



Ипатов С.Е., Румянцев С.А.

ОСНОВЫ БЕЗОПАСНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии Минздрава России

Россия, 117997, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117/2. E-mail: s_roumiantsev@mail.ru

К настоящему времени в научных кругах всего мира обсуждаются проблемы безопасности при проведении генной терапии у широкой категории пациентов. В данном обзоре суммированы результаты клинических исследований, приведены пояснения относительно побочных эффектов, связанных с генотоксичностью векторной интеграции, обсуждаются факторы, которые могут вызывать случаи генотоксичности, а также предложены подходы, способные сохранить или повысить клиническую эффективность генной терапии с использованием в качестве мишеней гемопоэтических стволовых клеток, при этом существенно снижая риск развития лейкемии и других побочных эффектов, связанных с включением вектора в геном.

Ключевые слова: генная терапия, генетические векторы

Ipatov S.E., Roumiantsev S.A.

BASIS OF GENE THERAPY

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
117/2 Leninskiy pr., Moscow. 117997, Russia. E-mail: s_roumiantsev@mail.ru

By present time safety problems of gene therapy are widely discussed among scientists of all world. In this review results of clinical researches are summarized; explanations concerning side effects of vectors integration are given; factors that can cause genotoxicity are discussed. Approaches which can save or increase clinical efficacy of gene therapy with use as targets hematopoietic stem cells, thus significantly reduced risk of leukemia development and other side effects related to vectors including in genome, are presented.

Keywords: Gene therapy, genetic vectors

Прошло уже более двух десятилетий с того времени, когда нереплицирующиеся вирусные векторы были впервые использованы для генетической модификации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) мышей, и более 15 лет с начала первого этапа клинических испытаний данной стратегии у человека. Эти испытания продемонстрировали не много фактов успешной модификации ГСК, потому исследователи, руководствуясь указаниями специальной экспертной комиссии Национального Института здоровья США 1996 года, с участием других финансирующих организаций, сфокусировали свои усилия на усовершенствовании векторов, более подробном изучении заболеваний – объектов генной терапии, и усовершенствовании методов отбора и культивирования ГСК *ex vivo*. Использование в качестве моделей приматов, собак и иммунодефицитных мышей вместо классических мышиных моделей позволило создать методологические подходы и векторы, которые могли бы непосредственно и успешно использоваться в клинических исследованиях. Недавно также были описаны важные факторы относительно проведения генной терапии, такие как использование фибропектинового матрикса для концентрации векторов, прилежащих к ГСК в процессе предотвращения их дифференцирования, включение цитокинов, таких как лиганд *flt3*, тромбопоэтин и фактор стволовых клеток в трансдуцируемых культурах, а также использование нетоксических кондиционирующих режимов перед инфузией большого количества модифицированных *ex vivo* CD34+ клеток [1]. Эти усилия

привели к появлению второй волны клинических испытаний генной терапии в конце 1990-х и начале 2000 годов, во время которых впервые были достигнуты явные клинические эффекты, особенно у пациентов с тяжелыми генетически детерминированными иммунодефицитными заболеваниями [2-4]. Однако в 2003 году поступило сообщение о первом серьезном побочном эффекте, связанном с генетической модификацией ГСК трансфицированных ретровирусными векторами [5-6]. В данном обзоре суммированы обнадеживающие результаты этих клинических исследований, приведены пояснения относительно побочных эффектов, связанных с генотоксичностью векторной интеграции, обсуждаются факторы, которые могут вызывать случаи генотоксичности, а также предложены подходы, которые могут сохранить или повысить клиническую эффективность генной терапии с задействованием гемопоэтических клеток-мишеней, при этом существенно снижая риск развития лейкемии и других побочных эффектов, связанных с включением вектора в геном.

