення вирізаних з гелю продуктів реакції.

Основні результати та їх обговорення

1. Противірусна активність нуклеїнових кислот та їх алкілованих похідних.

Згубна дія алкілюючих сполук на клітини ссавців дала поштовх для їх застосування в онкологічній практиці, де вони використовуються і по сей день. Експерименти обіцяли успіх також у використанні комплексів деяких поліфункціональних алкілюючих сполук з нуклеїновими кислотами як носіями активного протипухлинного агенту. Такий підхід застосовували і вірусологи в практиці пошуку противірусних засобів. Нуклеїнові кислоти, модифіковані різними хімічними агентами забезпечували відчутне пригнічення вірусної репродукції в різних експериментальних моделях, що втілювало оптимізм і надію на успіхи в розв'язанні проблеми противірусної боротьби. В цьому напрямку і ми спрямували свої зусилля взявши за основу нуклеїнові кислоти різного походження і тіофосфамід як поліфункціональну алкілюючу сполуку для їх модифікації.

1.1. Вивчення впливу нуклеїнових кислот на репродукцію РНК-геномних вірусів.

Результати випробувань *in vitro* на моделі вірусу грипу, наведені в табл.1, свідчать, що в культурі клі-

Таблиця 1.
Противірусна дія препаратів в культурах клітин HEp-2, інфікованих вірусом грипу А (Порт Чалмерс) 1/73.

Досліджуваний препарат			Розведення вірусу та облік результатів					
Шифр	Доза мкг/мл	Строк введення	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Статистичні дані	
							M±m	t
P	12	-6	4/4	6/2	7/1	0/8	4,25±1,60	0,87
	12	+6	7/0	6/0	6/1	0/8	2,25±1,25	2,24
P	24	-6	0/8	0/8	0/8	0/8	0	5,08*
	24	+6	0/8	0/8	0/8	0/8	0	5,0 *
PP	12	-6	3/5	0/8	3/5	0/6	1,50±1,08	3,0 *
	12	+6	4/4	0/8	0/8	0/6	1,00±0,60	3,8 *
PP	24	-6	0/8	0/8	0/8	0/7	0	5,08*
	24	+6	0/8	0/8	0/8	0/7	0	5,0 *
E	12	-6	6/1	7/0	5/2	1/6	4,75±0,80	0,87
	12	+6	4/4	6/1	3/5	0/7	3,25±0,76	2,0
E	24	-6	6/1	4/4	4/4	3/5	5,00±0,50	0,78
	24	+6	7/0	3/4	3/3	1/7	3,50±0,76	1,8
EE	12	-6	6/1	3/5	4/3	0/8	3,25±0,74	1,4
	12	+6	4/4	2/5	3/5	2/3	2,75±0,30	2,2
EE	24	-6	3/5	4/4	4/3	2/5	3,25±0,33	1,8
	24	+6	2/6	4/2	0/8	1/5	1,75±0,50	3,3 *
Контроль вірусу			8/0	8/0	7/1	1/7	6,00±1,2	
Контроль препарату			P	PP	E	EE	0	
			0/6	0/6	0/6	0/6	0	

Примітка: в чисельнику - кількість пробірочних культур в овнакми інфекції, в знаменнику - кількість пробірок без овнак інфекції; -6, +6 - строк (в годинах) введення препаратів відносно моменту зараження культури.

* - відмінності між дослідним варіантом та контролем (без препарату) статистично достовірні за t-критерієм Ст'юдента .

тин HEp-2, інфікованих вірусом грипу А (Порт Чалмерс) 1/73 в розведенні 10⁻¹ + 10⁻⁴, концентрація 24 мкг/мл середовища препарату P (інтактна РНК вірусу грипу) забезпечувала 100% пригнічення гемаглютинуючої активності при всіх інфікуючих дозах вірусу як при профілактичному (до зараження), так і при лікувальному (після зараження) внесенні його в культуру. Більш ефективним інгібітором вірусу виявився препарат алкілованої РНК (препарат PP), який вже в половинній концентрації (12мкг/мл) забезпечував пригнічення вірусної репродукції в

100% пробірочних культур, інфікованих вірусом в розведенні 10^{-2} і в 50% - при розведенні 10^{-1} . Препарат гетерологічної ДНК (E) та її алкіловане похідне (EE) в еквівалентних концентраціях на цій моделі виявилися менш ефективними.

З 18 випробуваних *in ovo* зразків нативних та модифікованих нуклеїнових кислот статистично достовірні рівні протигрипозної активності проявили дві нативні РНК і одна ДНК та 8 препаратів алкілованих нуклеїнових кислот різного походження. Активність одного з препаратів (EE) на $2,5 \log_2$ перевершувала активність протигрипозного хіміопрепарату ремантадину. Показано також, що противірусний ефект алкілованих нуклеїнових кислот статистично достовірно перевершував рівень противірусної активності алкілюючого агенту тіофосфаміду. Ця обставина 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 полінуклеотидів підсилювала їх протівірусну дію.

Випробування ряду препаратів *in vivo* проводили на мишах, чутливих до використаного штаму вірусу грипу. Інтраназальне введення 48 мкг вихідної або алкілованої РНК за 6 год до зараження забезпечувало виразний профілактичний ефект (табл.2): індекс захисту досягав 83,3 %, лікувальна дія препаратів була менш виразною (індекс захисту складав 50%). Щодо активності препаратів гетерологічної ДНК, то одержані в цій моделі показники можна розглядати лише як позитивну тенденцію, а не як достовірні результати.

На моделі вірусу гастроентериту свиней в культурі клітин досліджувані препарати зумовлювали зниження титру вірусу порівняно з контрольними культурами (без препаратів), а найбільш

Таблиця 2.

Активність препаратів нативних та алкілованих нуклеїнових кислот в дослідях на мишах, заражених вірусом грипу А(Порт Чалмерс) 1/73.

Препарат	Час введення препарату: до (-) та після (+) інфекц.	Кількість тварин в групі	Загинуло на 8-й день		Критерій Стюдента	ІЗ	Активність
			Абсолютна кількість	Середньостатистичне відхилення (M±m), %			
Р	-6 год	8	1	12,5±12,5	3,03 ^x	83,33	+++
Р	+6 "-	8	3	37,5±18,3	1,53	50,0	++
Р	0 "-	8	5	62,5±18,3	0,50	10,0	-
РР	-6 "-	8	1	12,5±12,5	3,03 ^x	83,33	+++
РР	+6 "-	8	5	62,5±18,3	0,50	10	-
РР	0 "-	8	3	37,5±18,3	1,53	50,0	++
Е	-6 "-	7	3	42,9±20,2	1,23	42,5	++
Е	+6 "-	8	5	62,5±18,3	0,50	10,0	-
Е	0 "-	8	4	50,0±18,9	1,00	33,3	+
ЕЕ	-6 "-	8	2	25,0±16,37	2,16	66,7	+++
ЕЕ	+6 "-	8	5	62,5±18,3	0,50	10,0	-
ЕЕ	0 "-	8	5	62,5±18,3	0,50	10,0	-
Контроль		8	6	75,0±16,37	-	-	-

Примітка: x-Відмінності між дослідом і контролем статистично достовірні.

активними в цій моделі виявилася алкілована РНК вірусу грипу (препарат РР), вихідна ДНК вірусу вісповакцини та алкілована ДНК із сперми морського їжака, які знижували врожай вірусу на 2,5-3,0 lg.

Результати вивчення дії ТіоТЕФ на інфекційність Х-вірусу картоплі показали, що через три години після початку алкілювання інфекційність вірусу значно знижувалася і складала біля 9% вихідної. Некрови, спричинені алкілованим вірусом на листях томфрени, були дрібнішими (0,2-0,4 мм в діаметрі) за такі (1,0-1,5 мм) при інокуляції рослин нативним вірусом. Після 6 годин алкілювання вірус повністю втрачав інфекційні властивості.

Дослідами в "імунізації" рослин дурману встановлено, що на листях рослин, інокульованих інактивованим ХВК (аХВК) одно-

часно із зараженням нативним ХБК та за 24, 48 і 72 години до зараження, через 6-7 діб виникали симптоми, схожі на типові ураження досліджуваним вірусом, але здавалися менш виразними. Імуноферментним методом вірус в цих рослинах виявляли через 4 дні після інфекції. На листях дурману, оброблених аХБК за 6 і 10 днів до інфікування інтактним вірусом, через 6-7 діб з'являлися дрібні жовті (хлоротичні) плями, які пізніше перетворювалися в локальні крапкові некрози 0,2-0,3 мм в діаметрі. Ці некрози не збільшувалися в діаметрі в перебігом інфекційного процесу, не наставало й відмирання листя. Імуноферментним аналізом в цих експериментах виявлено також значно нижчий вміст інфекційного вірусу в оброблених аХБК рослинах дурману, ніж в необроблених листях в контролі.

