

БЕЗОПАСНАЯ МОДЕЛЬ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

УДК 616.98.001.57:615.03

Поступила 26.04.2011 г.



Е.В. Головин, ассистент кафедры детских инфекций¹;

И.Г. Мустафин, д.м.н., доцент, зав. кафедрой биохимии¹; зав. лабораторией клинической иммунологии²;

Е.В. Мартынова, врач-ординатор кафедры детских инфекций¹;

О.Р. Галеев, врач-интерн кафедры детских инфекций¹;

В.А. Анохин, д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекций¹;

А.А. Ризванов, д.б.н., старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории¹;
доцент кафедры генетики биолого-почвенного факультета³; ассистент профессора кафедры
генетики и биоинженерии⁴

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Республика Татарстан, 420012, ул. Бутлерова, 49;

²Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ,
Казань, Республика Татарстан, 420097, ул. Вишневого, 2А;

³Казанский (Поволжский) федеральный университет, Казань, Республика Татарстан, 420008, ул. Кремлевская, 18;

⁴Университет Едитепе, Стамбул, Турция, 34755, Agustos Yerlesimi St., 26

Цель исследования — разработать безопасную модель ВИЧ-инфекции для оценки эффективности антиретровирусных препаратов.

Материалы и методы. Модель ВИЧ-инфекции создана на основе культуры клеток человека и рекомбинантного лентивируса, несущего ген зеленого флюоресцирующего белка (*gfp*). Рекомбинантный лентивирус имеет структуру ВИЧ 1-го типа (ВИЧ-1), из которого методами генной инженерии удалена геномная РНК. Интеграцию провируса клетки оценивали по экспрессии гена *gfp*. С помощью модели определяли активность известных лекарственных препаратов, применяемых для лечения ВИЧ-инфекции.

Результаты. Модель воспроизводит три этапа жизненного цикла ВИЧ-1: обратную транскрипцию, образование преинтеграционного комплекса и его доставку в ядро клетки, интеграцию провируса в геном клетки. Нуклеозидные (зидовудин и ламивудин) и ненуклеозидные (эфавиренз) ингибиторы обратной транскриптазы, действующие на стадии обратной транскрипции ВИЧ, существенно подавляли интеграцию провируса в геном клеток человека, в то время как ингибитор слияния (энфувиртид) и ингибитор протеазы ВИЧ (атазанавир) такого эффекта не оказывали, поскольку действуют на более поздних этапах, не представленных в модели.

Заключение. Предложенная модель может быть использована не только для тестирования химиопрепаратов, но и для скрининга новых способов воздействия на клетки человека, включая генную терапию.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, клеточная модель, лентивирусный вектор, антиретровирусные препараты.

English

Safe model of HIV infection to assess antiretroviral activity of medical drugs

E.V. Golovin, Tutor, the Department of Children Head Infections¹;

I.G. Mustafin, D.Med.Sc., Associate Professor, Head of the Department of Biochemistry¹; Head of the Clinical Immunology Laboratory²;

E.V. Martynova, Resident Physician, the Department of Children Infections¹;

O.R. Galeev, Intern, the Department of Children Infections¹;

V.A. Anokhin, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Children Infections¹;

A.A. Rizvanov, D.Bio.Sc., Senior Research Worker, Central Scientific Research Laboratory¹;

Associate Professor of the Department of Genetics, The Biology and Soil Faculty³; Assistant Professor of the Department of Genetics and Biological Engineering⁴

¹Kazan State Medical University, Butlerova St., 49, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation, 420012;

²Republican AIDS and Infectious Diseases Prevention and Control Centre, Ministry of Health Care of the Republic of Tatarstan, Vishnevskogo St., 2A, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation, 420097;

³Kazan (Volga region) Federal University, Kremlevskaya St., 18, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation, 420008;

⁴Yeditepe University, Agustos Yerlesimi St., 26, Istanbul, Turkey, 34755

Для контактов: Головин Евгений Владимирович, тел. раб. 8(843)231-79-47, тел. моб. +7 927-245-82-15; e-mail: golovin1410@gmail.com

The aim of the investigation is to develop the safe model of HIV infection to assess the efficacy of antiretroviral drugs.

