

ВОПРОСЫ БЕЗОПАСНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

С.Е. Ипатов, С.А. Румянцев

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

Контакты: Сергей Александрович Румянцев s.roumiantsev@hiidg.ru

В настоящее время в научных кругах всего мира широко 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, которые позволят сохранить или повысить клиническую эффективность генной терапии с использованием в качестве мишеней гемопоэтических стволовых клеток при существенном снижении риска развития лейкемии и других побочных эффектов, связанных с включением вектора в геном.

Ключевые слова: генная терапия, генетические векторы

SAFETY ISSUES OF GENE THERAPY

S.E. Ipatov, S.A. Roumiantsev

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

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.

Key words: 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 I этапа клинических испытаний данной стратегии у человека. Эти испытания продемонстрировали мало фактов успешной модификации ГСК, поэтому исследователи на основании указаний специальной экспертной комиссии Национального Института здоровья США (1996) с участием других финансирующих организаций сфокусировали свои усилия на усовершенствовании векторов, более подробном изучении заболеваний — объектов генной терапии, и оптимизации методов отбора и культивирования ГСК *ex vivo*. Применение 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 (лиганд *flt3*, тром-

бопоэтин и фактор стволовых клеток в трансдуцируемых культурах), а также применение нетоксических кондиционирующих режимов перед инфузией большого числа 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 г. 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 позволят сохранить или повысить клиническую эффективность генной терапии с задействованием гемопоэтических клеток-мишеней при существенном снижении риска развития лейкемии и других побочных эффектов, связанных с включением вектора в геном.

Использование нереплицирующихся вирусных векторов для модификации ГСК: обнадеживающие результаты клинических испытаний

В 1999 г. группой исследователей под руководством иммунолога А. Фишера и М. Каваццано-Кальво в госпитале Некер в Париже начато проведение клинических испытаний генной терапии у мальчиков с X-сцепленной тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (Х-ТКИН). У пациентов с Х-ТКИН отмечена глубокая дисфункция иммунной системы, которая является результатом мутаций γ -компонента субъединицы рецептора цитокина, необходимого для формирования ответа к интерлейкинам (ИЛ) -2, -4, -7, -9 и другим цитокинам, которые в свою очередь нужны для пролиферации, созревания и функционирования клеточных компонентов иммунной системы. У пациентов с Х-ТКИН полностью отсутствуют Т- и НК-клетки, отмечается глубокая дисфункция В-клеток. Если таким детям не провести аллогенную трансплантацию стволовых клеток, то они неизменно погибнут в раннем детстве. При отсутствии совместимого донора больному может быть выполнена гаплоидентичная трансплантация, но ее исходы обычно неблагоприятны.

У пациентов с Х-ТКИН были взяты CD34⁺-клетки аутологичного костного мозга, которые затем культивировали в присутствии стандартного ретровирусного вектора, продуцирующего γ -трансген, и реинфузировали без аблативного кондиционирования. У 10 из 11 больных, участвовавших в исследовании, произошло быстрое и устойчивое восстановление числа 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 больные прекратили принимать антимикробные препараты и продемонстрировали ответ на применение вакцин. У них отмечено многообразие форм Т-клеток, выявленное по показаниям Т-клеточных рецепторов, содержащих множество сайтов внедрения векторов. Несколькими годами позже в Великобритании в госпитале Great Ormond Street было начато второе исследование по лечению Х-ТКИН, в котором были также получены очень обнадеживающие результаты. Это исследование имело такой же дизайн подбора пациентов, применяли CD34⁺-клетки-мишени костного мозга и те же векторные структуры для переноса генов, но имели место 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 число и функции Т-, В- и НК-клеток снижены в связи с недостатком фермента АДА, который предотвращает аккумуляцию метаболитических токсинов в лимфоидных клетках. Для этих больных также характерно многообразие различных неиммунных метаболитических отклонений, которые неблагоприятно отражаются на росте и развитии ребенка и качестве его жизни. Несколько исследований по оценке возможности применения 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. При этом наблюдались недостаточная трансгенная экспрессия, низкая приживаемость генетически модифицированных клеток. Также этим больным 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 проводилось миелосупрессивной терапии. 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 числа Т-клеток и нормализацией иммунной функции [3]. Эти больные не получали ферментативную заместительную терапию пегелированной АДА (PEG-АДА), что благоприятно отразилось на выживании и экспансии модифицированных Т-клеток.