Использование нереплицирующихся вирусных векторов для модификации гемопоэтических стволовых клеток: обнадеживающие результаты клинических испытаний

В 1999 году группа исследователей под руководством иммунолога Алана Фишера и Марии Каваццано-Кальво в госпитале Некер в Париже начала проводить клинические



испытания генной терапии у мальчиков с X-сцепленной тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (Х-ТКИН). У пациентов с Х-ТКИН отмечается глубокая дисфункция иммунной системы, которая является результатом мутаций γ -компонента субъединицы рецептора цитокина, необходимого для формирования ответа к интерлейкинам (IL) 2, IL4, IL7, IL9 и другим цитокинам, которые в свою очередь необходимы для пролиферации, созревания и функционирования клеточных компонентов иммунной системы. У пациентов с Х-ТКИН полностью отсутствуют Т-клетки и NK-клетки, отмечается глубокая дисфункция В-клеток. Если таким детям не проведена аллогенная трансплантация стволовых клеток, то они неизменно погибают в раннем детстве. При отсутствии совместимого донора пациенту может быть выполнена гаплоидентичная трансплантация, но ее исходы обычно неблагоприятны.

У пациентов с Х-ТКИН были взяты CD34+ клетки аутологичного костного мозга, культивированы в присутствии стандартного ретровирусного вектора, продуцирующего γ трансген, и реинфузированы без аблативного кондиционирования. У 10 из 11 пациентов, участвовавших в исследовании, произошло быстрое и устойчивое восполнение количества Т и В клеток и восстановление В-клеточных функций [7,8]. Все Т-клетки содержали и продуцировали γ -трансген вектора в отличие от В-клеток и клеток миелоидного ростка, у которых этот эффект наблюдался с гораздо меньшей частотой. Это было неудивительно, так как до трансплантации пациентам не проводили миелоаблативное кондиционирование, а, в отличие от Т-клеточной популяции, у генетически модифицированных клеток нет селективного преимущества для В-клеток и клеток миелоидной линии. В течение нескольких месяцев эти пациенты прекратили принимать антимикробные препараты и продемонстрировали ответ на применение вакцин. Они показывали многообразие форм Т-клеток, как показывали Т-клеточные рецепторы (TCR), содержащие множество сайтов внедрения векторов. Несколькими годами позже в Великобритании в госпитале Great Ormond Street было начато второе исследование по лечению Х-ТКИН, которое также показало очень обнадеживающие результаты. Это исследование имело такой же дизайн подбора пациентов, применялись CD34+ клетки – мишени костного мозга и те же векторные структуры для переноса генов, но имелись небольшие различия в условиях содержания трансдуцированной культуры клеток [4].

Вторым врожденным синдромом иммунодефицита, успешно пролеченным с использованием генетически модифицированных ГСК, был дефицит аденозиндезаминазы (АДА). При этом заболевании количество и функции Т-, В- и NK-клеток снижено в связи с недостатком фермента АДА, который предотвращает аккумуляцию метаболитических токсинов в лимфоидных клетках. Для этих пациентов также характерно многообразие различных неиммунных метаболитических отклонений, которые неблагоприятно отражаются на росте и развитии ребенка и качестве его жизни. Несколько исследований по оценке возможности использования генной терапии были проведены в начале 1990-х годов, когда пациентам вводили аутологичные лимфоциты или CD34+ клетки, модифицированные с помощью ретровирусных векторов, снабженных геном АДА. Но при этом наблюдалась недоста-

точная трансгенная экспрессия, низкая приживаемость генетически модифицированных клеток. Также у этих пациентов продолжали проводить заместительную терапию АДА, что в целом привело к недостатку видимых клинических преимуществ генной терапии [9-11]. В отличие от Х-ТКИН, трансдуцированные CD34+ клетки не приживались на том уровне, который мог бы повлечь за собой клинические преимущества в том случае, если до начала трансплантации не проводилась миелосупрессивная терапия. Исследователи из Милана сообщали о том, что лечение бусульфаном в умеренных дозах до инфузии трансдуцированных ретровирусом аутологичных CD34+ клеток хорошо переносилось пациентами и приводило к стабильной экспрессии гена АДА с восстановлением количества Т-клеток и нормализации иммунной функции [3]. Эти пациенты не получали ферментативную заместительную терапию PEG-АДА (пэгелированный-АДА), что благоприятно отразилось на выживании и экспансии модифицированных Т-клеток.

