

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-263

СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА С ДЕФЕКТОМ ИНТЕГРАЗЫ

CREATION OF A LENTIVIRAL VECTOR WITH AN INTEGRASE DEFECT

В. В. Куликов, Д. Н. Щербаков

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
Алтайский государственный университет, Барнаул*

V. V. Kulikov, D. N. Shcherbakov

*State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo
Altai State University, Barnaul*

✉ coolervvk@gmail.com

Аннотация

Длительная экспрессия терапевтических генов, доставляемых вирусными векторами, может вызывать нежелательные эффекты. Для временной экспрессии разработан лентивирусный вектор с дефектом интегразы на основе плазмида psPAX2. Сайт-направленным мутагенезом был получен вектор pPaxID сохраняющий способность эффективной трансдукции клеток, обеспечивая временную экспрессию с минимальным риском интеграции, что повышает безопасность генной терапии.

Abstract

Prolonged expression of therapeutic genes delivered by viral vectors can cause undesirable effects. A lentiviral vector with an integrase defect based on the psPAX2 plasmid has been developed for temporary expression. Site-directed mutagenesis produced the pPaxID vector, which preserves the ability of effective cell transduction, providing temporary expression with minimal risk of integration, which increases the safety of gene therapy.

Введение

Лентивирусные векторы (ЛВ) являются эффективным инструментом для доставки генетического материала в труднотрансфицируемые клетки, включая делящиеся и неделящиеся. Однако их способность к стабильной интеграции в геном хозяина несет риски инсерционного мутагенеза и долговременной неконтролируемой экспрессии трансгена. Это ограничивает их применение в случаях, где требуется временный эффект или минимизация генотоксичности. Векторы с дефицитом интегразы (IDLV) образуют неинтегрирующие эпизомы, обеспечивая ограниченную во времени экспрессию доставленной кассеты, что значительно снижает связанные с интеграцией риски [1].

Материалы и методы

За основу взят плазмидный вектор psPAX2, кодирующий структурные белки лентивируса. Для инактивации интегразы методом сайт-направленного мутагенеза (ПЦР с праймерами, несущими точечную мутацию) в каталитическом домене *int* (D64E) амплифицирован фрагмент гена *pol*. Мутантный ПЦР-продукт обработан рестриктазой *Bst AUI* и лигирован обратно в psPAX2, замещая исходный фрагмент. Клоны отобраны на ампилине, плазмидная ДНК секвенирована для подтверждения мутации.

Результаты и обсуждение

1. Конструирование pPax-ID: успешно создан мутантный вектор pPax-ID, несущий ключевую замену D64E в гене интегразы. Эта мутация в домене интегразы критически нарушает способность интегразы осуществлять стабильную интеграцию провируса в геном.

2. Подтверждение мутации: секвенирование целевого региона гена *pol* подтвердило наличие требуемой замены нуклеотидов (GAT -> GAG), приводящей к замене D на E.

3. Принцип работы IDLV: полученный pPax-ID используется в трехплазмидной системе для производства вирусных частиц. Такие частицы трансдуцируют клетки-мишени, доставляя генетический материал в ядро. Из-за дефекта интегразы ДНК вектора остается в форме эпизомы, обеспечивая временную экспрессию доставленной генетической конструкции. Эпизомы постепенно деградируют в процессе деления клеток и внутриклеточных процессов.

4. Преимущества IDLV

- Повышенная безопасность: резкое снижение риска инсерционного мутагенеза по сравнению с интегрирующими лентивирусами.
- Временная экспрессия: обеспечивает ограниченную во времени экспрессию целевого гена/элемента, что критично для многих терапевтических подходов.
- Широкая применимость: сохраняет высокую эффективность трансдукции лентивирусов в широкий спектр клеток, включая неделяющиеся.
- Большая емкость: обладает превосходной упаковочной способностью (> 8 kb).

Заключение

Разработан лентивирусный вектор pRax-ID с инактивированной интегразой. Ключевым преимуществом этого вектора является способность обеспечивать эффективную, но временную экспрессию доставляемых генетических конструкций (терапевтических генов, регуляторных РНК, репортеров и др.) при минимальном риске стабильной интеграции в геном хозяина. Это делает pRax-ID ценным инструментом для безопасной генной терапии, требующей временного эффекта, функциональной геномики и исследований, где долговременная экспрессия нежелательна или несет риски. Полученная конструкция пригодна для производства вирусных частиц третьего поколения.

Литература

1. Philpott N. J., Thrasher A. J. Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy // Human Gene Therapy. 2007. Vol. 18, No. 6. P. 483–489.