Побочные реакции, связанные с трансдукцией векторов

Оптимизм, вызванный получением обнадеживающих результатов клинических исследований, резко уменьшился в конце 2002 г., когда через 3 года после выполнения трансплантации генетически модифицированных CD34⁺-клеток у 2 мальчиков, участвовавших в первом клиническом испытании по лечению Х-ТКИН, развился Т-клеточный лейкоз [6]. У обоих пациентов анаплазированные Т-клетки были клональными и имели вектор. У первого ребенка опухолевые клетки содержали интегрированный вектор в первом интроне гена Lmo2, а у второго — немного выше этого же локуса, который кодирует транскрипцию фактора Ромб-тин-2Б, необходимого для развития лимфатической ткани. Этот фактор активируется хромосомными транслокациями в некоторых случаях спонтанных Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) человека [12]. Следует отметить, что

мРНК Ромботина-2 выделялась из большого числа лейкозных клеток, что сочеталось с присутствием продуцирующего Ромботин-2 Lmo2-аллеля, содержащего векторные вставки. В то же время γ -трансен оставался не мутировавшим и определялся в нормальных количествах, а ИЛ-2 не имел признаков аномальной активности в опухолевых клетках. Позже исследователи показали, что еще у 2 больных, 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, развившимся после генной терапии, были восприимчивы к химиотерапии, у них была достигнута ремиссия, однако 1 больной умер после проведения 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, послужил толчком к изучению роли специфических факторов при Х-ТКИН в развитии этого побочного эффекта. Возник вопрос: все ли больные, получившие аутологичные CD34⁺-клетки или другие клетки, модифицированные интеграцией ретровируса, находятся в группе риска или только пациенты с Х-ТКИН? Ответ будет иметь важные последствия для дальнейшего клинического развития генной терапии с интегрированными векторами. Обнаружение того, что оба гена, γ и Lmo2, были одновременно активированы при Т-клеточной лимфоме мышей, развившейся после инфицирования мышей реплицирующимся ретровирусом, может свидетельствовать о существовании уникальной связи между этими генами, когда они аберрантно активируются вирусными энхансерами [13]. В одном из исследований гиперпродукция γ -трансгена в клетках костного мозга мышей привела к высокой частоте развития Т-клеточного лейкоза, однако эти результаты были неоднозначными и другими исследователями не подтвердились [14, 15]. В основном уровень продукции γ -трансгена и сигналы, подаваемые зрелым Т-клеткам, находились в пределах нормы у пациентов с Х-ТКИН, получавших генную терапию. Тем не менее представляется возможным, что частичная экспрессия трансгена, имевшая место во время эволюции Т-клеток, могла принять участие в последующем аберрантном поведении этих клеток. Вторым важным фактором, повышающим риск развития мутаций в дальнейшем и, в конечном итоге, лейкомии у пациентов с Х-ТКИН, может быть очень быстрая экспансия Т-клеток после трансдукции их предшественников, созревание которых было заблокировано.

Генотоксичность трансдуцированных ретровирусов

Вирусологи и исследователи в сфере генной терапии были обеспокоены проблемой потенциальной генотоксичности и риска лейкомогенеза, ассоциированного с трансфицированными 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 (ВЛМ) Молони. 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 число трансфицированных тел вируса, и исследователи предположили, что повторная интеграция провирусов ВЛМ в геном предшественников Т-клеток в тимусе может привести к активации протоонкогенов. Определенные протоонкогены, такие как *rim* и *mus*, оказались сайтами повторной трансфекции в данных лимфомах. В 1992 г. Т-клеточная лимфома была диагностирована у 3 макаков-резус, получивших трансплантаты аутологичных CD34⁺-клеток, трансдуцированных с помощью вектора ВЛМ, зараженного реплицирующимися телами рекомбинантного вируса [16]. Данные новообразования содержали большое количество инсерций провируса, однако развития опухолей, связанных с применением реплицирующихся векторов в первые 15 лет их использования для трансдукции ГСК ни у мышей, ни у человекоподобных приматов или пациентов не отмечено. В связи с этим было сделано предположение, что уровень вирусии трансдуцированных векторов приводит к появлению небольшого числа 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 ВЛМ, были дополнительными факторами, служащими для подтверждения очень низкого риска лейкомогенеза при применении дефектных в отношении репликации вирусных векторов [17].