Поряд з кількісним визначенням вірусу в екстрактах в листових пластинок дурману в тих же екстрактах встановлювали наявність інфекційних вірусних часток. Результати титрування на листях гомфрени показали, що в листях дурману, оброблених препаратами вихідної (ХРНК) або алкілованої (аХРНК) РНК ХБК за 24 год до зараження вірусом, інфекційний титр був нижчим, ніж в контролі, а в листях, заражених через 48 годин після інкубації в досліджуваними препаратами РНК, інфекційний вірус встановлювали методами детекції не виявлявся (табл.3).

Одержані результати дозволяють припустити, що нативна і модифікована тіофосамідом РНК ХБК є ефективними індукторами противірусної резистентності. Індукція стійкості була найбільш виражена на 2-3 день після контакту індикаторних рослин з досліджуваними препаратами. Інкубація рослин з інактивованим Тіо-ТЕФ вірусом також призводила до пригнічення репродукції нативного ХБК, проте цей ефект був менш виразним і проявлявся в більш пізні строки (через 7-10 днів) після "імунізації". Сут-

Таблиця 3.

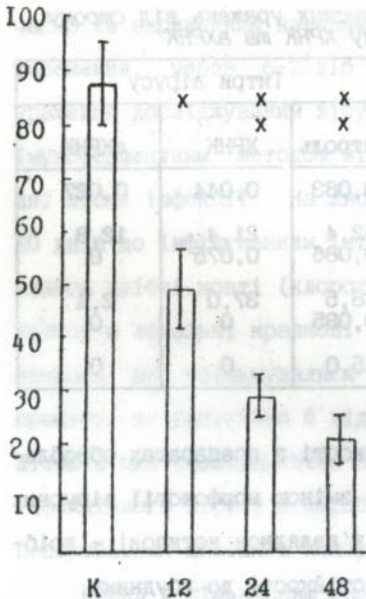
Залежність пригнічення розвитку вірусних уражень від строку індукування стійкості рослин дурману ХРНК та аХРНК

Час після індукування стійкості в год.	Вид титрування на один лист	Титри вірусу		
		Контроль	ХРНК	аХРНК
8	ІФА-тест, (γ/мл) Інфекційний	0,083	0,044	0,027
24	(некрози на лист)	52,4	21,4	12,8
	ІФА-тест, (γ/мл) Інфекційний	0,086	0,075	0
48	(некрози на лист)	48,6	37,0	2,4
	ІФА-тест, (γ/мл) Інфекційний	0,085	0	0
	(некрози на лист)	45,0	0	0

тево, що прояв залишкової інфекційності в препаратах обробленого тіофосфамідом ХБК відзначався зміною морфології вірусних уражень - зникали крупні некрози і з'являлися нетипові - дрібні, що свідчить про появу місцевої стійкості до збуднику.

Подібні ж результати одержано й іншими дослідниками (Gicherman G., 1968), що вивчали індукцію стійкості рослин до вірусних інфекцій. Напевне, застосовані в наших дослідах нуклеїнові кислоти індукували в рослинах противірусну резистентність, під тиском якої відбувалася селекція збудника з відмінними патогенними властивостями, що проявлялося в зміні морфології вірусних уражень.

1.2. Вивчення впливу нуклеїнових кислот на репродукцію ДНК-геомічних вірусів. На моделі вірусу вісповакцини показано, що адкіловане похідне гомологічної ДНК (препарат ВВ) забезпечувало достовірне і залежне від концентрації пригнічення утворення віспин на хоріон-алантоїсних оболонках (ХАО) курячих ембріонів (маж.1) при введенні його в ембріони до зараження вірусом. При введенні препарату одночасно з зараженням або після нього інтенсивність репродукції вірусу залишалася на рівні контролю.



Мал. 1. Репродукція вірусу вісповакцини в курячих ембріонах, інфікованих через 6 год після введення препарату ВВ.

По вісі ординат - кількість вірусин на ХАО, по вісі абсцис - концентраційні варіанти препарату в мкг на ембріон.

К - без препарату (контроль).

Рівні значущості відмін по відношенню до контролю:

x - $P < 0,01$; xx - $P < 0,001$.

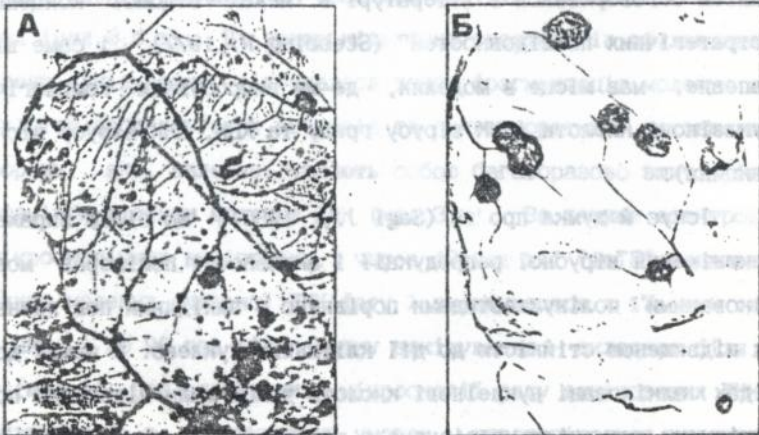
ДНК із сперми морського їжака (препарат Е) та її хімічно модифіковане похідне (препарат ЕЕ) забезпечували порівнювальні рівні пригнічення репродукції вірусу вісповакцини, однак в цьому випадку не спостерігалось такої чіткої залежності ефекту від концентрації препарату, як в попередньому досліді.

Препарат ЕЕ в концентрації 100 мкг/мл середовища проявив виразний ефект пригнічення також на моделі герпесвірусу павіанів, асоційованого з клітинами ЛУТ-4. Імунофлуоресцентним тестом встановлено, що після добового контакту з препаратом кількість клітин, що утримували цитоплазматичний вірусний антиген, зменшувалася принаймні в 2 рази, а культуральне середовище, в якому клітини перебували протягом 72 год в контакт з препаратом ЕЕ, не містило вірусу, здатного трансформувати донорні лімфоцити павіана.

Три препарати тваринного походження (дві алкіловані ДНК і одна РНК) достовірно і приблизно рівною мірою пригнічували та-

кож репродукцію вірусу інфекційного ларинготрахеїту птахів. Крім виявленого в цій моделі противірусного ефекту хімічно модифікованих нуклеїнових кислот, суттєвим можна вважати те, що даний штам вірусу ларинготрахеїту птахів є, напевне, гетерогенною популяцією, дрібнобляшковий варіант якої більш чутливий до інгібуючої дії досліджуваних препаратів. Так, при аналізі морфології вірусних уражень ХАО було відмічено, що при крайніх розведеннях вірусу, коли в ембріонах ще спостерігалися ознаки інфекції, замість типових для досліджуваного вірусу дрібних бляшок (мал.2,а) з'являлися суттєво крупніші бляшки (мал.2,б).

Звичайно, складає інтерес питання про вірулентні та імуногенні властивості кожного з варіантів. Можливо якийсь із них став би в пригоді в розв'язанні проблеми одержання ефективних вакцинних препаратів, однак вирішення цього питання потребує спеціальних досліджень.



Мал.2. Ділянки ХАО в курячих ембріонів, інфікованих вірусом ларинготрахеїту птахів (в розведенні 10^{-4}). а - оболонка контрольного ембріону, інфікованого без введення препарату. Видно багато дрібних бляшок, рідко - більш крупні. б - оболонка ембріону, інфікованого після введення препарату експонованої ДНК. Видно крупні бляшки, дрібні бляшки відсутні.

Щодо механізму противірусної дії випробуваних нами нуклеїнових кислот та їх алкілованих похідних, то можна стверджувати, що відмічені нами ефекти не пов'язані з індукцією інтерферону, оскільки дослідями було доведено відсутність у них інтерферогенної активності в культурах клітин.

Найбільш вірогідні припущення, на нашу думку, можна пов'язати з уявленням про здатність екзогенних полінуклеотидів до функціонального блоку ферментів нуклеїнового синтезу. Ця гіпотеза визнається (Pitha P., 1980) як найбільш експериментально обгрунтована: екзогенні полінуклеотиди можуть або конкурувати в природню 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" (Stebbing N., 1977), і саме він, напевне, мав місце в моделях, де ми випробували гомологічні нуклеїнові кислоти (РНК вірусу грипу та ХВК, ДНК вірусу висповакцини).

