

Е.В. Богословская, Д.В. Глазкова, Г.А. Шипулин, В.В. Покровский

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Российская Федерация

Безопасность использования ретровирусных векторов в генной терапии

Ретровирусные векторы широко используют в генно-терапевтических исследованиях, они признаны эффективным инструментом для доставки генетических конструкций в клетки. Уникальной особенностью данных векторов является способность эффективно встраивать терапевтические гены в хромосому, что обеспечивает передачу генов дочерним клеткам и позволяет лечить заболевания, требующие генетической коррекции активно делящихся клеток, таких как гемопоэтические или клетки кожи. Ретровирусные векторы были успешно использованы в клинических испытаниях препаратов, направленных на лечение 2 форм тяжелых комбинированных иммунодефицитов и некоторых других врожденных заболеваний крови. Однако в нескольких случаях интеграция вектора в хромосому сопровождалась генотоксичностью и привела к развитию онкогематологического заболевания. В дальнейшем было показано, что генотоксичность не является неотъемлемой чертой всех ретровирусных векторов, а зависит от многих факторов. В настоящей статье рассматриваются вопросы безопасности применения различных ретровирусных векторов в генной терапии. Приведено описание современных векторов, обладающих свойствами, позволяющими избежать генотоксичности и других возможных побочных эффектов.

Ключевые слова: генная терапия, безопасность, ретровирусный вектор, инсерционный мутагенез, генотоксичность.
(Вестник РАМН. 2012; 10: 55–61).

Активно развивающееся направление медицины — генная терапия — в последние годы демонстрирует большие успехи в лечении заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми. Генотерапевтические препараты разрабатывают для лечения широкого спектра болезней, и результаты ряда клинических испытаний представляются весьма обнадеживающими [1]. Однако некоторые исследователи с осторожностью относятся к новому направлению в медицине и высказывают сомнения в отношении безопасности генно-терапевтических подходов. В настоящем обзоре мы осветили наиболее важные вопросы безопасности генно-терапевтических препаратов, в частности связанных с использованием ретровирусных векторов для доставки терапевтических генов в клетки.

Эффективность генной терапии во многом зависит от эффективности доставки терапевтических генов в клетки-мишени. Использование незацищенных («голых») ДНК-молекул, кодирующих гены, малоэффективно, т.к. защитные механизмы клетки надежно ограждают ее от внедрения чужеродного генетического материала. Поэтому для введения терапевтических генов

в клетки пациента используют специальные генные носители — векторы. Векторы могут быть как вирусной, так и невирусной природы [1]. По эффективности доставки вирусные векторы значительно опережают невирусные варианты, что неудивительно, поскольку механизмы введения вирусных генов в клетку совершенствовались в процессе длительной эволюции. К наиболее часто используемым вирусным векторам относятся векторы, сконструированные на основе аденовирусов, γ-ретровирусов, осповакцинного вируса, поксвирусов, аденоассоциированных вирусов, вируса герпеса и лентивирусов (рис. 1) [2]. Среди них векторы на основе ретровирусов (γ-ретровирусов, лентивирусов и др.) обладают уникальной способностью эффективно встраивать гены в хромосому. Использование интегрирующих вирусных векторов позволяет добиться длительной экспрессии терапевтического гена и передачи гена дочерним клеткам, что делает их незаменимым инструментом для введения терапевтических генов в гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Модификация ГСК требуется для лечения болезней крови, таких как тяжелые комбинированные иммунодефициты, β-талассемия, гемофилия и др.