Расшифровка полной последовательности генома человека и мышей и создание основанной на полимеразной цепной реакции (ПЦР) методологии определения большого числа сайтов интеграции

провирусом привели к пересмотру имеющихся эталонов в ее осуществлении. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и векторные системы на его основе преимущественно интегрируются в активно экспрессируемые гены линий Т-клеток, векторные системы на основе ВЛМ — в линиях фибробластов в зоне 5' сайтов старта транскрипции генов [18, 19]. Данные системы значительно более предсказуемы в отношении повышенного риска нарушения экспрессии генов после трансфекции вектора по сравнению со случайной интеграцией.

Р. Nematti и соавт. [20] выполнили широко-масштабный анализ сайтов интеграции в гранулоцитах и лимфоцитах, образовавшихся после предварительного приживления трансдуцированных ретровирусом и лентивирусом CD34⁺-клеток у макак-резус в период от нескольких месяцев до нескольких лет. Векторы на основе вируса ВЛМ и вируса иммунодефицита обезьяны (ВИО) были внедрены в соответствующие гены или вблизи них, при этом инсерция ВИО распространилась по всей длине гена, а инсерция ВЛМ сконцентрировалась возле сайтов старта транскрипции. При проведенном недавно обширном анализе интеграции при исследовании генной терапии при Х-ТКИН и дефиците АДА получены подобные данные и для ВЛМ-векторов [21—23]. В таблице приведены имеющиеся в настоящее время данные о механизмах интеграции этих и других систем переноса генов. Данная информация подтверждает то, что каждый вирус взаимодействует с различными клеточными ко-факторами при интеграции в ДНК.

Большой набор данных относительно сайтов интеграции мышей, нечеловекоподобных приматов и людей, используемых при проведении клинических исследований, также продемонстрировал убедительные доказательства влияния специфических интеграций на выживание, приживление и/или пролиферацию трансдуцированных примитивных клеток-предшественников гемопоэза даже при отсутствии лейкемической трансформации. На основании размера генома и количества определяемых сайтов интеграции обнаружение более чем одной независимой интеграции векторной системы в конкретном гене или нескольких, расположенных в зоне в пределах 30—100 кб относительно друг друга, получило название «общие сайты интеграции» (CIS), и при выявлении в независимых опухолях на моделях с использованием реплицирующейся векторной системы представляется как причина развития опухоли [36].

Анализ интеграций в гранулоцитах, проведенный после аутологичной трансплантации ВЛМ-трансдуцированных CD34⁺-клеток макак-резус, выявил, что локус Mds1/Evi1-генома встречается в избытке и составляет 2% всех сайтов генетической карты [37]. Данные клоны были обнаружены только в миелоидной линии и до настоящего времени не ассоциировались с развитием лейкемии. Однако привлекает внимание то, что данный локус также являлся сайтом трансфекции вектора у экспериментальной мыши, у которой развилась ассоциированная с реплицирующимся вектором миелоидная опухоль [24].