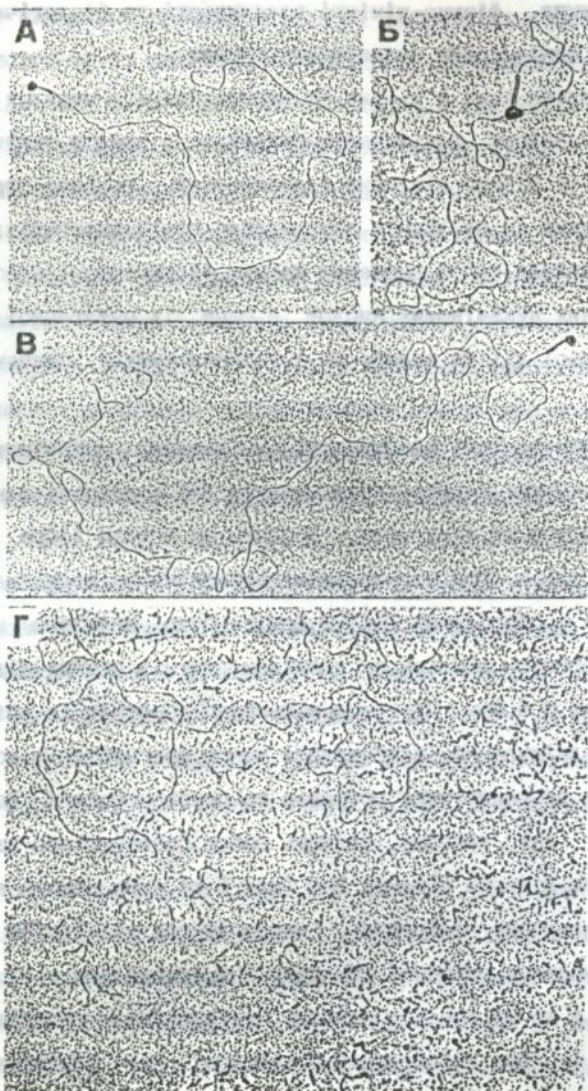
Існує й думка про те (Sagi J., 1980), що більш виражене пригнічення вірусної репродукції і активності полімераз модифікованими полінуклеотидами порівняно з вихідними пов'язане з їх підвищеною стійкістю до дії клітинних нуклеаз. В наших дослідях алкіловані нуклеїнові кислоти також мали підвищену противірусну активність порівняно з вихідними, їх вплив на імункомпетентну систему тварин мав ту ж тенденцію. Отже, одержані дані, вірогідно, також можна пов'язувати з підвищеною стійкістю модифікованих полінуклеотидів до клітинних нуклеаз.

2. Структура, фізико-хімічні властивості та біологічна активність алкілованих нуклеїнових кислот.

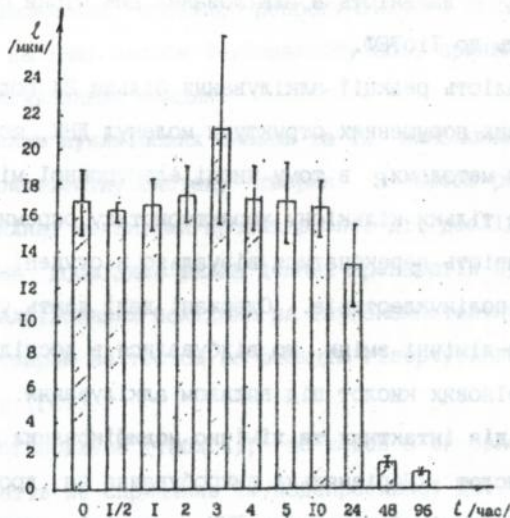
Виявлена нами в різних експериментальних моделях протівірусна активність алкілованих нуклеїнових кислот викликала інтерес до їх фізико-хімічних властивостей, зокрема структурних змін молекул як наслідків алкілування полінуклеотидів. Важливим ми вважали також вивчення деяких біологічних властивостей алкілованих нуклеїнових кислот, а саме, їх мутагенної і інтерферогенної дії та впливу на імунокомпетентну систему організму.

2.1. Фізико-хімічні властивості алкілованих нуклеїнових кислот. Структурні перетворення молекул ДНК в процесі алкілування тіофосфамідом ми проводили, обравши за модель добре вивчений об'єкт - фаг λ . При електронномікроскопічному дослідженні ДНК, виділеної з оброблених TiO_2TEF фарів було виявлено наявність різного розміру шпильок як наслідок зшитків різних ділянок молекул (мал.3,б,в). Ці явища кількісно зростали із збільшенням ступеню алкілування, відбувалася також фрагментація молекул як результат дволанцюгових розривів та поява коротких потовщених утворень, які, напевне, являють собою багаторазово зшиті тіофосфамідом ділянки молекул ДНК (мал.3,г). За даними електронномікроскопічних вимірювань, через 48 год дії TiO_2TEF модальна довжина молекул очищеної ДНК фагу λ зменшувалася з 17 мкм до 1,5 мкм, а до 96 год від початку алкілування - складала біля 1 мкм (мал.4). При електронній мікроскопії ряду алкілованих ДНК, препаратіваних в денатуруючих умовах, спостерігалися численні зшитки між ланцюгами молекул, що розкрутилися в процесі денатурації.

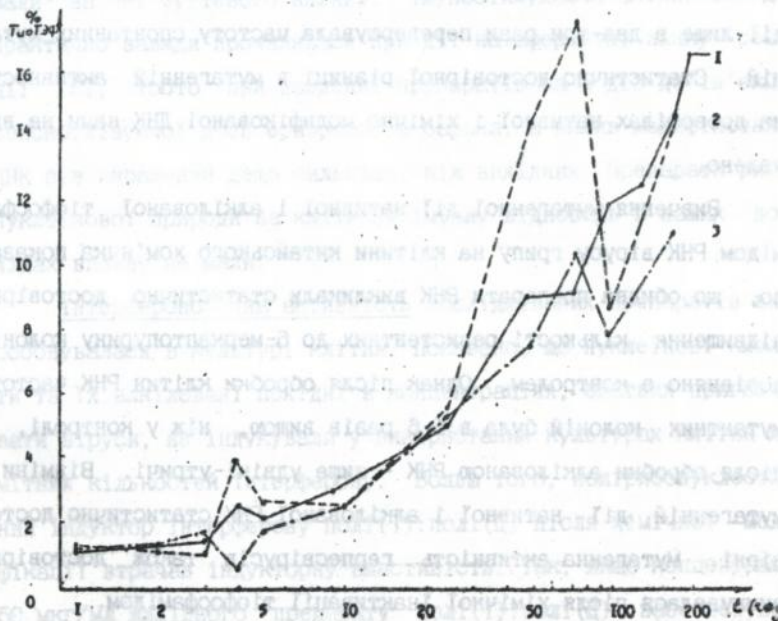
Дослідження динаміки алкілування трьох різних ДНК показало (мал.5) поступове накопичення в них етиленімінних груп в



Мал. 3. Електронна мікроскопія ДНК фагу λ : а - нативна ДНК в інтактного фагу; б, в - утворення шпильок в молекулах помірно алкілованої ДНК; г - ДНК в високому ступені алкілування. Збільшення: а, в - 25 000х; б - 50 000х; г - 37 500х.



Мал. 4. Залежність довжини молекул ДНК фагу λ від тривалості адгезивування (показано 95%-ний довірчий інтервал).



Мал. 5. Динаміка вмісту етиленімінних груп в араках ДНК в процесі адгезивування: 1 - лосося; 2 - фагу λ ; 3 - *B. subtilis*.

процесі реакції, а наявність в алкілованих ДНК сірки свідчила про їх належність до ТіоТЕФ.

Отже, тривалість реакції алкілування більше 24 год позначалася на суттєвих порушеннях структури молекул ДНК, що реєструвалися різними методами, в тому числі електронної мікроскопії, яка дала не тільки кількісну характеристику окремих молекул, але й можливість переконатися візуально в ступені руйнування структури полінуклеотидів. Одержані дані дають уявлення про деякі фізико-хімічні зміни, що відбувалися в досліджуваних препаратах нуклеїнових кислот під впливом алкілування.

2.2. Мутагенна дія інтактних та хімічно модифікованих вірусів і нуклеїнових кислот. Порівняльні випробування на дрозофілах показали, що як вихідні препарати ДНК, так і їх алкіловані похідні є слабкими мутагенами: частота появи мутацій при їх дії лише в два-три рази перевершувала частоту спонтанних мутацій. Статистично достовірної різниці в мутагенній активності на дрозофілах нативної і хімічно модифікованої ДНК нами не виявлено.

Вивчення мутагенної дії нативної і алкілованої тіофосфамідом РНК вірусу грипу на клітини китайського хом'ячка показало, що обидва препарати РНК викликали статистично достовірне підвищення кількості резистентних до 6-меркаптопурина колоній порівняно з контролем. Однак після обробки клітин РНК частота мутантних колоній була в 5-6 разів вищою, ніж у контролі, а після обробки алкілованою РНК - лише удвічі-утричі. Відміни в мутагенній дії нативної і алкілованої РНК статистично достовірні. Мутагенна активність герпесвірусів також достовірно знижувалася після хімічної інактивації тіофосфамідом.