Materials and methods. The HIV infection model was designed on the basis of human cell culture and recombinant lentivirus carrying the gene of green fluorescent protein (gfp). Recombinant lentivirus has the structure of 1 type HIV (HIV-1) from which genomic RNA was removed from using genetic engineering method. Cell provirus integration was assessed by gfp gene expression. By means of the model the activity of known medical drugs used for HIV infection treatment was determined.

Results. The model simulates three stages of HIV-1 cycle: reverse transcription, pre-integration complex formation and its delivery to the nucleus, provirus integration into cell genome. Nucleoside (Zidovudine and Lamivudine) and non-nucleoside (Efavirenz) inhibitors of reverse transcriptase effecting at the stage of HIV reverse transcription, significantly suppressed provirus integration into human cell genome, while fusion inhibitor (Enfuvirtide) and HIV protease inhibitor (Atazanavir) did not have such an effect as they act only at later stages not represented in the model.

Conclusion. The suggested model can be used not only for pharmaceuticals testing but also for screening new modalities of having an effect on human cells including gene therapy.

Key words: HIV infection, cellular model, lentivirus factor, antiretroviral drugs.

Лечение ВИЧ-инфекции антиретровирусными (АРВ) препаратами существенно продлило жизнь пациентам [1]. Однако при всех очевидных достоинствах эти лекарственные средства обладают и рядом существенных недостатков: токсичностью, неизбежным формированием резистентных штаммов вируса на фоне их длительного приема [2], неспособностью полностью элиминировать возбудителя, сложностью режима приема и необходимостью высокой приверженности пациента [3], а также достаточно высокой стоимостью. Это обуславливает постоянный поиск новых препаратов с улучшенными фармакологическими характеристиками [4].

Одно из условий и, таким образом, одна из проблем в разработке лекарственных средств — биологическая безопасность. Исследование новых препаратов на АРВ-активность проводится преимущественно на моделях, содержащих штаммы ВИЧ 1-го типа (ВИЧ-1) [5], либо вирусы иммунодефицита обезьян (SIV) и ряда других животных [6]. Использование инфекционных штаммов ВИЧ требует наличия лаборатории 3–4 класса биобезопасности, что доступно не каждому исследовательскому центру, а вирусы животных могут задействовать иные молекулярные механизмы развития болезни, нежели ВИЧ-1.

Цель исследования — разработать безопасную модель ВИЧ-инфекции для оценки эффективности антиретровирусных препаратов.

Материалы и методы. Предлагаемая модель ВИЧ-инфекции создана на основе культуры клеток человека и рекомбинантного лентивируса, несущего ген зеленого флюоресцирующего белка (*gfp*). Рекомбинантные ретровирусы, в том числе и лентивирусы на основе ВИЧ-1, являются искусственно созданными вирусоподобными частицами. Методами генной инженерии из генома вируса удалены все нуклеотидные последовательности, кодирующие белки ВИЧ-1. В оболочку встроен белок вируса везикулезного стоматита (*VSV-G*). Вирион содержит все основные ферменты и структурные белки ВИЧ-1 за исключением трех регуляторных белков (*Vif*, *Vpr*, *Nef*) и белков оболочки (*gp120* и *gp41*). Технология получения рекомбинантных лентивирусов 2-го и 3-го поколений не позволяет генам исходного вируса попасть в вирион. Клетка, в которую проникает созданный вирион, не способна производить вирусные частицы, что и обеспечивает безопасность применения такого рода

модели. Подобные ретровирусы используются в качестве векторов для доставки генетической информации в геном терапии [7]. Предлагаемое авторами применение рекомбинантного лентивируса для изучения межмолекулярных взаимодействий компонентов ВИЧ-1 с компонентами клетки человека и искусственными факторами с полным основанием может считаться инновационным подходом в решении прикладных задач медицины.

Разработанная модель воспроизводит три этапа жизненного цикла ВИЧ-1: обратную транскрипцию, образование преинтеграционного комплекса с последующей транслокацией в ядро и интеграцию провируса в геном клетки [8]. Скрининг противовирусных препаратов с применением рекомбинантного лентивируса проводили с оценкой АРВ-активности известных препаратов комплекса АРВ-терапии. Рабочая гипотеза была следующей: препараты, точка приложения которых находится в числе ранних фаз инфицирования, будут прерывать каскад последующих событий, в частности интеграцию провируса в клеточный геном. Этот эффект будет проявляться отсутствием экспрессии гена *gfp*. Препараты, прерывающие жизненный цикл ВИЧ-1 на стадии слияния, не должны оказывать влияния на рекомбинантный лентивирус, использующий иной механизм проникновения в клетку. А препараты, действующие на созревание белков ВИЧ-1, также не должны влиять на интеграцию, так как поздние события репликативного цикла ВИЧ-1 в представленной модели не реализуются.