E. V. Bogoslovskaya, D. V. Glazkova, G. A. Shipulin, V. V. Pokrovsky

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Safety of Retroviral Vectors in Gene Therapy

Retroviral vectors are widely used in gene therapy and found to be an effective tool for the delivery of genetic constructs into cells. A unique feature of these vectors is the ability to incorporate therapeutic genes into a chromosome that ensures its passage to all progeny cells and enables to cure the diseases requiring genetic correction of dividing cells such as hematopoietic cells or skin cells. Retroviral vectors have been successfully used in gene therapy clinical trials for the treatment of 2 forms of severe combined immunodeficiencies and some other hereditary malignancies in several patients. Later it was shown that genotoxicity is not a general feature of retroviral vectors but it depends on many factors. In the present article we discuss safety issues concerning the use of different retroviral vectors in gene therapy. The description of modern vectors which designed to avoid the genotoxicity and other possible side effects are given.

Key words: gene therapy, safety, retroviral vector, insertion mutagenesis, genotoxicity.
(Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2012. 10: 55–61).

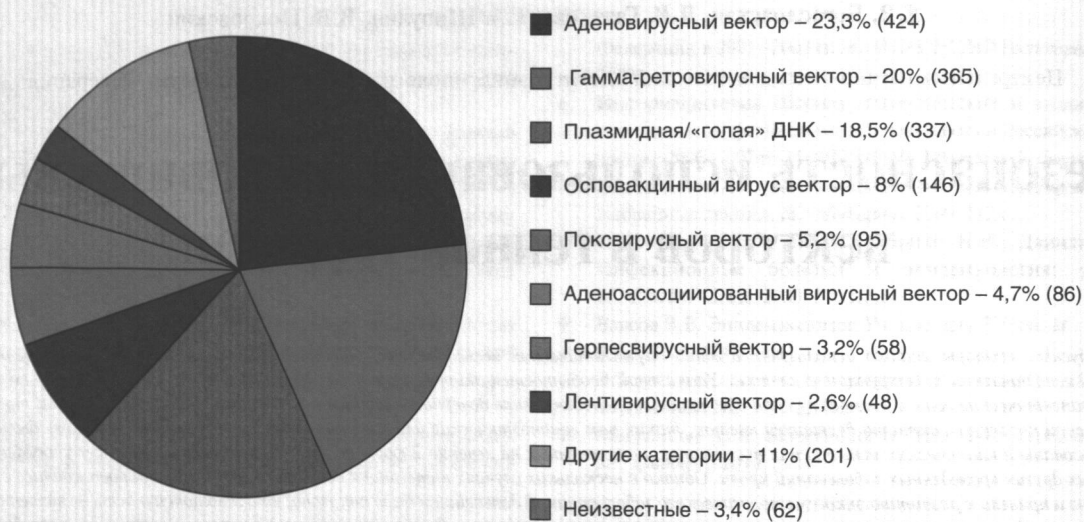


Рис. 1. Векторы, используемые в клинических испытаниях.

Примечание. Указано процентное отношение к общему числу клинических испытаний генно-терапевтических препаратов, проведенных/иницированных до января 2012 г. В скобках приведено число испытаний, проведенных/иницированных с использованием данного вектора.

Введение гена устойчивости к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) в ГСК делает все гемопоэтические клетки нечувствительными к этому вирусу и таким образом может в перспективе привести к излечению от ВИЧ-инфекции. С помощью генетической коррекции ГСК можно также лечить некоторые нейродегенеративные заболевания, что было продемонстрировано на примере X-сцепленной адренолейкодистрофии [3].

Важным направлением использования интегрирующих векторов является модификация клеток иммунной системы, позволяющая модулировать иммунный ответ в отношении определенных злокачественных или инфицированных клеток [4–6]. Кроме того, область применения ретровирусных векторов, по-видимому, будет расширена за счет их использования при лечении кожных заболеваний [7]. Показана возможность применения данных векторов и для лечения некоторых других заболеваний [8].