Одержані відомості могли б застерегти медичних працівників від використання живих вірусних вакцин у певного контин-

генту населення, особливо репродуктивного віку, коли вибір падав би на інші засоби імунозахисту або, принаймні, використання інактивованих вакцин.

2.3. Вплив нуклеїнових кислот та їх алкілованих похідних на імунокомпетентну систему тварин. З метою розширення уявлень про можливі механізми противірусної дії досліджуваних препаратів, ми дослідили вплив деяких препаратів нуклеїнових кислот та їх алкілованих похідних на імунокомпетентну систему організму тварин за тестом на реакцію гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ).

Встановлено (табл.4), що жоден з використаних в досліді препаратів не спричиняв імунодепресивної дії. В 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 сенсibiliзуючої дози еритроцитів барана, а вплив модифікованих ДНК був виражений дещо сильніше, ніж вихідних. Препарати рибонуклеїнової природи на клітинну імунну відповідь в наших досліді впливу не мали.

Інтерферогенна активність досліджуваних препаратів випробовувалася в культурі клітин. Показано, що нуклеїнові кислоти та їх алкіловані похідні в концентраціях, здатних пригнічувати віруси, не індукували у використаних культурах клітин помітних кількостей інтерферону. Більш того, полірибонуклеотидний індуктор інтерферону полі(І):полі(Ц) після хімічної модифікації втрачав індукторну властивість. Так, якщо концентрація 50 мкг/мл вихідного препарату полі(І):полі(Ц) забезпечувала індукцію антивірусної активності культуральної рідини при розведенні 1:64, то при використанні тієї ж концентрації продукту

Таблиця 4.

Вплив препаратів нативних і модифікованих нуклеїнових кислот на реакцію ГСТ у мишей.

Ін'єкований матеріал		Реакція ГСТ, мм			
нативний	модифікований	А		В	
		($X \pm m$)	P	($X \pm m$)	P
1	2	3	4	5	6
ДИ	аДИ	0,60 + 0,0857	>0,05	0,52 + 0,0400	>0,05
		0,53 ± 0,0330	>0,05	0,48 ± 0,0273	>0,05
ДИ2	аДИ2	0,68 + 0,0600	<0,01*	0,52 + 0,0163	>0,05
		0,70 ± 0,0514	<0,01*	0,55 ± 0,0502	>0,05
О6	оО6	0,60 + 0,0261	<0,05*	0,48 + 0,0477	>0,05
		0,62 ± 0,0751	>0,05	0,52 ± 0,0310	>0,05
Д7	аД7	0,68 + 0,060	<0,01*	0,48 + 0,0400	>0,05
		0,67 ± 0,061	<0,05*	0,60 ± 0,0632	>0,05
ДИ3	аДИ3	0,67 + 0,0306	<0,01*	0,5 + 0,0363	>0,05
		0,68 ± 0,0400	<0,01*	0,65 ± 0,0342	<0,01*
О2	оО2	0,61 + 0,0305	>0,05	Нема відомостей	"
		0,8 ± 0,0456	<0,01*		
О3	оО3	0,48 + 0,0249	>0,05	"	"
		0,51 ± 0,0277	>0,05		
Д4	аД4	0,46 + 0,0217	>0,05	"	"
		0,46 ± 0,0160	>0,05		
Е	ЕЕ	0,5 + 0,0452	>0,05	"	"
		0,54 ± 0,1770	>0,05		
В	ВВ	0,53 + 0,0491	>0,05	"	"
		0,5 ± 0,0413	>0,05		
Контроль (фізрозчин)		0,5. ± 0,0296	-	0,5 ± 0,0296	-

Примітка. А - препарати вводили за 5 днів до сенсibilізуючої дози еритроцитів; В - препарати вводили одночасно з сенсibilізуючою дозою. * - відмінності достовірні.

хімічної модифікації цього препарату аналогічний ефект культуральної рідини спостерігався при розведенні 1:4, тобто титр інтерферону в цьому разі був на 4 log₂ нижчим.

Ці дослідження підтвердили дані інших авторів про непричетність інтерферону до механізму противірусної дії екзогенних

природних і синтетичних полінуклеотидів та продуктів їх хімічної модифікації і дозволило зробити висновок, що в механізмі антивірусної дії досліджуваних нами препаратів індукція інтерферону також помітної ролі не виконує.

2.4. Розробка способу інактивації вірусних препаратів за допомогою тіофосфаміду. Результати вивчення алкілюючої дії похідних етиленіміну як в наших дослідженнях, так і за даними інших авторів (Лавлес А., 1970; Singer B., 1975) показали, що наслідки такої дії на бактерії, віруси, фаги насамперед обумовлені руйнівним впливом на нуклеїнові кислоти, що навело нас на думку про можливість використання алкілюючих властивостей ТіоТЕФ для одержання інактивованих вірусних вакцин. Експерименти на моделях вірусу грипу штаму *A/Вікторія /35/72/50* та його варіанту *2/1-Вікторія* і герпесвірусів I та II типів стали основою розробки способу одержання вірусних антигенів.

Дослідження показали, що інактивовані за розробленим способом герпесвіруси при пасажах на культурах фібробластів курячих ембріонів і внутрішньомозковому зараженні мишей були не інфекційними і стимулювали утворення достатнього рівню специфічних вірус-нейтралізуючих антитіл. В реакції нейтралізації сироватки тварин, імунізованих інактивованими герпесвірусами, забезпечували індекс нейтралізації 2,5-3,0 lg (табл.5), тобто

Таблиця 5.
Порівняльна активність герпетичних вакцин, інактивованих формаліном та тіофосфамідом.

N досліджу	Тип, штаму вірусу	Індекс нейтралізації при способах інактивації (lg)	
		Формаліном ТЦД ₅₀ /1,0 мл	Тіофосфамідом ТЦД ₅₀ /1,0 мл
1	Л2	2,5	2,5
2	УС	2,25	2,25
3	Л2	2,0	2,0
	УС	2,5	3,0
4	Л2	3,0	3,0

Таблиця 6.

Рівень антигемаглютинінів в сироватках мишей, імунованих живими та інактивованими вакцинами вірусу грипу А/Вікторія /35/72/50 та його варіанту 2/1-Вікторія

Матеріал для імунізації	Рівень антигемаглютинінів до вірусів			
	А/Вікторія/35/72/50		2/1-Вікторія	
	Зворотна величина титру	Значення в \log_2	Зворотна величина титру	Значення в \log_2
А/Вікторія/35/75/50 живий	60	5,92±0,38	64	5,97±0,26
А/Вікторія/35/75/50 убитий	91	6,25±0,30	80	6,32±0,36
2/1-Вікторія живий	147	7,17±0,25	138	7,10±0,39
2/1-Вікторія убитий	84	6,37±0,27	112	6,79±0,25

не відрізнялися від вакцин, інактивованих формаліном за виробничим регламентом.

Інактивація за розробленим способом вірусу грипу, забезпечувала повну втрату його інфекційності, а випробування сироваток крові імунованих тварин в реакції гальмування гемаглютинації показало (табл.6), що імуногенність вірусу грипу в результаті інактивації суттєво не змінювалася. При електронномікроскопічному аналізі віріони в інактивованих зразків за структурою також не відрізнялися від вихідних.

Таким чином, спосіб інактивації в запропонованому режимі забезпечував повну інактивацію вірусів грипу I та II типів при збереженні їх імуногенних властивостей.

3. Дослідження противірусної активності антисенсових РНК та рибозиму.

Геннотерапевтичний підхід до лікування СНІДу спирається на введену в 1988 році Валтімором концепцію "внутріклітинної імунізації", діючим інструментом якої слугуватимуть антисенсові РНК та рибозими. Для досягнення сталої реконституції іму-

ної системи хворих на СНІД було запропоновано використання стовбурових гемопоетичних клітин, трансдукованих генетичними конструкціями, здатними створювати стан внутріклітинного імунітету проти ВІЛ. Стовбурові клітини дають початок всім різновидам клітин крові, мозковим макрофагам і клітинам мікроглії, тому трансфузія генетично змінених стовбурових клітин може забезпечити сталу репопуляцію всіх клітин імунної системи хворого імунізованими проти ВІЛ попередниками кровотворення. Нижче викладено дані з випробування створеної нами системи генної терапії СНІДу з використанням внутріклітинно імунізованих гемопоетичних клітин ембріону людини.