Побочные реакции, связанные с трансдукцией векторов

Оптимизм, связанный с обнадеживающими результатами клинических исследований, резко уменьшился в конце 2002 года, когда через 3 года после трансплантации генетически модифицированных CD34+ клеток у 2 мальчиков из первого клинического испытания по лечению Х-ТКИН развился Т-клеточный лейкоз [6]. У обоих пациентов анаплазированные Т-клетки были клональными и содержали вектор. У первого ребенка опухолевые клетки содержали интегрированный вектор в первом интроне гена Lmo2, а у второго - немного выше этого же локуса, которые кодируют транскрипцию фактора Ромботин-2Б, необходимого для развития лимфатической ткани. Этот фактор активируется хромосомными транслокациями в некоторых случаях спонтанных Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) человека [12]. mPНК Ромботина-2 выделялась из большого количества лейкозных клеток, что сочеталось с присутствием продуцирующего Ромботин-2 Lmo2 аллеля, содержащего векторные вставки. В то же время γ -трансген оставался не мутировавшим и определялся в нормальных количествах, а IL2R не имел признаков аномальной активности в опухолевых клетках. Позже исследователи показали, что еще у двух пациентов, участвовавших в исследовании, развилась Т-клеточная пролиферация более чем через 3 года после трансплантации, хотя подробности этих случаев с молекулярной точки зрения еще не опубликованы [7]. Все пациенты с лейкозом после генной терапии были восприимчивы к химиотерапии и вышли в ремиссию, но 1 пациент умер после аллогенной трансплантации стволовых клеток от совместимого неродственного донора, предпринятой для лечения рецидива заболевания.

Тот факт, что вектор-индуцированные лейкозы возникали только у пациентов с Х-ТКИН, а не при других видах иммунодефицитов, получавших CD34+ клетки, модифицированные ретровирусным вектором, послужило толчком к изучению роли специфических факторов при Х-ТКИН в развитии этого побочного эффекта. Возник вопрос: все ли пациенты, получившие аутологичные CD34+ клетки или другие клетки, модифицированные интеграцией ретровируса, находятся в группе риска или только пациенты с Х-ТКИН? Ответ имеет важные последствия



для дальнейшего клинического развития генной терапии с интегрированными векторами. Обнаружение того факта, что оба гена, *cγ* и *Lmo2*, были одновременно активированы при Т-клеточной лимфоме мышей, которая развилась после инфицирования мышей реплицирующимся ретровирусом, может свидетельствовать о существовании уникальной связи между этими генами, когда они aberrантно активируются вирусными энхансерами [13]. В одном из исследований гиперпродукция *cγ*-трансгена в клетках костного мозга мышей привела к высокой частоте Т-клеточного лейкоза, однако эти результаты были неоднозначными, и другими исследованиями не подтвердились [14,15]. В основном уровень продукции *cγ*-трансгена и сигналы, подаваемые зрелым Т-клеткам, находились в пределах нормы у пациентов с Х-ТКИН, получавших генную терапию. Однако представляется возможным, что частичная экспрессия трансгена, имевшая место во время эволюции Т-клеток, могла принять участие в последующем aberrантном поведении этих клеток. Вторым важным фактором, который повышает риск развития мутаций в дальнейшем и, в конечном итоге, лейкемии у пациентов с Х-ТКИН, может быть очень быстрая экспансия Т-клеток после трансдукции предшественников Т-клеток, созревание которых было блокировано.