Механизмы интеграции и геноотоксичность различных векторных систем

Векторная система	Избирательная интеграция	Связанные с вектором клональные эффекты
ВЛМ-ретровирус	Последовательности генов, сайты старта транскрипции (CCT), экспрессируемые гены [19, 20]	Т-клеточные лейкемии при испытаниях при Х-ТКИН, ОМЛ* у резус-макак, опухоли системы гемопоэза у мышей [6, 24, 25]
ВИЧ-или ВИО-лентивирус	Последовательности генов, экспрессируемые гены, ассоциированные с транскрипцией модификации гистонов [18, 26, 29]	Небольшая частота по сравнению с ВЛМ при испытаниях ГСК-моделей, склонных к возникновению опухолей мышей
EIAV-лентивирус	Последовательности генов, активно экспрессируемые гены [30]	Опухоли печени после введения новорожденным [31]
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 CCT [26]	Нет данных
Интеграза фага φ31	Избирательность в отношении псевдо-att-сайтов [28]	Нет данных
Транспозон «спящей красавицы»	Небольшая избирательность в отношении генов и избирательность к CCT в микросателлитных регионах [32]	Нет данных
Нуклеазы «цинковых пальцев»	Специфические последовательности, избираемые «цинковыми пальцами» [27]	Нет данных
Аденоассоциированный вирус	Интеграция в «горячие точки», активные гены, островки CpG, CCT [33]	Опухоли печени, сомнительно [34, 35]

*ОМЛ — острый миелоидный лейкоз.

В последних клинических исследованиях больных хроническим гранулематозом у 2 пациентов изначально выявлен высокий уровень ген-корректированных гранулоцитов и наблюдалась ликвидация серьезных хронических инфекций [27]. Спустя несколько месяцев после осуществления трансплантации содержание ген-корректированных клеток постепенно повысилось с 5 до 10% и далее вплоть до 50%, и данная экспансия происходила за счет клонального доминирования клеток с инсерциями ВЛМ-векторов в регион *Mds1/Evi1*. У одного больного прекратилась экспрессия корректирующего трансгена, и он умер из-за возникновения инфекции, второй пациент остался в нормальном состоянии без развития аномального гемопоэза или лейкемии. Первичные клетки костного мозга мышей, трансдуцированные ВЛМ-векторами, культивировались *in vitro*, и несколько недель спустя образовалась линия миелоидных клеток с заблокированной программой апоптоза. Все они содержали инсерцию вектора, активирующую locus гена *Mds1/Evi1*, тесно связанный гомологичный locus, или расположенный выше, но также активирующий экспрессию *Evi1* [39].

Белки, кодируемые генами *Evi1* или *Mds1/Evi1* альтернативно сплайсированной мРНК, являются факторами транскрипции, обладающими ДНК-связывающей активностью [40]. Их функция еще недостаточно изучена, но имеются сообщения о случаях возникновения спонтанных миелоидных лейкозов человека с транслокациями, активирующими этот locus, а гиперэкспрессия *Evi1*-изоформ является неблагоприятным прогностическим фактором при ОМЛ [41]. Все эти данные свидетельствуют о том, что вставки, расположенные непосредственно в генном комплексе *Mds1/Evi1* примитивных гематопозитических клеток или около него, могут оказывать значительное влияние на поведение клеток посредством блокировки в миелоидных клетках-предшественниках программы апоптоза или, напротив, снижения их выживаемости [42, 43]. Макака-резус, которой 5 лет назад была проведена трансплантация ВЛМ-трансдуцированных *CD34⁺*-клеток, умерла от ОМЛ, причем в опухолевых клетках у нее была обнаружена векторная активация антиапоптотического гена *Bcl2A1* [25]. Создание векторов для клинического применения на основе ВЛМ, мишенью которых являются ГСК, почти полностью остановилось в 2005 г. В это время исследователи переоценили соотношение риск—выгода 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

возникновения генотоксичности

В настоящее время разрабатывается ряд модификаций векторных конструкций для снижения ри-