С точки зрения безопасности применения ретровирусных векторов в генной терапии, первые опасения были связаны с возможностью образования репликационно компетентных частиц [9], и основные усилия были направлены на предотвращение такой вероятности. Первым шагом в этом направлении стало использование векторов, из состава которых были удалены все вирусные гены, кодирующие структурные и регуляторные белки, а также вирусные ферменты. Удаление таких генов из состава вектора не дает ему возможности самостоятельно реплицироваться и производить новые вирусные частицы, т.е. репликационно компетентных вирусов (РКВ) не образуется. Кроме того, последовательности структурных генов, необходимые для упаковки вектора, были разделены между несколькими отдельными упаковочными плазмидами, которые не содержат гомологичных участков, что позволяет предотвратить образование РКВ за счет рекомбинации между плазмидами и вектором. Следующим шагом по предотвращению образования РКВ стало создание самоинактивирующихся векторов (СИН-векторов), которые не содержат участка

U3 длинного концевого повтора (*long terminal repeat, LTR*), включающего вирусный промотор и энхансер. После встраивания СИН-вектора в хромосому транскрипция терапевтического гена регулируется промотором, находящимся непосредственно перед этим геном, и образующаяся мРНК не содержит вирусных последовательностей, расположенных слева от промотора (рис. 2) [8, 10]. На сегодняшний день можно говорить о том, что вероятность образования РКВ исключительно мала, и ни в одном из клинических испытаний случаев присутствия РКВ зарегистрировано не было.

В то же время в клинических испытаниях генно-терапевтических препаратов, в которых были использованы различные вирусные векторы, обнаружили 2 серьезных побочных эффекта, которые могут угрожать жизни пациента: иммунный ответ на вводимый вектор и инсерционный мутагенез.

Вирусные антигены, присутствующие в векторе, способны вызывать иммунный ответ. В ряде случаев действие иммунной системы, направленной против вектора, бывает полезно, в частности, если речь идет о вакцинации или лизисе опухоли. Но в большинстве случаев такая реакция организма нежелательна, т.к. иммунный ответ, направленный против вектора, приводит к элиминации вектора и снижению числа модифицированных клеток. Более того, иммунный ответ сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также активацией клеточного иммунитета, направленного против собственных клеток, в которые был введен вектор, что может оказать губительное действие на организм. Так, сильнейший иммунный ответ на внутривенно введенный аденовирусный вектор, используемый для переноса терапевтического гена, стал причиной смерти пациента с редким нарушением метаболизма в 1999 г. [11].

Наибольшей иммуногенностью среди вирусных векторов обладают аденовирусные векторы. Все векторы, созданные на базе ретровирусов, слабоиммуногенны, так же, как и сами ретровирусы, поэтому иммунный ответ

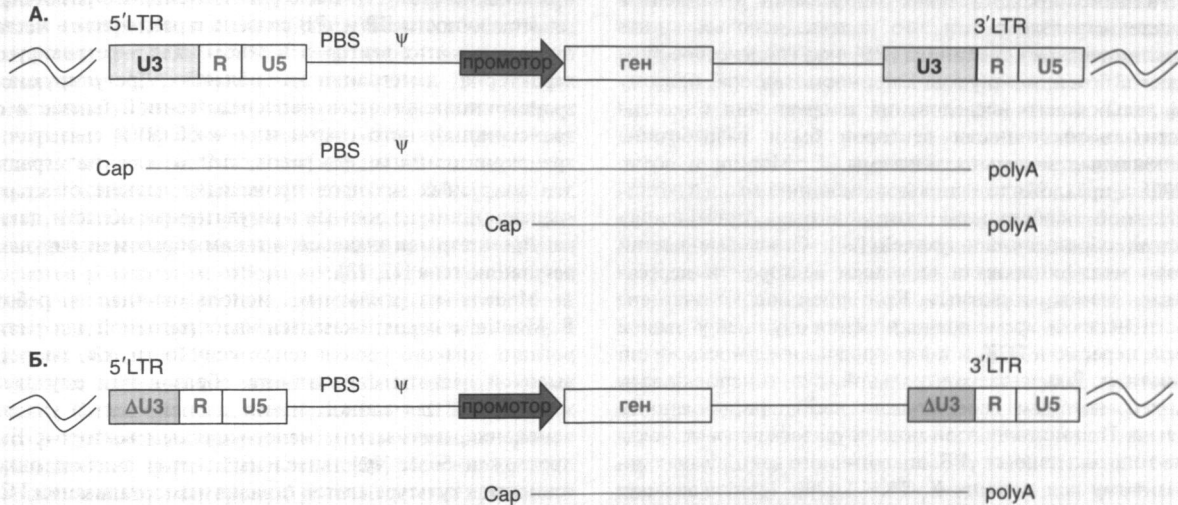


Рис. 2. Схема ретровирусных векторов после интеграции в хромосому.