3.1. Створення та випробування антисенсової векторної конструкції проти збудника СНІДу. Вибір мішені в геномі ВІЛ для антисенсового впливу проводили у відповідності із стратегією, що вироблена за роки досвіду використання асРНК для пригнічення репродукції вірусів. З урахуванням даних аналізу молекулярно-генетичних основ реалізації геному ВІЛ-1 ми вирішили обрати за мішень ділянку 1-го екзону Tat^{Rev}, який найбільше відповідає поставленій меті оскільки кодує важливі для репродукції вірусу регуляторні білки та ключові генетичні сигнали, а його послідовність високо консервативна серед багатьох проаналізованих ізолятів ВІЛ.

Наступним кроком у створенні анти-ВІЛ векторної конструкції був вибір промотору, здатного направляти синтез асРНК у відповідь на проникнення збудника в клітину. Це можливо, якщо синтез асРНК спрямовуватиметься промотором ВІЛ, який індукується ранніми продуктами вірусного геному, а саме трансактиватором Tat. Виходячи з цих міркувань, ми використали власну транскрипційну систему ВІЛ, видаливши в неї послідовності енансеру та негативних регуляторів транскрипції, в яких перші

можуть впливати на нижче розташовані гени клітини, останні - ускладнюють експресію генів під контролем LTR ВІЛ і обумовлюють їх залежність від умов клітини-хазяїна.

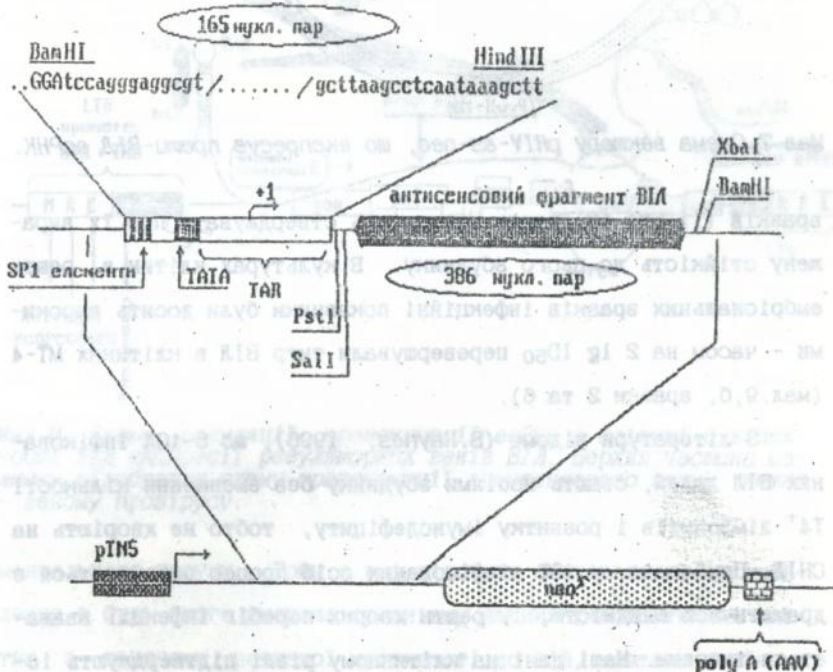
Шляхом реконструкції LTR було створено новий сайт рестрикції Bam HI між енхансером та Sp-1 елементами промотору ВІЛ-1. Для цього був синтезований олігонуклеотидний праймер, комплементарний Sp-1 транскрипційним сигналам, який містив також послідовність сайту рестрикції Bam HI на 5'-кінці. Другий праймер був комплементарний U5-області LTR ВІЛ-1 нижче TAR-елементу та сайту рестрикції Hind III. З продукту полімеразної ампліфікації ДНК довжиною 215 п.н. було виділено BamHI-Hind III фрагмент довжиною 165 п.н., очищено в поліакриламідному гелі, та клоновано в полілінкер плазмиди pUC19. Сиквенс клонованого фрагменту показав, що його послідовність відповідає транскрипційній одиниці ВІЛ в TATA-боксом, основними елементами ініціації транскрипції SP-1, та TAR-елементом (мал.6).

У виборі еукаріотичного вектору ми зупинилися на аде-но-асоційованому вірусі (AAB) людини, переваги і привабливі властивості якого (повна нешкідливість для людини, достатня векторна ємкість, здатність до інтеграції в певний локус 19-ї хромосоми та ін.) широко висвітлені в публікаціях останнього десятиріччя.

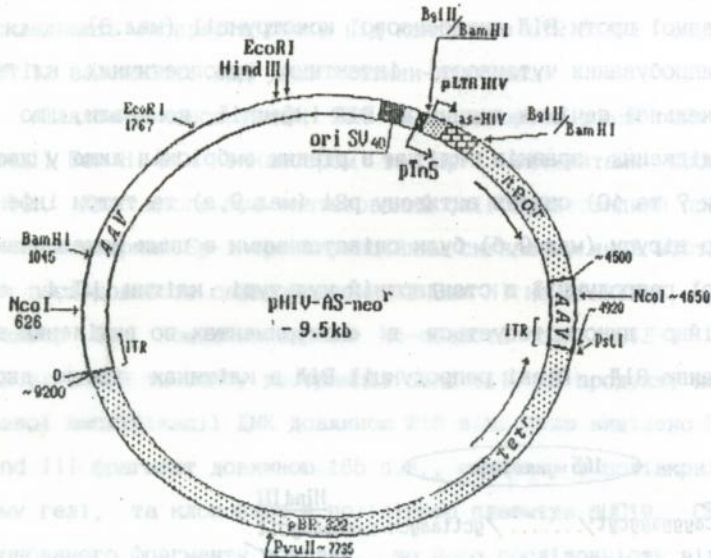
Створена антисенсова конструкція *pHIV-as-neo* представлена на мал.7. Основою молекулярного вектору є генوم AAB, в який на місце генів структурних білків клоновано селективний ген *neo^r* та ВІЛ-антисенсовий ген. Транскрипція асРНК в цієї конструкції здійснюється власним промотором ВІЛ-1, а наявність TAR-елементу дозволяє багатократне підвищення транскрипції у відповідь на появу в клітині ВІЛ-специфічного регуляторного білку Tat. Таким чином, в створеній конструкції втілено ідею зворотного

зв'язку між вірусною інтервенцією і функціональною активністю спрямованої проти ВІЛ антисенсової конструкції (мал.8).

Випробування чутливості інтактних гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини до ВІЛ-інфекції показали, що з 25 досліджених зразків клітин з різних ембріонів лише у двох (зразки 7 та 10) синтез антигену р24 (мал.9,а) та титри інфекційного вірусу (мал.9,б) були співставимими з цими показниками вірусної репродукції в стандартній культурі клітин МТ-4, що традиційно використовується в експериментах по виділенню та титруванню ВІЛ. Рівні репродукції ВІЛ в клітинах інших двох



Мал.6. Транскрипційна одиниця створеного антисенсового гену. 165-нуклеотидний фрагмент - безвхансерний промотор LTR ВІЛ-1 в сайтах зв'язування транскрипційних факторів SP-1, TATA-боксом та TAR-елементом промотору ВІЛ; +1 - старт транскрипції; 386-нуклеотидний фрагмент - послідовність геному ВІЛ, клонувана в антисенсовій орієнтації відносно промотору ВІЛ.

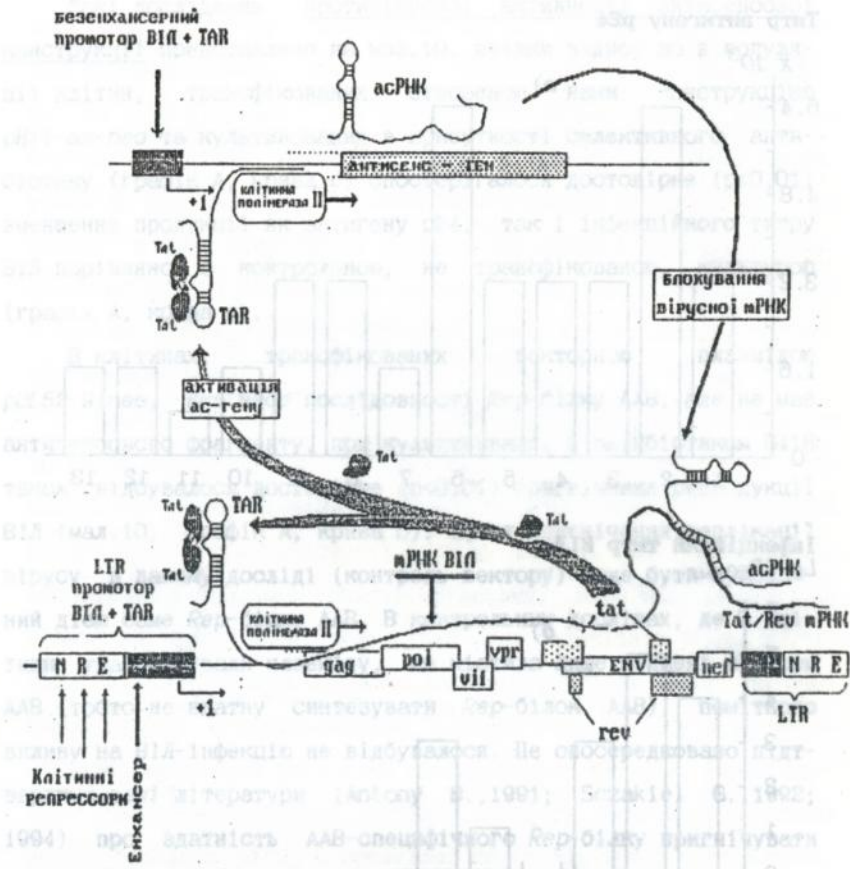


Мал. 7. Схеми вектору pHIU-AS-neo^r, що експресує проти-ВІЛ асРНК.