Приготовление растворов АРВ-препаратов. В работе использовали препараты, зарегистрированные в РФ, применяемые для лечения ВИЧ-инфекции (табл. 1).

Препараты взвешивали на электронных аналитических весах, измельчали в тонкий порошок стерильными пестиками. Навески растворяли в растворе Хенкса (ф. Sigma, США), центрифугировали при 1500 g 15 мин для удаления нерастворимых примесей. В качестве исходных применяли растворы препаратов в концентрации $200 \cdot C_{\max}$, где C_{\max} — максимальная концентрация действующего вещества в плазме крови человека после однократного приема препарата в терапевтической дозе [9–11].

Культивирование клеток HEK-293T. Все работы с культурой клеток проводили в стерильном ламинарном

Таблица 1

Антиретровирусные препараты, используемые в исследовании

Торговое название препарата	Лекарственная форма			Фарм. группа	Действующее вещество		C _{max} [*] мкг/мл
	Вид	Масса, мг	Содержание действующего вещества, мг		Международное непатентованное название (МНН)		
					полное	сокращенное	
Стокрин	Капсулы	1208,0	600	НеНИОТ	Эфавиренз	EFV	4,7
Реатаз	Капсулы	384,7	200	ИП	Атазанавир	ATV	3,2
Фузеон	Лиофилизат во флаконе	141,0	108	ИС	Энфувиртид	T20	4,6
Зидовудин	Капсулы	234,3	100	НИОТ	Зидовудин	ZDV	1,5
Эпивир	Таблетки	307,7	150	НИОТ	Ламивудин	3ТС	1,5

* НИОТ — нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы; НеНИОТ — ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы; ИС — ингибитор слияния; ИП — ингибитор протеазы.

боксе согласно общепринятым правилам работы в лаборатории 2-го класса биологической безопасности [12].

Эмбриональные клетки почки человека *HEK-293T* (ATCC, CRL-11268) культивировали в среде IMDM (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (Sigma) и пенstreпа (Sigma). Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Пересев клеток проводили при плотности клеточного монослоя 90% с применением 0,25% раствора трипсина — ЭДТА («БиоЛот», Санкт-Петербург).

Получение рекомбинантного лентивируса. Для получения рекомбинантного лентивируса использовали трехкомпонентную систему: клетки *HEK-293T* трансфицировались плазмидами *pCMV-VSV-G*, *psPAX2* и *pWPT-GFP*. Векторная плазмида *pWPT-GFP* состоит из обратных концевых повторов ВИЧ-1 и экспрессионной кассеты, кодирующей ген *gfp*. Транскрипты РНК, получаемые при экспрессии данной плазмиды, служат геномными РНК для упаковки в вирионы. Плазмида *pCMV-VSV-G* кодирует оболочечный гликопротеин вируса везикулезного стоматита (*VSV-G*) и обеспечивает псевдотипирование лентивируса — замену гликопротеинов ВИЧ *gp41/gp120* на *G*-белок вируса везикулезного стоматита (*VSV-G*), что позволяет расширить тропность вируса. Упаковочная плазмида *psPAX2* содержит ген *gag-pol* ВИЧ-1, продукты экспрессии которого необходимы для формирования вирионов.

Плазмиды предоставлены некоммерческой организацией AddGene (США): *pCMV-VSV-G* (плазмида №8454), *psPAX2* (плазмида №12260) и *pWPT-GFP* (плазмида №12255). Клетки *HEK-293T* культивировали во флаконе T75 до плотности клеточного монослоя 70%. Трансфекцию проводили через 2 ч после смены среды трансфекционной смесью: 112,5 мкг векторной плазмиды *pWPT-GFP*; 39,5 мкг оболочечной плазмиды *pCMV-VSV-G*; 75 мкг упаковочной плазмиды *psPAX2*; 3,3 мл TE 0,1X (10 ммоль Tris + 1 ммоль EDTA, pH=8,0); 1,75 мл дистиллированной воды; 565 мкг 2,5 М раствора CaCl₂; 5,7 мл 2X HBS (0,280 М NaCl + 0,1 М Hepes + 0,0015 М Na₂HPO₄, pH=7,12). Через 17 ч после трансфекции среду заменяли свежей. Сбор вирусного супернатанта проводили 3 раза с интервалом 12 ч. Супернатанты объединяли при 4°C. По завершении сбора их центрифугировали 5 мин при 1500 об./мин, фильтрова-

ли через фильтр 0,22 мкм. Очищенные супернатанты хранили в аликвотах при -80°C.