Примечание. А. Вектор, содержащий полноразмерные длинные концевые повторы (LTR). Б. Самоинактивирующийся вектор.

Под схемой каждого вектора представлена соответствующая мРНК. PBS (primer binding site) — сайт связывания праймера для инициации обратной транскрипции; Ψ — последовательность, обеспечивающая упаковку РНК в вирусный капсид.

организма на их введение либо отсутствует, либо незначителен и не представляет опасности. Особенно это касается введения генов методом *ex vivo*, который используется для модификации ГСК. В данном случае изолированные клетки модифицируют в лаборатории и затем возвращаются пациенту, при этом в организм свободные псевдовирусные частицы практически не попадают, что еще больше снижает вероятность индукции иммунного ответа.

Другая проблема, требующая более детального рассмотрения, была связана с использованием LTR-содержащих γ-ретровирусных векторов (γРВ). У нескольких пациентов введение гена с помощью γРВ в ГСК привело к злокачественному перерождению клеток, которое было вызвано инсерционным мутагенезом. Данный эффект получил название «генотоксичность». Впервые генотоксичность была обнаружена во время проведения 2 (в Англии и во Франции) клинических испытаний препаратов, направленных на лечение X-сцепленного тяжелого комбинированного врожденного иммунодефицита (X-ТКИД) [12–15]. Детям, участвовавшим в испытании, была проведена аутологичная пересадка ГСК, в которые вводили ген γ-цепи рецептора интерлейкина 2 (ИЛ 2) при помощи γРВ. У 17 из 20 пациентов лечение прошло успешно и привело к полному восстановлению иммунитета. Однако, к сожалению, у 4 из 10 детей, принявших участие в испытании во Франции, и у 1 из 10 детей — в Англии интеграция вектора вызвала развитие лейкемии через 2–6 лет после пересадки ГСК. Было установлено, что в нескольких случаях причиной неконтролируемого клеточного роста стала активация протоонкогена *LMO2*, вызванная энхансером в LTR, входящим в состав γРВ [12, 16]. В дальнейшем еще один случай лейкемии был зарегистрирован при испытании препарата для лечения синдрома Вискотта–Олдрича, который также был создан на базе γРВ, содержащего полноразмерные LTR [17]. Другим свидетельством генотоксичности γРВ стало его использование для переноса гена *gp91phox* с целью лечения врожденного хронического гранулематоза. В этом случае интеграция γРВ произошла

вблизи генов *MDS1-EV11*, *PRDM16* и *SETBP1* и привела к развитию миелоидной дисплазии [18]. Описанные случаи генотоксичности генно-терапевтических препаратов стали основанием для того, чтобы считать γРВ, содержащие полноразмерные LTR, небезопасными для использования в генной терапии.

Все эпизоды генотоксичности, зафиксированные в клинических испытаниях, были связаны с введением LTR-содержащих γРВ в ГСК. Использование тех же γРВ для модификации Т лимфоцитов оказалось безопасным, что было не раз продемонстрировано в клинических испытаниях, которые проводят с 1989 г. Число таких испытаний и участвовавших в них пациентов весьма велико. Только для лечения различных онкологических заболеваний было проведено не менее 8 клинических испытаний, в которые было включено более 90 пациентов [19]. В мае 2012 г. были опубликованы результаты многолетнего наблюдения за ВИЧ-инфицированными пациентами (43 человека), которым провели инфузию собственных Т лимфоцитов, модифицированных с помощью γРВ, кодирующего химерный антигенный рецептор, направленный против поверхностного белка ВИЧ [4]. У 41 пациента стабильный процент модифицированных лимфоцитов в крови присутствовал на протяжении 11 лет после введения, при этом клетки сохраняли антивирусную активность. За все годы наблюдения ни у одного из наблюдаемых не развилась лейкемия, не было выявлено клональной экспансии.