зразків (11 та 12) дають можливість стверджувати про їх виражену стійкість до цього збуднику. В культурах клітин з решти ембріональних зразків інфекційні показники були досить високими - часом на 2 lg ID₅₀ перевершували титр ВІЛ в клітинах МТ-4 (мал. 9,б, зразки 2 та 6).

З літератури відомо (В. Nauney, 1996), що 5-10% інфікованих ВІЛ людей, стають носіями збуднику без зменшення кількості Т4⁺ лімфоцитів і розвитку імунодефіциту, тобто не хворіють на СНІД. Приблизно у 10% інфікованих осіб процес розвивається в драматичною швидкістю, у решти хворих перебіг інфекції вважається типовим. Наші дані на клітинному рівні підтверджують існування природних механізмів стійкості до ВІЛ-інфекції.

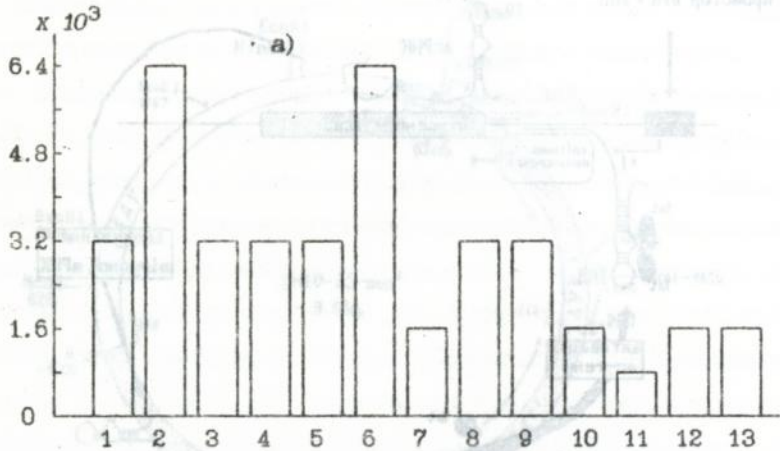
Несприйнятливість до ВІЛ-інфекції залишається нев'ясованою проблемою, до якої лише ледь визначилися підходи експери-



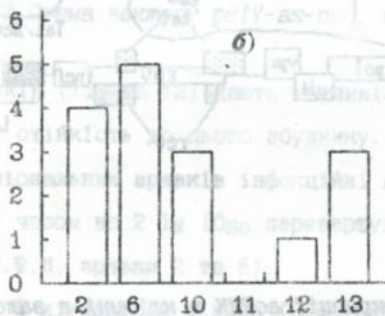
Мал.8. Схема регуляції транскрипції асРНК в клітині в залежності від експресії регуляторних генів ВІЛ. Верхня частина малюнку відображає схему транскрипції антісенсового гену, нижня - геному вірусу.

ментального пошуку. Тому є всі підстави сподіватися, що виявлення в 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

Титр антигену р24



Інфекційний титр ВІЛ,
Lg ID₅₀/мл



Мал. 9. Репродукція ВІЛ-1 в гемопоетичних клітинах ембріональної печінки людини: 1-12 - номери культур в різних ембріонів; 13 - клітини лінії МТ-4. Для ілюстрації наведено типові дані.

гемопоетичних клітин могли б сприяти реконституції імунної системи організму 1, в такий спосіб, значною мірою полегшити долю хворих на СНІД, а додаткове забезпечення таких клітин штучним внутріклітинним імунітетом проти ВІЛ суттєво підвищуватиме шанси хворих на видужання або, принаймні, віддалення фатального кінця.

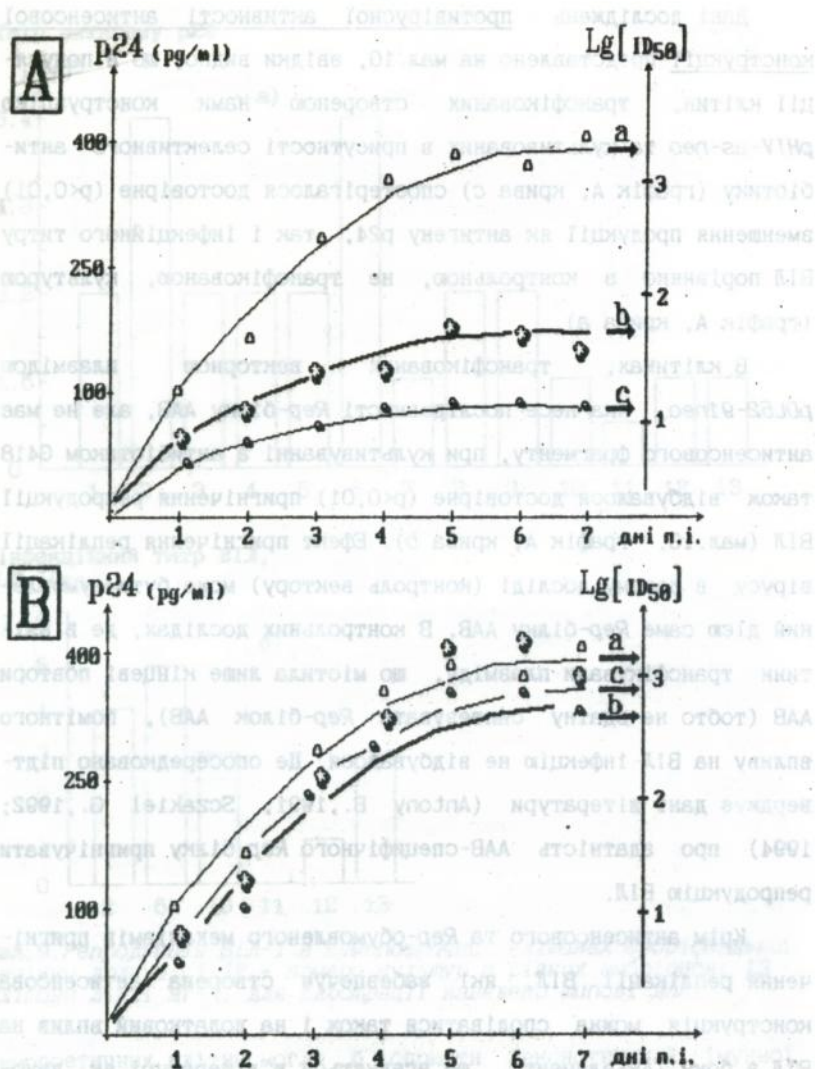
Інфекції ВІЛ од хворих на СНІД к клітині 6 .Інфекції

Дані досліджень протівірусної активності антисенсової конструкції представлено на мал.10, звідки видно, що в популяції клітин, трансфікованих створеною нами конструкцією *pHIV-as-neo* та культивованих в присутності селективного антибіотику (графік А, крива с) спостерігалось достовірне ($p < 0,01$) зменшення продукції як антигену p24, так і інфекційного титру ВІЛ порівняно з контрольною, не трансфікованою, культурою (графік А, крива а).

В клітинах, трансфікованих векторною плазмідом *pDL52-91neo*, яка несе послідовності *Rep*-білку ААВ, але не має антисенсового фрагменту, при культивуванні з антибіотиком G418 також відбувалося достовірне ($p < 0,01$) пригнічення репродукції ВІЛ (мал.10, графік А, крива b). Ефект пригнічення реплікації вірусу в даному досліді (контроль вектору) може бути зумовлений дією саме *Rep*-білку ААВ. В контрольних дослідях, де в клітини трансфікували плазмиду, що містила лише кінцеві повтори ААВ (тобто не здатну синтезувати *Rep*-білок ААВ), помітного впливу на ВІЛ-інфекцію не відбувалося. Це опосередковано підтверджує дані літератури (Antony B.,1991; Sczakiel G.,1992; 1994) про здатність ААВ-специфічного *Rep*-білку пригнічувати репродукцію ВІЛ.

Крім антисенсового та *Rep*-обумовленого механізмів пригнічення реплікації ВІЛ, які забезпечує створена антисенсова конструкція, 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 (B.Sullenger,1990).