Генотоксичность трансдуцированных ретровирусов

Вирусологи и исследователи в сфере генной терапии были обеспокоены проблемой потенциальной генотоксичности и риска лейкемогенеза, ассоциированного с трансфецированными ретровирусами, с тех пор, как они были созданы в качестве векторов для переноса генов. Известно несколько механизмов, посредством которых интегрированная провирусная ДНК ретровируса может быть онкогенной, путем позитивной регуляции экспрессии смежных протоонкогенов сильными энхансерами и промоторами вируса, или инактивацией генов репрессии опухоли путем разрыва экзона или элементов позитивной регуляции. Стандартные ретровирусные векторы изначально получают из вируса лейкемии мышей Молони (MLV). Реплицирующийся дикий тип штамма данного вируса индуцирует тимические лимфомы у восприимчивых новорожденных мышей, несмотря на отсутствие онкогена в закодированной последовательности вирусного генома. Опухоли возникают только у мышей, инфицированных реплицирующимся вирусом дикого типа в процессе активного развития тимуса. Каждая опухоль имеет большое количество трансфецированных тел вируса, и исследователи предположили, что повторная интеграция провирусов MLV в геном предшественников Т-клеток в тимусе может привести к активации протоонкогенов. Определенные протоонкогены, такие как *rim* и *tus*, оказались сайтами повторной трансфекции в данных лимфомах. В 1992 году, Т-клеточная лимфома была диагностирована у 3-х макак резус, получивших трансплантаты аутологичных CD34+ клеток, трансдуцированных с помощью вектора MLV, зараженного реплицирующимися телами рекомбинантного вируса [16]. Данные опухоли содержали большое количество инсерций провируса, однако, развития опухолей, связанных с применением реплицирующихся векторов, в первые 15 лет их использования для трансдукции гемопоэтических стволовых клеток ни у мышей, ни у человекоподобных приматов или пациентов

отмечено не было. Поэтому было сделано предположение, что уровень виремии трансдуцированных векторов приводит к небольшому количеству анаплазированных клеток, адекватно выбраковывающихся иммунной системой. Размер генома млекопитающих, мультифакторная теория возникновения рака и ранние исследования, выполненные до того, как была расшифрована полная последовательность генома мышей и человека, подтверждающая случайную интеграцию MLV, были дополнительными факторами, служащими для подтверждения очень низкого риска лейкемогенеза при применении дефектных в отношении репликации вирусных векторов [17].

Расшифровка полной последовательности генома человека и мышей и создание основанной на ПЦР (полимеразная цепная реакция) методологии определения большого числа сайтов интеграции провирусов привели к пересмотру имеющихся эталонов в осуществлении интеграции провирусов. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и векторные системы на основе ВИЧ преимущественно интегрируются в активно экспрессируемые гены линий Т-клеток, векторные системы на основе MLV (вирус лейкемии мышей) преимущественно интегрируются в зоне 5' сайтов старта транскрипции генов в линиях фибробластов [18, 19]. Данные системы значительно более предсказуемы в отношении повышенного риска нарушения экспрессии генов после трансфекции вектора, по сравнению со случайной интеграцией.

Группа Hematti P. выполнила широкомасштабный анализ сайтов интеграции в гранулоцитах и лимфоцитах, образовавшихся после предварительного приживления трансдуцированных ретровирусом и лентивирусом CD34+ клеток у макак резус в течение от нескольких месяцев до нескольких лет [20]. Векторы на основе вируса MLV и вируса иммунодефицита обезьяны (ВИО) были внедрены в соответствующие гены или вблизи них, при этом инсерция ВИО распространилась по всей длине гена, а инсерция MLV сконцентрировалась возле сайтов старта транскрипции. Проведенный в последнее время обширный анализ интеграции при исследовании генной терапии при Х-сцепленном ТКИН и дефиците АДА (аденозиндеаминазы) выявил подобные данные и для MLV векторов [21-23]. В таблице 1 приведены имеющиеся в настоящее время данные относительно механизмов интеграции данных и других систем переноса генов. Данная информация подтверждает то, что каждый вирус взаимодействует с различными клеточными кофакторами при интеграции в ДНК.