Различное влияние интеграции векторов на стволовые и дифференцированные клетки, по-видимому, объясняется различными профилями транскрипции в этих типах клеток. Показано, что сайты интеграции γРВ совпадают с регуляторными областями транскрипционно активных генов. В ГСК активно экспрессируются гены, обеспечивающие самообновление клеточной популяции, многие из которых являются протоонкогенами. В дифференцированных клетках данные гены «молчат» и, как правило, находятся в области гетерохроматина, что препятствует интеграции векторов.

Развитие онкологических заболеваний у пациентов свидетельствовало о том, что модели, использованные в доклинических испытаниях γ PВ, оказались неспособны выявить потенциальную онкогенность вектора, поэтому для дальнейшего исследования и сравнения онкогенности/генотоксичности векторов были разработаны специальные модельные системы. E. Montini и соавт. в 2006 г. предложили использовать линию мышей, отличительной особенностью которой была повышенная частота образования опухолей [20]. Стволовые клетки крови модифицировали вирусным вектором и пересаживали данным животным. Критерием оценки онкогенности являлось время возникновения опухолей у мышей после пересадки ГСК, а также продолжительность жизни животных. В качестве контрольной группы использовали мышей, которым пересаживали немодифицированные клетки. При помощи этой модели удалось впервые показать генотоксичность γ PВ, аналогичного вектору, использованному для лечения X_1 -ТКИД [20]. Трансплантация модифицированных γ PВ клеток мышам вызывала ускоренное развитие опухолей и раннюю смерть животных, причем в клетках рано развивающихся опухолей было обнаружено встраивание γ PВ вблизи онкогенов или генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. В дальнейшем было продемонстрировано, что безопасность введения γ PВ значительно повышается при использовании СИН-векторов. Пересадка клеток, модифицированных СИН γ PВ, не приводила к ускорению развития опухоли у мышей по сравнению с контрольной группой [21]. Уменьшение генотоксичности было связано с удалением из состава вектора вирусного промотора и энхансера, которые являлись активаторами протоонкогенов [21].

Следует отметить, что на безопасность ретровирусных векторов влияют не только промоторы и энхансеры. По результатам клинических испытаний было установлено, что на риск развития онкологического заболевания может в значительной степени влиять природа заболевания и гена, применяемого для лечения. Так, среди 30 детей, которым была проведена трансплантация стволовых клеток крови, трансформированных *LTR*-содержащим γ PВ, кодирующим аденозиндезаминазу, не зарегистрировали ни одного случая лейкемии [13], в то время как у 5 из 20 детей, которым вводили такой же вектор, содержащий ген γ -цепи рецептора ИЛ 2, развилось заболевание крови [12, 16].

Новые перспективы в генной терапии открыла разработка векторов на основе лентивирусов, к которым относится ВИЧ. Эти векторы способны эффективно трансформировать неделящиеся клетки-мишени, что делает их незаменимыми для модификации стволовых клеток крови, а также неделящихся дифференцированных клеток, например нейронов. Однако главным преимуществом лентивирусных векторов (ЛВ) стала возможность создания на их основе безопасных векторов, не обладающих свойством генотоксичности. Первым шагом в этом направлении стало создание самоинактивирующегося варианта ЛВ (СИН-ЛВ). На модели мышей было проведено сравнение онкогенного потенциала четырех вариантов векторов: СИН, γ PВ, СИН-ЛВ и векторов, содержащих полноразмерные *LTR*. Оба самоинактивирующихся вектора проявили себя нейтрально в данной модели, не ускоряя образования опухоли. В то же время сравнение γ PВ и ЛВ, содержащих полноразмерные *LTR*, показало, что вероятность возникновения опухоли при использовании ЛВ в 10 раз ниже, чем при