В трансфікованих клітинах, в разі культивування без селективного антибіотику G-418, помітного пригнічення вірусної репродукції не відбувалося (мал.10,В). Це зумовлено тим, що



Мал.10. Вплив антисенсової векторної конструкції на репродукцію ВІЛ в гемопоетичних клітинах. А - в присутності антибіотику; В - без антибіотику.

а - не трансформовані клітини;
 б - клітини, трансформовані векторною конструкцією pDL52-91neo;
 с - клітини, трансформовані антисенсовою векторною конструкцією pNIV-as-neo.

лише 3-5% популяції інфікованих клітин забезпечені антисенсовим внутріклітинним імунітетом. Більша частина клітин популяції не трансфікована, і у відсутності антиметаболіту зберігає нормальний рівень життєздатності, а відтак і звичайну чутливість до ВІЛ-інфекції. В умовах селективного тиску клітини, що несуть в собі антисенсову конструкцію разом з геном стійкості до антибіотику, залишаються життєздатними, але репродукція ВІЛ в них заблокована асРНК, тоді як у решти клітин нормальний поділ припиняється.

Враховуючи досягнуті позитивні результати по пригніченню *in vitro* реплікації ВІЛ в гемопоетичних клітинах людини, що несуть в собі антисенсові векторні конструкції, є підстава очікувати, що при трансфузії хворому на СНІД вони візьмуть 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, контрольованого, інфекційного процесу в організмі відбуватиметься наробітка противірусних антитіл, 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. Підтвердити (або спростувати) висловлені вище припущення можуть результати клінічних випробувань створеної системи генної терапії СНІДу.

Таким чином, розробка молекулярної векторної конструкції для створення штучного внутріклітинного імунітету проти ВІЛ досягла поставленої мети: в трансфікованій нею популяції клітин спостерігалось суттєве пригнічення репродукції збудника СНІДу. Досягнуті результати дають право стверджувати, що на основі гемопоетичних клітин людини створено систему генної те-

Продукти реакції не виявлялися в цих умовах і при суттєвому збільшенні тривалості інкубації (2 год при 50°C або 14 год при 34°C). Відсутність каталітичної активності рибозиму, поряд з іншим, могла бути обумовлена і тим, що послідовність ділянок рибозиму, комплементарних субстратній РНК, - в сумі вона складала 16 н.о. - була занадто короткою для підтримки комплементарної структури при підвищених температурах. Однак, ні при 34°C, ні при 20°C нам не вдалося виявити каталітичної активності рибозиму в канонічних реакційних умовах.

Додавання в реакційну суміш моновалентних катіонів (калію хлориду, калію ацетату) в фізіологічних концентраціях (100-300 мМ) призводило до активізації каталітичної здатності рибозиму, і при 8-кратному надлишку рибозимної РНК по відношенню до РНК-субстрату ефективність реакції складала біля 10% (мал.12, доріжка 2). Додавання спермідину в концентраціях 1-5 мМ при тих же умовах призводило до аналогічного результату. Спільне додавання в реакційну суміш моновалентних катіонів і спермідину збільшувало вдвічі ефективність реакції (мал.12, доріжка 3). При цьому біля 20% вихідної субстратної tat-РНК переходило в продукти реакції - 5'-фрагмент розміром 280 н.о. і 3'-фрагмент розміром 116 н.о.

Таким чином, сконструйований нами рибозим проявляв каталітичну активність при фізіологічних умовах (рН, іонна сила, температура, присутність поліамінів), і хоча ефективність реакції була порівняно невеликою, в поданій роботі зроблено значний крок по створенню рибозиму, який спрямований проти тієї ж мішені в геномі ВІЛ, що й антисенсова РНК. Виявлена каталітична активність рибозиму проти субстрату-мішені *in vitro* дає підстави сподіватися на успішну реалізацію в недалекому майбутньому поєднання в одній векторній конструкції двох інс-

трументів боротьби з ВІЛ-інфекцією - антисенсових РНК та рибозимів, що, за існуючих уявлень, повинно позбавити збудника СНІДу можливості репродукції і продовження інфекційного процесу.

В И С Н О В К И

1. Алкіловані тіофосфамідом нуклеїнові кислоти пригнічують репродукцію РНК- та ДНК-геномних вірусів.

2. В процесі алкілування ДНК відбувається накопичення етиленімінних груп, утворення міжниткових зшитків та фрагментація полінуклеотидів.

3. Алкіловані нуклеїнові кислоти за мутагенною активністю поступаються вихідним препаратам, не впливають негативно на імунокомпетентну систему тварин і не здатні до індукції інтерферону.

4. Денатуруюча дія тіофосфаміду на нуклеїнові кислоти забезпечує одержання інактивованих вірусних вакцин, які при високій імуногенності позбавлені мутагенних властивостей, притаманних живим вірусним препаратам.

5. На основі адено-асоційованого вірусу людини збудовано векторну конструкцію для створення внутріклітинного імунітету за допомогою антисенсових РНК проти генів ВІЛ *tat* і *rev*. Трансфекція антисенсової конструкції в ембріональні гемопоетичні клітини людини забезпечує їх стійкість проти збудника СНІДу в експериментах *in vitro*.

6. Встановлено, що гемопоетичні клітини в більшості ембріонів людини високо чутливі до ВІЛ. Виявлені в роботі зразки клітин із зниженою чутливістю до ВІЛ на клітинному рівні підтверджують існування природної стійкості до цього збудника, проявом якої є відоме явище безсимптомного носійства вірусу СНІДу.

7. Синтезований і клонований рибовим типу "головка молотка" специфічно розщеплює *in vitro* tat/rev-мРНК-транскрипти ВІЛ, що уможливило його використання як додатковий васіб внутріклітинного імунітету проти ВІЛ при створенні нового покоління систем генної терапії СНІДу.

Основні роботи, надруковані за темою дисертації:

1. А. Д. Швед. Метод електронної мікроскопії у вірусологічних дослідженнях // Мікробіологічний журнал. - 1976. - 38, N 5. - с. 659-664.
2. Швед А. Д., Соломко А. П., Потопальский А. И., Ивасивка С. В., Грищенко А. М., Александров Ю. Н., Ткачук Э. Ю., Цегельский А. А., Крылова Э. Л., Ткачук Л. В., Семерникова Л. И. Структурно-функциональные особенности модифицированных нуклеиновых кислот // Молекулярная биология. - 1980. - Вып. 26. - с. 64-78.
3. Т. И. Бужиевская, Л. Л. Лукаш, В. С. Мельниченко, А. Д. Швед. Индукция генных мутаций в клетках млекопитающих под действием РНК вируса гриппа // Докл. АН УССР. Сер. В. - 1981. - N 9. - с. 65-68.
4. А. Д. Швед. Антивирусные свойства полинуклеотидов, не связанные с индукцией интерферона // Микробиол. журн. - 1982. - 44, N 3. - с. 75-85.
5. A. V. Kozlov, O. E. Kitam, A. I. Potopalsky, A. D. Shved, Y. P. Piryatinski, M. V. Kurik, O. V. Veselovsky. Structural changes in DNA upon alkylation with thiophosphamide // Studia biophysica. - 1982. - v. 87, N 2/3. - P. 97-98.
6. Швед А. Д., Бабкин В. Ф., Потопальский А. И., Мельниченко В. С., Краснова Е. Ф. Ингибирование химически модифицированными нуклеиновыми кислотами репродукции вируса инфекционно-

- го ларинготрахеита птиц // Вопросы вирусол. - 1982. - N 3. - с.117-119.
7. Потопальский А.И., Спивак Н.Я., Швед А.Д., Мельниченко В.С., Краснова Е.Ф. Активность некоторых химиопрепаратов в отношении вируса трансмиссивного гастроэнтерита и энтерита свиней // Микробиол. журн. - 1983. - 45, N 5. - с.75-78.
8. Т.І.Буживєвська, Л.Л.Лукаш, А.Д.Швед, І.В.Вавіліна, В.С.Мельниченко. Мутагенний ефект нативної і модифікованої РНК вірусу грипу // ДАН УРСР. Сер.В. - 1985. - N 7. - с.58-60.
9. Е.Л.Рубашевский, Л.Л.Лукаш, А.Д.Швед, В.С. Мельниченко, Л.Т.Тыльванчук, Т.И.Бужиевская. Мутагенная активность нативного и инактивированного вируса простого герпеса // Биологические науки. - 1988. - N 9. - с.83-87
10. Швед А.Д., Спивак Н.Я., Онищук Ф.Д., Потопальский А.И., Жаркова Л.Д., Краснова Е.Ф., Мельниченко В.С., Семерникова Л.И., Тыльванчук Л.Т., Лисовенко В.Г., Федоров А.И., Бабкин В.Ф. Изучение антивирусной активности экзогенных нуклеиновых кислот и их химически модифицированных производных // В сб.: Макромолекулы клеток и вирусов. - Киев, Наукова думка. - 1986. - с.47-60.
11. Швед А.Д., Золотухин С.В., Мацука Г.Х. Антисмысловые РНК: новый механизм регуляции генной экспрессии // Биополимеры и клетка. - 1987. - 3, N1. - с.3-17.
12. Швед А.Д., Решетняк Е.Ю., Золотухин С.В. Антисмысловые РНК как регуляторы экспрессии вирусных генов // Республик. межведомств. сб. "Вирусы и вирусные заболевания". Изд. "Здоров'я", К. - 1990. - Вып.18. - с.56-58.
13. Решетняк Е.Ю., Золотухин С.В., Швед А.Д. Использование адеино-ассоциированного вируса в качестве эукариотического вектора // Республик. межведомств. сб. "Вирусы и вирусные заболевания".