Большой набор данных относительно сайтов интеграции мышей, не человекоподобных приматов и людей, используемый при проведении клинических исследований, также продемонстрировал убедительные доказательства влияния специфических интеграций на выживание, приживления и/или пролиферацию трансдуцированных примитивных клеток-предшественников гемопоэза, даже при отсутствии лейкемической трансформации. Основываясь на размере генома и количестве определяемых сайтов интеграции, обнаружение более чем одной независимой интеграции векторной системы в конкретном гене или расположенной в зоне в пределах 30-100 kb относительно друг друга получило название «общие сайты интеграции» (CIS) и, при обнаружении в независимых опухолях на моделях с использованием реплицирующейся векторной системы, представляется как причина развития опухоли [24].



Механизмы интеграции и генотоксичность различных векторных систем

Векторная система	Избирательная интеграция	Связанные с вектором клональные эффекты
MLV ретровирус	Последовательности генов, сайты старта транскрипции (TSS), экспрессируемые гены [19,20]	Т-клеточные лейкомии при испытаниях при ТКИД-Х, острая миелоидная лейкомия у резус-макак, опухоли системы гемопоэза у мышей [6,26,33]
ВИЧ или ВИО лентивирус	Последовательности генов, экспрессируемые гены, ассоциированные с транскрипцией модификации гистонов [18,37,41]	Небольшая частота по сравнению с MLV при испытаниях SGK (стволовые гемопоэтические клетки) моделей склонных к возникновению опухолей мышей
EIAV лентивирус	Последовательности генов, активно экспрессируемые гены [42]	Опухоли печени после введения новорожденным [43]
«Пенящийся вирус» человека	Нет избирательности в отношении экспрессируемых генов, избирательность к островку CpG	Нет данных
Вирус саркомы птиц, вирус лейкоза	Небольшая избирательность в отношении активных генов, нет избирательности к TSS [37]	Нет данных
Интеграза фага ϕ 31	Избирательность в отношении псевдо-att сайтов [40]	Нет данных
Транспозон «Спящей красавицы»	Небольшая избирательность в отношении генов и избирательность к TSS в микросателлитных регионах [44]	Нет данных
Нуклеазы цинковых пальцев	Специфические последовательности, избираемые цинковыми пальцами [39]	Нет данных
Адено-ассоциированный вирус	Интеграция в «горячие точки», активные гены, островки CpG, TSS [45]	Опухоли печени, сомнительно [46,47]

Большой набор данных относительно сайтов интеграции мышей, не человекоподобных приматов и людей, используемый при проведении клинических исследований, также продемонстрировал убедительные доказательства влияния специфических интеграций на выживание, приживления и/или пролиферацию трансдуцированных примитивных клеток-предшественников гемопоэза, даже при отсутствии лейкемической трансформации. Основываясь на размере генома и количестве определяемых сайтов интеграции, обнаружение более чем одной независимой интеграции векторной системы в конкретном гене или расположенной в зоне в пределах 30-100 kb относительно друг друга получило название «общие сайты интеграции» (CIS) и, при обнаружении в независимых опухолях на моделях с использованием реплицирующейся векторной системы, представляется как причина развития опухоли [24].

Проведенный анализ интеграций в гранулоцитах после аутологичной трансплантации MLV-трансдуцированных CD34+ клеток макак резус выявил, что локус Mds1/Evi1 генома встречается в избытке, составляя 2% всех сайтов генетической карты [25]. Данные клоны были обнаружены только в миелоидной линии и до настоящего времени не ассоциировались с развитием лейкомии. Однако привлекает внимание то, что данный локус также являлся сайтом трансфекции вектора у экспериментальной мыши, у которой развилась ассоциированная с реплицирующимся вектором миелоидная опухоль [26].

В последних клинических исследованиях при хроническом гранулематозе (CGD), у 2 пациентов изначально обнаруживался высокий уровень ген-корректированных

гранулоцитов и наблюдалась ликвидация серьезных хронических инфекций [27]. Однако несколько месяцев спустя после трансплантации, уровень ген-корректированных клеток постепенно повысился с 5% до 10% и так далее вплоть до 50%, и данная экспансия происходила за счет клонального доминирования клеток с инсерциями MLV-векторов в регион Mds1/Evi1. У одного пациента прекратилась экспрессия корректирующего трансгена и он умер вследствие инфекции, второй пациент остался в нормальном состоянии, без развития аномального гемопоэза или лейкомии. Первичные клетки костного мозга мышей, трансдуцированные MLV-векторами, культивировались *in vitro*, и несколько недель спустя образовалась линия миелоидных клеток с заблокированной программой апоптоза. Все они содержали инсерцию вектора, активирующую локус гена Mds1/Evi1, тесно связанный гомологичный локус, или расположенный выше, но также активирующий экспрессию Evi1 [28].