применении γ PВ [21]. Было установлено, что различие в генотоксичности ЛВ и γ PВ связано с различием в местах интеграции этих векторов в геном. Для γ -ретровирусов характерна интеграция в областях, регулирующих транскрипцию генов: в непосредственной близости от транскрипционного старта или в области связывания транскрипционных факторов, тогда как интеграция лентивирусных векторов происходит дальше от старта транскрипции, не попадая в регуляторные области, такие как промотор или энхансер, и таким образом не нарушает регуляцию гена [22, 23].

Модель на животных, использованная в работе E. Montini и соавт., оказалась малоприменимой для тестирования низкого уровня генотоксичности, т.к. на фоне высокой частоты спонтанного образования опухолей, характерной для данной линии мышей, нельзя увидеть изменения, вызываемые малотоксичным вектором. Был предложен более чувствительный метод анализа онкогенности в культуре клеток (анализ иммортализации ГСК *in vitro*, *in vitro immortalization assay*, *IVIM-assay*), который позволил оценить повышение вероятности онкогенной трансформации ГСК при введении СИН-векторов [24]. Было показано, что при встраивании СИН-ЛВ эта вероятность значительно ниже, чем при интеграции СИН- γ PВ, однако выше, чем в контрольных нетрансформированных клетках. Для того, чтобы полностью избавиться от потенциальной генотоксичности, было предложено ввести в состав вектора инсулятор — регуляторный элемент, позволяющий предотвратить активацию соседних генов. Кроме того, было показано, что использование для регуляции терапевтического гена тканеспецифичного промотора или промотора, специфичного для отдельной популяции клеток крови, дополнительно снижает вероятность онкогенеза. Эти шаги позволили уменьшить генотоксичность до неопределяемого уровня и в итоге привели к созданию безопасного вектора [25].

На сегодняшний день уже имеются данные о результатах использования ЛВ в 3 клинических испытаниях, в которых проводили модификацию стволовых клеток крови, а именно результаты лечения X -сцепленной аденолейкодиетрофии (АЛД — заболевание, приводящее к демиелинизации нервной ткани) [3], β -талассемии [26], а также результаты трансплантации стволовых клеток крови ВИЧ-инфицированным пациентам с неходжкинской лимфомой [27].

В клиническом испытании по лечению АЛД участвовало 3 ребенка [3]. Использованный в этом испытании ЛВ кодировал пероксисомный белок (аденозинтрифосфат-связывающий транспортный белок, ABCD1), дефицит которого приводит к развитию заболевания. Анализ сайтов интеграции вектора с помощью метода глубокого секвенирования показал, что модифицированные клетки были представлены большим числом различных клонов, что говорит об отсутствии лейкемии или других злокачественных заболеваний крови. Необходимо подчеркнуть, что использованный вектор содержал полноразмерный *LTR*, но тем не менее кластеризации в области онкогенов и генов, связанных с ростом клеток, обнаружено не было [3]. Для сравнения, в клиническом испытании по лечению X_1 -ТКИД кластеризация γ PВ в области протоонкогенов была отмечена даже у тех пациентов, модификация клеток которых не привела к развитию лимфоидной лейкемии [28].

Места интеграции вектора у пациентов с АЛД сравнивали с профилем встраивания того же вектора в ГСК человека, трансплантированные иммунодефицитным гумани-

зированным мышам. Было показано, что расположение сайтов интеграции в клетках, пересаженных животным, полностью коррелировало с картиной, наблюдаемой у пациентов [29]. Эту модель применили для детального анализа нескольких часто встречающихся сайтов интеграции (*CIS*, *common insertion sites*), обнаруженных в клетках пациентов. Оказалось, что для ЛВ часто встречающиеся сайты встраивания представляли собой широкие (около 10^6 п.н.) хромосомные области, в результате чего был сделан вывод о том, что идентифицированные *CIS* не являются результатом отбора нескольких клонов за счет преимущественного роста, а связаны с предпочтительной интеграцией вектора в различные сайты, расположенные в данной области [30].