ска развития 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 ВЛМ [44]. 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 с учетом 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, поскольку в этом случае снижается вероятность активации прилежащих протоонкогенов. Векторные системы, созданные на основании ВЛМ, также могут быть модифицированы в самоинактивирующийся дизайн. В исследовании U. Modlich и соавт. [45] показаны более низкий риск активации генов роста после трансдукции самоинактивирующихся векторов по сравнению со стандартными ВЛМ-векторами. Мощные внутренние промоторы, необходимые для проведения адекватной экспрессии трансгенной конструкции, также способны активировать и прилежащие протоонкогены, так что даже векторы с самоинактивирующимся дизайном могут оказаться генотоксичными посредством активации 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 [46]. Установлено, что несколько других ретровирусов, в том числе пенистый вирус человека и вирус саркомы птиц, обладают более произвольным интеграционным поведением, при котором не поражаются гены и поэтому с меньшей вероятностью активируются протоонкогены [26, 47]. Однако даже произвольное интеграционное поведение может быть ассоциировано с некоторым риском возникновения генотоксичности, особенно в ситуациях, когда имеют место множественные векторные вставки в клетки-мишени.

На данном этапе разрабатывается ряд подходов для целенаправленной интеграции в специфические участки генома. Конечной целью является

коррекция дефектного гена путем применения гомологичной рекомбинации. Альтернативой может служить использование интегразы, которая поражает один специфичный участок генома или более, удаленные 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, окружают последовательность гена, нуждающегося в коррекции, и затем продуцируют 2-цепочечные отрезки ДНК, что способствует гомологичнонаправленному восстановлению. Так, в 2005 г. исследователи из Сангамо сообщили о коррекции Х-ТКИН дефекта в 7% первичных Т-клеток человека [27].

Бактериофаг $\phi 31$ содержит интегразу, которая направляет интеграцию к нескольким специфичным «добавочным» участкам бактериального генома. T.W. Chalberg и соавт. [28] сообщают о том, что

геном млекопитающих содержит псевдоблабочные участки, которые используются как объекты предпочтительной интеграции трансгенов, переносимых плазмидами, также содержащими интеграционный отрезок $\phi 31$ в присутствии $\phi 31$ -интегразы. 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 гемопоэтическим клеткам, несмотря на то что имеют высокую трансгенную эффективность. Токсичными считаются 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-видимому, пройдут еще годы до их применения в клинической генной терапии.

Л и т е р а т у р а

- Larochelle A., Dunbar C.E. Genetic manipulation of hematopoietic stem cells. *Semin Hematol* 2004;41:257–71.
- Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669–72.
- Aiuti A., Slavin S., Aker M. et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002;296:2410–3.
- Gaspar H.B., Parsley K.L., Howe S. et al. Gene therapy of Xlinked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004;364:2181–7.
- 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;348:255–6.
- 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;302:415–9.
- Fischer A., Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F. et al. Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. *Immunity* 2001;15:1–4.
- 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;346:1185–93.
- Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D. et al. T-lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270:475–80.
- Kohn D.B., Weinberg K.I., Nolta J.A. et al. Engraftment of genemodified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995;1:1017–23.
- Kohn D.B., Hershfield M.S., 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;4:775–80.
- Nam C.H., Rabbitts T.H. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther* 2006;13:15–25.
- Dave U.P., Jenkins N.A., Copeland N.G. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science* 2004;303:333.
- Woods N.B., Bottero V., Schmidt M. et al. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 2006;440:1123.
- Thrasher A.J., Gaspar H.B., Baum C. et al. Gene therapy: XSCID transgene leukaemogenicity. *Nature* 2006;443:5–6.
- Donahue R.E., Kessler S.W., Bodine D. et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 1992;176:1125–35.
- Cornetta K., Morgan R.A., Anderson W.F. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer to humans. *Hum Gene Ther* 1991;2:5–14.
- Schroder A.R., Shinn P., Chen H. et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002;110:521–9.
- Wu X., Li Y., Crise B., Burgess S.M. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003;300:1749–51.
- Hematti P., Hong B.K., Ferguson C. et al. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primitive hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* 2004;2:2183–90.
- Schwarzmaier K., Howe S.J., Schmidt M. et al. Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest* 2007;117:2241–9.
- 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;117:2225–32.
- 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;117:2233–40.
- Li Z., Dullmann J., Schiedlmeier B. et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002;296:497.
- Seggewiss R., Pittaluga S., Adler R.L. et al. Acute myeloid leukemia is associated with retroviral gene transfer to hematopoietic progenitor cells in a rhesus macaque. *Blood* 2006;107:3865–7.
- Mitchell R.S., Beitzel B.F., Schroder A.R. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2004;2:234.
- Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L. et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005;435:646–51.
- Chalberg T.W., Portlock J.L., Olivares E.C. et al. Integration specificity of phage $\phi C31$ integrase in the human genome. *J Mol Biol* 2006;357:28–48.
- Wang G.P., Ciuffi A., Leipzig J. et al. HIV integration site selection: Analysis by massively parallel pyrosequencing reveals

association with epigenetic modifications. *Genome Res* 2007;17:1186–94.