Белки, кодируемые генами Evi1 или Mds1/Evi1 альтернативно сплайсированной мРНК, являются факторами транскрипции, обладающими ДНК-связывающей активностью [29]. Их функция еще недостаточно понятна, но имеются сообщения о случаях спонтанных миелоидных лейкозов человека с транслокациями, активирующими этот локус, а гиперэкспрессия Evi1-изоформ является неблагоприятным прогностическим фактором при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) человека [30]. Вместе эти данные свидетельствуют о том, что вставки, которые расположены непосредственно в или около генного комплекса Mds1/Evi1 примитивных гемопоэтических кле-



ток, могут оказывать значительное влияние на поведение клеток, блокируя в миелоидных клетках–предшественниках программу апоптоза или, напротив, снижая их выживаемость [31,32]. Макака резус, которой 5 лет назад была проведена трансплантация ВЛМ-трансдуцированных CD34+ клеток, умерла от ОМЛ, причем в опухолевых клетках была обнаружена векторная активация анти-апоптотического гена Bcl2A1 [33]. Создание векторов на основе ВЛМ для клинического применения, мишенью которых являются гемопоэтические стволовые клетки, почти полностью остановилось в 2005 году. В это время исследователи переоценили соотношение риска-выгоды на основании данных о побочных эффектах, выявленных во время исследования у пациентов с Х-ТКИН и появления новых данных об особенностях векторной интеграции и генотоксичности.

Подходы к снижению риска генотоксичности

В настоящее время разрабатывается ряд модификаций векторных конструкций для снижения риска генотоксичности интегрирующихся вирусных векторов. Судя по всему, у пациентов с ВИЧ-инфекцией не развиваются опухоли, связанные с интеграцией, а в опытах с животными моделями векторы-производные ВИЧ обладали меньшей лейкемогенностью, чем стандартные ретровирусные векторы на основе вируса лейкемии мышей (ВЛМ) [34]. Это, вероятно, является результатом более безопасного вида интеграции, при которой центры интеграции ВИЧ и ВЛО расположены вдоль генов в отличие от кластерного расположения в начале транскрипции, где активация прилежащего гена является более вероятной [19,20]. При этом векторы, созданные на основе ВИЧ и родственных ему ВЛО были разработаны на основе удаления большого числа участков элементов-усилителей в длинных концевых повторах на любом конце интегрированных провирусных форм. Этот дизайн (так называемый «самоинактивирующийся») был изначально избран для того, чтобы снизить риск репликации векторной системы с эндогенным ВИЧ у пациентов, получавших трансдуцированные клетки. Такой дизайн конструкции также может обладать дополнительными преимуществами – так как в этом случае снижается вероятность активации прилежащих протоонкогенов. Векторные системы, созданные на основании ВЛМ, также могут быть модифицированы в «самоинактивирующийся» дизайн. Одно исследование показало более низкий риск активации генов роста после трансдукции самоинактивирующихся векторов по сравнению со стандартными MLV векторами [35]. Мощные внутренние промоторы, необходимые для проведения адекватной экспрессии трансгенной конструкции, также могут активировать и прилежащие протоонкогены, так что даже векторы с самоинактивирующимся дизайном могут оказаться генотоксичными посредством актива-

ции или инактивации прилежащих к зоне интеграции генов. Для снижения влияния векторных элементов на окружающий их геном, и наоборот – для того, чтобы защитить экспрессию трансгена от позиционных эффектов, связанных с центром интеграции в векторную конструкцию могут быть добавлены элементы ДНК, известные как «инсуляторы» [36]. Было показано, что несколько других ретровирусов, включая «пенистый вирус человека» и вирус саркомы птиц, обладают более произвольным интеграционным поведением, при котором не поражаются гены и поэтому с меньшей вероятностью активируются прото-онкогены [37,38]. Однако даже произвольное интеграционное поведение может быть ассоциировано с некоторым риском генотоксичности, особенно в ситуациях, когда имеют место множественные векторные вставки в клетки-мишени.