Для определения титра полученного вирусного раствора проводили подсчет в камере Горяева клеток *HEK-293T* в контрольной лунке 24-луночного планшета. Культуру клеток *HEK-293T* инфицировали раствором лентивируса в серийных разведениях (1, 1/5, 1/25, 1/125). Инкубировали 3 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Сливали супернатант, добавляли свежую среду, инкубировали 72 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Инфицированные клетки с интеграцией генома рекомбинантного лентивируса определяли по наличию экспрессии гена *gfp* в инфицированных клетках методом обратной флюоресцентной микроскопии на микроскопе Leica DMIL с системой видеодокументации DFC420 (Leica, Германия).

Инфицирование клеток рекомбинантным лентивирусом. Клетки *HEK-293T* высевали в 24-луночный планшет из расчета 15 000 клеток на лунку в 750 мл среды IMDM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS и пенstreпа. Клетки инкубировали 2 сут при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки из контрольной лунки трипсинизировали и подсчитывали в камере Горяева.

Культуральную среду удаляли, добавляли по 250 мкл свежей среды в каждую лунку. В 15 лунок (3 лунки на препарат) добавляли исходные (200·C_{max}) растворы препаратов до конечных концентраций 0,1·C_{max}, 1·C_{max} и 10·C_{max} в культуральной среде для каждого препарата. В том же планшете параллельно титровали лентивирус, как описано выше. Клетки инкубировали 30 мин при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Среду удаляли, в лунки добавляли по 250 мкл неразведенного раствора рекомбинантного лентивируса в питательной среде и раствор соответствующего препарата до требуемой концентрации (0,1·C_{max}, 1·C_{max} и 10·C_{max}). Клетки инкубировали 3 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Среду удаляли, добавляли по 500 мкл свежей среды. Инфицированные клетки инкубировали 72 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Экспрессию гена *gfp* в инфицированных клетках определяли с помощью флюоресцентного микроско-

па Leica DMIL с системой видеодокументации DFC420 (Leica, Германия).

Результаты.

Получение рекомбинантного вируса. Эффективность трансфекции составила около 90% (оценка по экспрессии гена *gfp*). По результатам подсчета количества клеток в камере Горяева контрольная лунка содержала 60 000 клеток. Микрофотографии клеток *HEK-293T*, инфицированных раствором рекомбинантного лентивируса в серийных разведениях, представлены на рис. 1. Для каждой лунки зафиксировано одно и то же поле зрения при флуоресцентной и световой микроскопии. Наибольшее количество *gfp*-позитивных клеток наблюдалось в лунке, инфицированной неразведенным образцом (около 50%). Количество *gfp*-позитивных клеток уменьшалось по мере разведения раствора рекомбинантного лентивируса.

Результаты скрининга препаратов на АРВ-активность. Микрофотографии флуоресцентной микроскопии клеток, обработанных АРВ-препаратами в различных концентрациях и инфицированных рекомбинантным лентивирусом, показаны на рис. 2. Полуколичественная оценка экспрессии гена *gfp* в инфицирован-