30. Hacker C.V., Vink C.A., Wardell T.W. et al. The integration profile of EIAV-based vectors. *Mol Ther* 2006;14:536–45.

31. Themis M., Waddington S.N., Schmidt M. et al. Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Mol Ther* 2005;12:763–71.

32. Yant S.R., Wu X., Huang Y. et al. High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol* 2005;25:2085–94.

33. Nakai H., Wu X., Fuess S. et al. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol* 2005;79:3606–14.

34. Donsante A., Vogler C., Muzyczka N. et al. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 2001;8:1343–6.

35. Bell P., Wang L., Leberherz C. et al. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol Ther* 2005;12:299–306.

36. Suzuki T., Shen H., Akagi K. et al. New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet*

2002;32:166–74.

37. Calmels B., Ferguson C., Laukkanen M.O. et al. Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells. *Blood* 2005;106:2530–3.

38. Ott M.G., 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;12:401–9.

39. Du D., Copeland N.G. Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary murine bone marrow progenitor cells. *Blood* 2005;106:3932–9.

40. Buonamici S., Chakraborty S., Senyuk V., Nucifora G. The role of EVI1 in normal and leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31:206–12.

41. Barjesteh van Walwijk van Doorn-Khosrovani S., Erpelink C., van Putten W.L. et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003;101:837–45.

42. Kustikova O., Fehse B., Modlich U. et al. Clonal dominance of hematopoietic

stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 2005;308:1171–4.

43. Modlich U., Kustikova O.S., Schmidt M. et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 2005;105:4235–46.

44. 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;24:687–96.

45. Modlich U., Böhne J., Schmidt M. et al. Cell culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 2006;108:2545–53.

46. Evans-Galea M.V., Wielgosz M.M., Hanawa H. et al. Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector. *Mol Ther* 2007;15:801–9.

47. Trobridge G.D., Miller D.G., Jacobs M.A. et al. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1498–503.

АНОНСЫ, ОБЪЯВЛЕНИЯ

ОБЪЯВЛЕНИЕ КОНКУРСА НА СОИСКАНИЕ ПРЕМИИ ФРИЦА ЛАМПЕРТА

Приз Фрица Ламперта является совместной германо-российской научной премией в области исследований по детской гематологии и онкологии, на которую могут претендовать авторы с научной работой в клинической области или области изучения основ. Премия в размере 10 000 евро присваивается ежегодно фондом TRANSAID (ТРАНСЭЙД), основанным в пользу детей, больных раком, в городе Кобленц, Германия.

В 2010 г. награды будет удостоена научная работа в области клинических или лабораторных исследований, опубликованная или оформленная как монография в 2009 г. Претендентами может выступать также и коллектив авторов одной работы. При вручении приза лауреату необходимо представить реферат о своих результатах.

Заявители должны представлять немецко- или русскоговорящую сферу научных исследований.

Заявления с приложением послужного списка заявителя и самого научного труда представляются на английском языке в 5 экземплярах до 31 мая 2010 г. по адресу:

TRANSAID — Stiftung für krebserkrankte Kinder
Löhrstrasse 113
D-56068 Koblenz
Телефон +49 (0) 261 / 13 30 98 - 26
Телефакс +49 (0) 261 / 13 30 98 — 12
E-mail info@trans-aid.de
<http://www.trans-aid.de>

Координация в Москве: профессор доктор А. Румянцев;

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва
Отбор работ осуществляется экспертной комиссией с привлечением немецких и российских специалистов.