В настоящее время разрабатывается ряд подходов для целенаправленной интеграции в специфические участки генома. Конечной целью является коррекция дефектного гена путем гомологичной рекомбинации. Альтернативой может стать использование интегразы, которая поражает один или более специфичных участков генома, удаленных от протоонкогенов, что может быть безопаснее, чем вирусные векторы, предпочитаемые в настоящее время для трансфекции. Наиболее впечатляет возможность создания нуклеаз «цинковых пальцев», которые прикрепляются к специфическим фрагментам ДНК, окружая последовательность гена, нуждающегося в коррекции, и затем продуцируют двухцепочечные отрезки ДНК, способствуя гомологично-направленному восстановлению. Так в 2005 году исследователи из Сангамо сообщили о коррекции Х-ТКИН дефекта в 7% первичных Т-клеток человека [39].

Бактериофаг $\phi 31$ содержит интегразу, которая направляет интеграцию к нескольким специфичным «добавочным» участкам бактериального генома. Chalberg и соавторы сообщают о том, что геном млекопитающих содержит псевдо-добавочные участки, которые используются как объекты предпочтительной интеграции трансгенов, переносимых плазмидами, также содержащими $\phi 31$ интеграционный отрезок в присутствии $\phi 31$ интегразы [40]. Наибольшей проблемой этого и других подходов использования невирусной интеграции генов является создание эффективного и нетоксичного метода транспорта нового генетического материала в ядро клеток-мишеней. Физические и химические методы в целом являются высокотоксичными по отношению к гемопоэтически клеткам, несмотря на то, что имеют высокую транспортную эффективность. Токсичными являются и устройства для электропорации CD34+ клеток, изучаемые в условиях *ex vivo*. Для переноса трансгенов, интеграз или нуклеаз в клетки-мишени были созданы неинтегрирующие лентивирусные векторы. Эти подходы являются очень сложными и, по всей видимости, пройдут еще годы до их применения в клинической генной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Larochelle A, Dunbar CE. Genetic manipulation of hematopoietic stem cells // *Semin Hematol.* – 2004. – №41. – P.257-271.
2. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease // *Science.* – 2000. – №288. – P.669-672.
3. Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning // *Science.* – 2002. – №296. – P.2410-2413.
4. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, et al. Gene therapy of Xlinked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector // *Lancet.* – 2004. – №364. – P.2181-2187.
5. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for Xlinked severe combined immunodeficiency // *N Engl J Med.* – 2003. – №348. – P.255-256.



6. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 // *Science*. – 2003. - №302. – P.415-419.
7. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, de Saint BG, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies // *Immunity*. – 2001. - №15. – P.1-4.
8. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy // *N Engl J Med*. – 2002. - №346. – P.1185-1193.
9. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocytedirected gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years // *Science*. – 1995. - №270. – P.475-480.
10. Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, et al. Engraftment of genemodified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency // *Nat Med*. – 1995. - №1. – P.1017-1023.
11. Kohn DB, Hershfield MS, Carbonaro D, et al. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates // *Nat Med*. – 1998. - №4. – P.775-780.
12. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion // *Mol Ther*. – 2006. - №13. – P.15-25.
13. Dave UP, Jenkins NA, Copeland NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights // *Science*. – 2004. - №303. – P.333.
14. Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von KC, Verma IM. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma // *Nature*. – 2006. - №440. – P.1123.
15. Thrasher AJ, Gaspar HB, Baum C, et al. Gene therapy: XSCID transgene leukaemogenicity // *Nature*. – 2006. - №443. – P.E5-E6.
16. Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer // *J Exp Med*. – 1992. - №176. – P.1125-1135.
17. Cornetta K, Morgan RA, Anderson WF. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer to humans // *Hum Gene Ther*. – 1991. - №2. – P.5-14.
18. Schroder AR, Shinn P, Chen H, et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots // *Cell*. – 2002. - №110. – P.521-529.
19. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration // *Science*. – 2003. - №300. – P.1749-1751.
20. Hematti P, Hong BK, Ferguson C, et al. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells // *PLoS Biol*. – 2004. - №2. – P.2183-2190.
21. Schwarzwaelder K, Howe SJ, Schmidt M, et al. Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo // *J Clin Invest*. – 2007. - №117. – P.2241-2249.
22. Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, et al. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy // *J Clin Invest*. – 2007. - №117. – P.2225-2232.
23. Aiuti A, Cassani B, Andolfi G, et al. Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy // *J Clin Invest*. – 2007. - №117. – P.2233-2240.
24. Suzuki T, Shen H, Akagi K, et al. New genes involved in cancer identified by retroviral tagging // *Nat Genet*. – 2002. №32. – P.166-174.
25. Calmels B, Ferguson C, Laukkanen MO, et al. Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells // *Blood*. – 2005. - №106. – P.2530-2533.
26. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking // *Science*. – 2002. - №296. – P.497.
27. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. // *Nat Med*. – 2006. - №12. – P.401-409.
28. Du D, Copeland NG. Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary murine bone marrow progenitor cells // *Blood*. – 2005. - №106. – P.3932-3939.
29. Buonamici S, Chakraborty S, Senyuk V, Nucifora G. The role of EVI1 in normal and leukemic cells // *Blood Cells Mol Dis*. – 2003. - №31. – P.206-212.
30. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients // *Blood*. – 2003. - №101. – P.837-845.
31. Kustikova O, Fehse B, Modlich U, et al. Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking // *Science*. – 2005. - №308. – P.1171-1174.
32. Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis // *Blood*. – 2005. - №105. – P.4235-4246.
33. Seggewiss R, Pittaluga S, Adler RL, et al. Acute myeloid leukemia is associated with retroviral gene transfer to hematopoietic progenitor cells in a rhesus macaque // *Blood*. – 2006. - №107. – P.3865-3867.
34. Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration // *Nat Biotechnol*. – 2006. - №24. – P.687-696.
35. Modlich U, Bohne J, Schmidt M, et al. Cell culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity // *Blood*. – 2006. - №108. – P.2545-2553.
36. Evans-Galea MV, Wielgosz MM, Hanawa H, Srivastava DK, Nienhuis AW. Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector // *Mol Ther*. – 2007. - №15. – P.801-809.
37. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences // *PLoS Biol*. – 2004. - №2. – P.E234.
38. Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, et al. Foamy virus vector integration sites in normal human cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. - №103. – P.1498-1503.
39. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases // *Nature*. – 2005. - №435. – P.646-651.
40. Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, et al. Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome // *J Mol Biol*. – 2006. - №357. – P.28-48.
41. Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC, Bushman FD. HIV integration site selection: Analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications // *Genome Res*. – 2007. - №17. – P.1186-1194.
42. Hacker CV, Vink CA, Wardell TW, et al. The integration profile of ELAV-based vectors // *Mol Ther*. – 2006. - №14. – P.536-545.
43. Themis M, Waddington SN, Schmidt M, et al. Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice // *Mol Ther*. – 2005. - №12. – P.763-771.
44. Yant SR, Wu X, Huang Y, et al. High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals // *Mol Cell Biol*. – 2005. - №25. – P.2085-2094.
45. Nakai H, Wu X, Fuess S, et al. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver // *J Virol*. – 2005. - №79. – P.3606-3614.
46. Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, et al. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors // *Gene Ther*. – 2001. - №8. – P.1343-1346.
47. Bell P, Wang L, Lebherz C, et al. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice // *Mol Ther*. – 2005. - №12. – P.299-306.