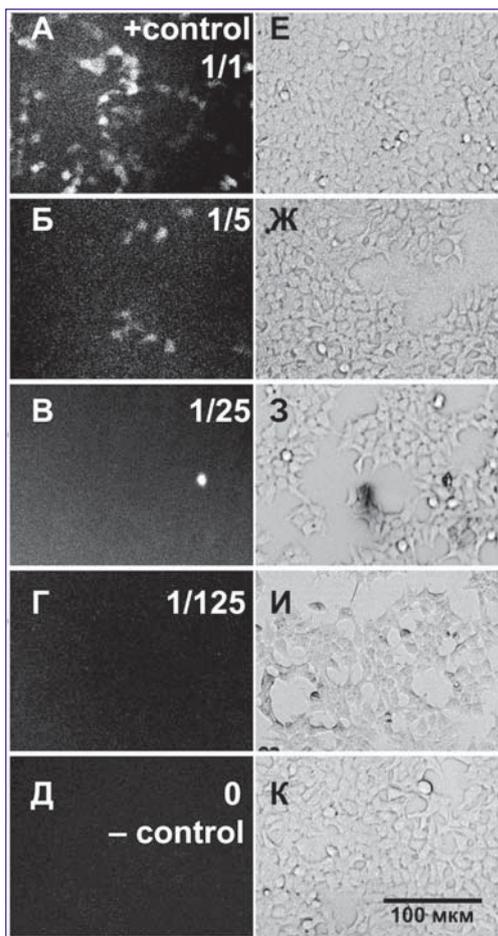


Рис. 1. Титрование раствора рекомбинантного лентивируса. Флуоресцентная (А–Г) и световая (Е–И) микроскопия клеток *HEK-293T*, инфицированных рекомбинантным лентивирусом в разведении от 1 до 1/125; Д, К — неинфицированный контроль

Таблица 2

Количество инфицированных *gfp*-позитивных клеток по результатам флуоресцентной микроскопии

МНН	Фарм. группа	Вирусная инфекция*		
		0,1·C _{max}	1·C _{max}	10·C _{max}
Эфавиренз	НеНИОТ	++	–	–
Атазанавир	ИП	++++	++++	++++
Энфувиртид	ИС	++++	++++	++++
Зидовудин	НИОТ	++++	+	–
Ламивудин	НИОТ	+++	++	+

* — вирусная инфекция оценивалась по 5-балльной шкале по количеству *gfp*-позитивных клеток: (–) — *gfp*-позитивные клетки не наблюдаются, (++++) — максимально наблюдаемое количество *gfp*-позитивных клеток.

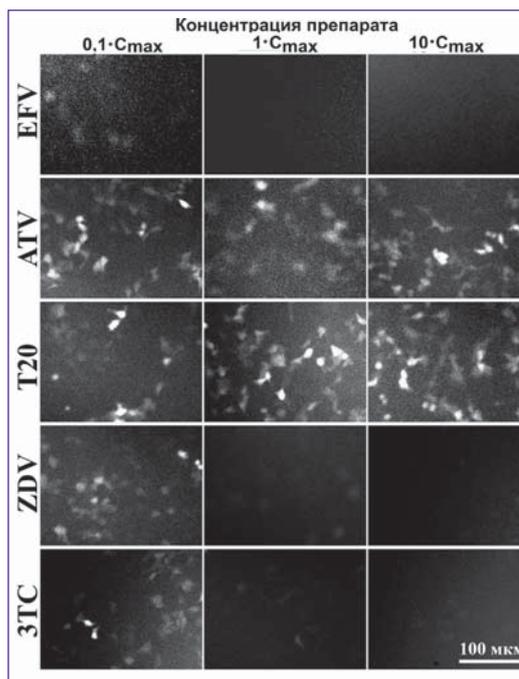


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия клеток, обработанных различными АРВ-препаратами и инфицированных рекомбинантным лентивирусом. Препараты применялись в концентрациях 0,1·C_{max}, 1·C_{max} и 10·C_{max}

ных клетках по данным флуоресцентной микроскопии представлена в табл. 2.

Интенсивное свечение, сравнимое с положительным контролем (рис. 1, А), наблюдалось в лунках с добавлением препаратов ATV и T20 во всех концентрациях (см. рис. 2). Кроме того, *gfp*-позитивные клетки имелись в лунках, содержащих препараты 3TC, ZDV и EFV в концентрации 0,1·C_{max}. В лунках, содержащих препараты 3TC, ZDV и EFV в концентрациях 1·C_{max} и 10·C_{max}, отмечалось эффективное подавление лентивирусной инфекции.

Обсуждение. Полученные результаты показали, что препараты из групп нуклеозидных и нунуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы в терапевтической концентрации эффективно прерывали цикл внутриклеточного развития лентивируса и предотвращали интеграцию, что выражалось в отсутствии или

очень малом количестве *gfp*-позитивных клеток. В то же время ингибитор протеазы и ингибитор слияния не оказывали влияния на процессы инфицирования рекомбинантным лентивирусом, поскольку препараты этих групп действуют на стадиях ВИЧ-инфекции, не отраженных в данной модели.