- вания". Изд. "Здоров'я", К. - 1990. - Вып.18. - с.54-56.
14. Кухаренко А.П., Швед А.Д. Регуляторные гены ВИЧ и их роль в реализации генома // Биополимеры и клетка. - 1994. - 10, N 5. - с.5-30.
 15. Сухорада Е.М., Лукаш Л.Л., Подольская С.В., Швед А.Д., Смикодуб А.И. Способ получения и культивирования эмбриональных гепатоцитов человека. Биополимеры и клетка. - 1995. - 11, N 1. - с.92-94.
 16. Швед А.Д., Кухаренко А.П., Когут Г.И. Научно-практическое использование гемопоэтических клеток кордовой крови // Биополимеры и клетка. - 1995. - 11, N 2. - с.5-14.
 17. 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, N 3. - с.20-23.
 18. Кухаренко О.П., Швед А.Д., Рибалко С.Л., Лукаш Л.Л., Кітам О.Е., Сухорада О.М., Рубан Т.П., Грицак Т.Ф., Іванська Н.В. Створення модельної векторної конструкції, що експресує антитисенсові РНК проти ВІЛ-1, для внутрішньоклітинної імунізації гемопоетичних клітин // Інфекційні хвороби. - 1996. - N 3. - с.22-25.
 19. Швед А.Д., Потопальский А.И., Ткачук Л.В. Структурно-функциональные изменения алкилированной тиофосфамидом ДНК фага λ // Fourth International Symposium of Socialist Countries on "Antiviral Substances". - Szeged, Hungary. - June, 23-25, 1980. - P.28.
 20. О.Э.Кітам, А.В.Ковалов, Ю.П.Пирятинский, А.И.Потопальский, А.Д.Швед. Исследования структуры ДНК при алкилировании тиофосфамидом // Симпозиум по биофизике нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Тез. докл. - Таллин, 1981. - 31.

21. A. D. Shved, A. I. Potopalsky, N. Y. Spivak, A. I. Fedorov, V. F. Babkin, V. S. Melnichenko, E. F. Krasnova, L. D. Zharkova, L. I. Semernikova. The study of antiviral properties of exogeneous chemically modified nucleic acids // V-th International Symposium of Socialist Countries "Antiviral Substances". - Riga, September 6-8, 1982. - P. 37.
22. Майский В. Г., Швед А. Д., Солдатова Ю. В., Зацепин В. И. Действие тиофосамида и модифицированных им ДНК на микробы чумы и псевдотуберкулеза // Профилактика природноочаговых инфекций. Тез. докл. Всесоюзной научно-практической конфер. - 6-8 декабря 1983г. - с. 311-313.
23. Л. И. Семерникова, Л. Ф. Диденко, А. Д. Швед, В. Г. Краев, О. Э. Китам. Задержка репродукции X-вируса картофеля с помощью инактивированного гомологичного вируса // Тез. докл. VIII-го Всесоюз. совещания "Теория и практика использования иммунитета сельскохозяйственных культур к вирусным болезням. - Вильнюс, май, 1984. - С. 23-24.
24. А. Д. Швед, С. В. Золотухин, О. Э. Китам, Е. Ю. Решетняк, Г. Х. Мадзука. Антисмысловые РНК как инструмент регуляции экспрессии генов // VII-th International Symposium of the Socialist Countries on Antiviral Substances. Abstracts. - Varna, Bulgaria. - October 12-14, 1987. - P. 46.
25. Мадзука Г. Х., Швед А. Д., Золотухин С. В. Антисенсові РНК - регулятори генної експресії // V Український біохімічний з'їзд. Тез. доп., ч. 1. - ІваноФранківськ, вересень 1987р. - с. 105.
26. О. Ф. Сенюк, О. А. Слатвінська, В. В. Ромашко, Л. Л. Лукаш, Г. С. Лобинцева, А. Д. Швед, І. А. Вотякова. Дослідження імуногенності ембріональних клітин печінки, що використовуються в якості трансфувата при імуногематологічних недугах // Третій Укра-

Інський з'їзд гематологів і трансфузіологів. Тези доповідей. - 23-25 травня 1995р., м.Суми. - Київ, 1995р. - с.54-55.

27.Г.И.Когут, П.М.Перехрестенко, А.Д.Швед. К вопросу об использовании пуповинной крови в медицинской практике // Третий Украинский з'їзд гематологів і трансфузіологів. Тези доповідей. - 23-25 травня 1995р., м.Суми. - Київ, 1995р. - с.91.

28.Рубашевский Е.Л., Лукаш Л.Л., Швед А.Д., Мельниченко В.С., Тьяльванчук Л.Т., Лысенко Е.Ф., Вавилина И.В., Бужиевская Т.И. Индукция генных мутаций вирусом простого герпеса в клетках млекопитающих // Всесоюзная конференция по генетике соматических клеток. Тез.докл. - Москва, 19-22 октября, 1986. - с.76.

29.Shved A., Kukhareenko A., Lukash L., Ivanska N., Rybalko S. Inhibition of HIV replication with antisense RNA in human fetal liver hemopoietic cells transfected with adeno-associated virus vector // The 3-rd Internat. Confer.on AIDS in Asia and the Pacific, Chiang Mai, Thailand, 17-21 Sept., 1995. Abstr.PA601.

30.О.Кухаренко, Л.Лукаш, Н.Іванська, О.Сухорада, Є.Жеребцова, Т.Рубан, С.Подольська, С.Рибалко, Т.Грицак, Е.Максименко, Н.Ченцова, А.Швед. Конструювання еукаріотичного вектора на основі ААВ, який здійснює синтез у клітині антисенсових РНК проти ВІЛ // Збірник тез Першої нац. наук.-практ. конфер. з проблем ВІЛ/СНІД з міжнародною участю. Київ, 24-26 січня 1995р., с.61-62.

31.Н.Іванська, О.Сухорада, Л.Лукаш, Т.Рубан, С.Подольська, С.Рибалко, Т.Грицак, Е.Максименко, Н.Ченцова, А.Швед. Чутливість ембріональних клітин людини до ВІЛ-інфекції //

Збірник тез Першої нац. наук.-практ. конфер. з проблем ВІЛ/СНІД з міжнарод.участю. Київ, 24-26 січня 1995р., с.56-57.
32.А.с. СССР N 222882 (у співавторстві з Красновою К.Ф., Кітамом О.Е., Федоровим А.І. та ін.) ДСП.

Швед А.Д. Структура и функциональные свойства полинуклеотидных ингибиторов вирусной репродукции (алкилированных нуклеиновых кислот, антисмысловых РНК и рибозима).

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1996.

Защищается 32 научные работы, содержащие материалы экспериментальных исследований антивирусных свойств нуклеиновых кислот, антисмысловой РНК и рибозима. На моделях ДНК- и РНК-геномных вирусов показана антивирусная активность ряда нуклеиновых кислот, а их алкилированные производные более эффективно ингибировали репродукцию вирусов. Эндогенный синтез антисмысловых РНК обеспечивал существенное угнетение репродукции ВИЧ-1 в культурах гемопозитических клеток человека. Синтезирован и клонирован рибозим, способный специфически разрезать *in vitro* *tat*-РНК ВИЧ-1.

Ключевые слова: алкилированные нуклеиновые кислоты, антисмысловая РНК, рибозим, ВИЧ-1.

Shved A.D. Structure and functional properties of polynucleotide inhibitors of virus reproduction (alkylated nucleic acids, antisense RNAs and ribozyme).

Doctor of Sciences Dissertation, specialization 03.00.03 - Molecular Biology, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996.

The materials of 32 scientific publications on the experimental research of antiviral action of nucleic acids and their chemically modified derivatives, antisense RNA and ribozyme on the models of RNA and DNA containing viruses are defended. 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.

Key words: alkylated nucleic acids, antisense RNA, ribozyme, HIV-1.

438100

AB. 36.217

AB 36.217