Другое клиническое испытание было направлено на лечение β -талассемии с использованием ЛВ, кодирующего β -глобиновый ген под контролем сильного промотора одного из эритроидных генов [26]. Лечение прошло успешно: пациент, которому с раннего детства проводили ежемесячные гемотрансфузии, более в них не нуждается, и у него не наблюдается признаков анемии. Основной терапевтический эффект был обусловлен образованием доминантного миелоидного клона, который в данном случае сыграл положительную роль. Несмотря на наличие клонального доминирования, относительно содержание клона, которое составляло около 10% клеток, оставалось стабильным на протяжении, по крайней мере, 5 лет, что позволяет говорить об отсутствии злокачественных изменений.

Третье клиническое испытание с использованием ЛВ было связано с лечением ВИЧ-инфекции [27]. В ходе испытаний 4 ВИЧ-инфицированным пациентам была проведена аутотрансплантация ГСК, модифицированных с помощью ЛВ, содержащего 3 анти-ВИЧ-гена. Из этических соображений только 1/5 часть трансплантированных клеток была модифицирована вектором, что привело к низкому содержанию модифицированных клеток в крови и короткому времени экспрессии терапевтических генов. За время наблюдения клональной экспансии и случаев онкогенеза зафиксировано не было.

О перспективности использования ЛВ в генной терапии свидетельствует тот факт, что начиная с 2008 г. инициировано 17 клинических испытаний с использованием ЛВ для модификации ГСК, в частности для лечения таких заболеваний, как метахроматическая лейкоцистрофия, гемофилия, анемия Фанкони, серповидноклеточная анемия, X-ТКИД, иммунодефицит, вызванный

недостатком аденозиндезаминазы, синдром Вискотта–Олдрича, β -талассемия, X-сцепленный хронический гранулематоз, ВИЧ-инфекция и некоторых других.

Помимо приведенных выше примеров ЛВ также были успешно применены для модификации Т лимфоцитов [31]. С точки зрения безопасности показательны результаты одного из крупнейших по числу пациентов (61 человек) клинических испытаний ЛВ, содержащего анти-ВИЧ-последовательность и полноразмерный *LTR*. Наблюдение в течение 7 лет не выявило случаев лейкозов или доминирования отдельных клонов. Анализ сайтов встраивания показал отсутствие векторов рядом с протоонкогенами или генами-супрессорами опухолей [32].

В настоящее время ведется разработка интегрирующих векторов на базе других ретровирусов, например α -ретровирусов [33] и спумаиринов [34]. Получены предварительные данные о потенциальной безопасности этих векторов. Однако окончательные выводы могут быть сделаны только после их исследования в клинической практике. Также перспективными считают находящиеся на ранних этапах разработки методы, позволяющие встраивать терапевтический ген в уникальный, заданный участок генома при помощи различных векторов [35–37].

В заключении следует сказать, что за последние годы накоплен большой опыт по использованию 2 типов ретровирусных векторов — ЛВ и γ РВ. По профилю безопасности ЛВ значительно превосходят γ РВ и предпочтительны для создания генно-терапевтических препаратов. Кроме того, на генотоксичность препарата могут влиять и другие факторы, такие как дизайн вектора (самоинактивирующийся/несамоинактивирующийся, выбор промотора и энхансера), число копий интегрированного гена, тип целевых клеток, природа трансгена, природа заболевания и др. Созданы модели, позволяющие оценивать генотоксичность препарата в доклинических испытаниях и делать адекватное заключение о его безопасности. Учет различных факторов и тщательное тестирование позволяют избежать генотоксичности при использовании РВ в клинической практике.