При снижении концентрации препаратов нуклеозидных и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы в культуре появлялись *gfp*-позитивные клетки (клетки с интеграцией провируса).

Таким образом, исследуемые препараты эфавиренз, зидовудин и ламивудин в терапевтической дозе эффективно предотвращают интеграцию ВИЧ-1. Те же препараты в меньшей в 10 раз концентрации способны подавлять развитие инфекции, но недостаточно эффективно. Сравнение действия нуклеозидных (зидовудин и ламивудин) и нуклеозидного (эфавиренз) ингибиторов обратной транскриптазы показало положительный эффект в обеих группах, тем не менее эфавиренз даже в 10-кратном разведении подавлял репликативный цикл вируса эффективнее.

Атазанавир и энфувиртид, как и следовало ожидать, не оказывали влияния на изучаемых этапах — от разведения капсида до интеграции провируса. Как известно, атазанавир подавляет вирусную протеазу, препятствуя созреванию белков вируса, — «поздние события» внутриклеточного цикла. Энфувиртид же блокирует слияние вируса с клеткой, что мы не можем наблюдать на данной модели вследствие псевдотипирования. Эти этапы не представлены в модели.

В данной работе модель ВИЧ-инфекции демонстрируется как средство определения противовирусной активности препаратов, но ее можно также применять для исследования межмолекулярных взаимодействий при изучении патогенеза ВИЧ-инфекции. Предложенная модель может быть использована не только для тестирования химиопрепаратов, но и для скрининга новых способов воздействия на клетки человека, включая генную терапию.

В последние годы в научной среде все чаще высказывают мнения о возможности полного излечения ВИЧ-инфекции. Многие исследователи обращают внимание на клеточные факторы и на успешность генной коррекции экспрессии отдельных белков [13, 14]. Именно с генной терапией ученые связывают надежду на излечение этого заболевания и возможность выработки у здорового организма невосприимчивости к ВИЧ-инфекции [15]. Большинство эпидемически опасных инфекций в настоящее время контролируются путем формирования специфического иммунитета за счет вакцинации. Контроля над ВИЧ-инфекцией вакцинацией достигнуть проблематично. Возможно, она станет первым инфекционным заболеванием, контролируемым не вакцинацией, а изменением генных свойств клеток организма человека.

При использовании рекомбинантного лентивируса исследователи могут не бояться инфицирования и распространения инфекции, поскольку вирионы не содержат генетической информации ВИЧ. Получение рекомбинантного лентивируса также безопасно.

Экспрессионная плаزمиды *psPAX2* содержит 6 генов ВИЧ-1, но не представляет биологической опасности, поскольку не может проникнуть в клетку без процедуры трансфекции; в клетке человека плазмиды запускает синтез белка, но не копий генетической информации; и, наконец, шести генов недостаточно для сборки полноценного инфекционного вириона. Таким образом, все этапы исследований безопасны и осуществимы в условиях лаборатории 2-го класса биобезопасности.

Заключение. При всех достоинствах представленной модели (точность, эффективность, простота, небольшая стоимость) следует учитывать и ее ограничения: модель охватывает только часть цикла внутриклеточного развития ВИЧ-1 и определяет качественный показатель антиретровирусной активности препарата на ранних этапах внутриклеточного цикла. Тем не менее предложенная методика может быть использована в качестве доступного скринингового исследования при отборе препаратов или других факторов, потенциально воздействующих на процессы внедрения и интеграции лентивирусов, в том числе ВИЧ-1, в клетки человека.

Работа частично финансировалась грантами Российского фонда фундаментальных исследований и госконтрактами ФЦП Федерального агентства по науке и инновациям. Работа А.А. Ризванова также финансировалась реинтеграционным грантом НАТО NR.RIG.983007.

Литература

1. Покровский В.В., Ермак Т.Л., Беляева В.Л., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция, клиника, диагностика, лечение. М: ГЭОТАР-Медцина; 2000; 204 с.
2. Wainberg M.A., Jeang K.-T. 25 years of HIV-1 research — progress and perspectives. BMC Medicine 2008; 6: 31.
3. Bailey A.C., Fisher M. Current use of antiretroviral treatment. Br Med Bull 2008; 87: 175–192.
4. Basavapathruni A., Anderson K.S. Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. FASEB J 2007 Dec; 21(14): 3795–3808.
5. Clair M.St., Pennington K.N., Rooney J., Barry D.W. Rapid screening of antiretroviral combinations. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 1995; 10 (Suppl. 1): 524–527.
6. Dias A.S.P., Bester M.J., Britz R.F., Apostolides Z. Animal models used for the evaluation of antiretroviral therapies. Current HIV Research 2006; 4: 431–446.
7. Naldini L., Blomer U., Gallay P. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 1996; 272(5259): 263–267.
8. Анохин В.А., Головин Е.В., Ризванов А.А. Преинтеграционный комплекс вируса иммунодефицита человека — потенциальный объект генетической терапии ВИЧ-инфекции. Инфекционные болезни 2009; 6(4): 46–50.
9. Регистр лекарственных средств России. Справочник. РЛС@. М: Медицина; 2008; 1214 с.
10. Лекарственные препараты в России. Справочник Видаль. М: АстраФармСервис; 2009; 1448 с.
11. Рафальский В.В. Клиническая фармакология атазанавира. Фарматека 2008; 4: 1–8.
12. Doyle A., Griffiths J.B., editors. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1998.
13. Barde I., Zanta-Boussif M.A., Paisant S., Leboeuf M., Rameau P., Delenda C., Danos O. Efficient control of gene

expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. *Molecular Therapy* 2006; 13(2): 382–390.

14. Schambach A., Swaney W.P., van der Loo J.C.M. Chapter 14. Design and production of retro- and lentiviral vectors for gene expression in hematopoietic cells. In: Baum C. (editor). *Genetic Modification of Hematopoietic Stem Cells: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC; 2009; p. 191–205.
15. Rossi J.J., June C.H., Kohn D. Genetic therapies against HIV. *Nature Biotechnology* 2007; 25(12): 1444–1454.

References

1. Pokrovskiy V.V., Ermak T.L., Belyaeva V.L., Yurin O.G. *VICH-infektsiya, klinika, diagnostika, lechenie* [HIV infection, clinical picture, diagnostics, treatment]. Moscow: GEOTAR-Meditsina; 2000; 204 p.
2. Wainberg M.A., Jeang K.-T. 25 years of HIV-1 research — progress and perspectives. *BMC Medicine* 2008; 6: 31.
3. Bailey A.C., Fisher M. Current use of antiretroviral treatment. *Br Med Bull* 2008; 87: 175–192.
4. Basavapathruni A., Anderson K.S. Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. *FASEB J* 2007 Dec; 21(14): 3795–3808.
5. Clair M.St., Pennington K.N., Rooney J., Barry D.W. Rapid screening of antiretroviral combinations. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 1995; 10 (Suppl. 1): 524–527.
6. Dias A.S.P., Bester M.J., Britz R. F., Apostolides Z. Animal mo-

dels used for the evaluation of antiretroviral therapies. *Current HIV Research* 2006; 4: 431–446.

7. Naldini L., Blomer U., Gallay P. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272(5259): 263–267.
8. Anokhin V.A., Golovin E.V., Rizvanov A.A. *Infektsionnye bolezni* 2009; 6(4): 46–50.
9. *Registr lekarstvennykh sredstv Rossii. Spravochnik* [Russian pharmaceutical products register. Guide]. RLS®. Moscow: Meditsina; 2008; 1214 p.
10. *Lekarstvennye preparaty v Rossii. Spravochnik Vidal'* [Pharmaceutical drugs in Russia. Vidal Guide]. Moscow: AstraFarmServis; 2009; 1448 p.
11. Rafal'skiy V.V. *Farmateka* 2008; 4: 1–8.
12. Doyle A., Griffiths J.B., editors. *Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1998.
13. Barde I., Zanta-Boussif M.A., Paisant S., Leboeuf M., Rameau P., Delenda C., Danos O. Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. *Molecular Therapy* 2006; 13(2): 382–390.
14. Schambach A., Swaney W.P., van der Loo J.C.M. Chapter 14. Design and production of retro- and lentiviral vectors for gene expression in hematopoietic cells. In: Baum C. (editor). *Genetic Modification of Hematopoietic Stem Cells: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC; 2009; p. 191–205.
15. Rossi J.J., June C.H., Kohn D. Genetic therapies against HIV. *Nature Biotechnology* 2007; 25(12): 1444–1454.