Таким образом, последние исследования подтверждают возможность создания эффективных и безопасных генно-терапевтических препаратов, в частности на базе самоинактивирующихся ЛВ. Не вызывает сомнения необходимость и перспективность создания таких препаратов, которые позволят расширить возможности современной медицины и лечить заболевания, ранее не поддававшиеся терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глазкова Д.В., Богословская Е.В., Шипулин Г.А., Покровский В.И. Успехи генной терапии. *Тер. архив*. 2011; 8: 62–69.
2. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
3. Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C., Veres G., Schmidt M., Kutschera I., Vidaud M., Abel U., Dal-Cortivo L., Caccavelli L., Mahlaoui N., Kiemer V., Mittelstaedt D., Bellesme C., Lahlou N., Lefrere F., Blanche S., Audit M., Payen E., Leboult P., l'Homme B., Bougneres P., Von Kalle C., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., Aubourg P. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*. 2009; 326 (5954): 818–823.
4. Scholler J., Brady T.L., Binder-Scholl G., Hwang W.T., Plesa G., Hege K.M., Vogel A.N., Kalos M., Riley J.L., Deeks S.G., Mitsuyasu R.T., Bernstein W.B., Aronson N.E., Levine B.L., Bushman F.D., June C.H. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4 (132): 132–153.
5. Westwood J.A., Kershaw M.H. Genetic redirection of T cells for cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87 (5): 791–803.
6. von Laer D., Baum C., Protzer U. Antiviral gene therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009; 189: 265–297.
7. De Luca M., Pellegrini G., Mavilio F. Gene therapy of inherited skin adhesion disorders: A critical overview. *Br. J. Dermatol.* 2009; 161: 19–24.
8. Sakuma T., Barry M.A., Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* 2012; 443 (3): 603–618.
9. Donahue R.E., Kessler S.W., Bodine D., McDonagh K., Dunbar C., Goodman S., Agricola B., Byrne E., Raffeld M., Moen R. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* 1992; 176 (4): 1125–1135.
10. Maetzig T., Galla M., Baum C., Schambach A. Gamma-retroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses*. 2011; 3 (6): 677–713.

11. Somia N., Verma I.M. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 2000; 1 (2): 91–99.
12. Hacein-Bey-Abina S., Garrigue A., Wang G.P., Soulier J., Lim A., Morillon E., Clappier E., Caccavelli L., Delabesse E., Beldjord K., Asnafi V., MacIntyre E., Dal Cortivo L., Radford I., Brousse N., Sigaux F., Moshous D., Hauer J., Borkhardt A., Belohradsky B.H., Wintergerst U., Velez M.C., Leiva L., Sorensen R., Wulffraat N., Blanche S., Bushman F.D., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (9): 3132–3142.
13. Aiuti A., Roncarolo M.G. Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. Book* 2009. 682–689.
14. Hacein-Bey-Abina S., Hauer J., Lim A. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363 (4): 355–364.
15. Gaspar H.B., Parsley K.L., Howe S., King D., Gilmour K.C., Sinclair J., Brouns G., Schmidt M., Von Kalle C., Barington T., Jakobsen M.A., Christensen H.O., Al Ghonaium A., White H.N., Smith J.L., Levinsky R.J., Ali R.R., Kinnon C., Thrasher A.J. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet.* 2004; 364 (9452): 2181–2187.
16. Howe S.J., Mansour M.R., Schwarzwaelder K., Bartholomae C., Hubank M., Kempinski H., Brugman M.H., Pike-Overzet K., Chatters S.J., de Ridder D., Gilmour K.C., Adams S., Thornhill S.I., Parsley K.L., Staal F.J., Gale R.E., Linch D.C., Bayford J., Brown L., Quaye M., Kinnon C., Ancliff P., Webb D.K., Schmidt M., von Kalle C., Gaspar H.B., Thrasher A.J. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (9): 3143–3150.
17. Trobridge G.D. Genotoxicity of retroviral hematopoietic stem cell gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011; 11 (5): 581–593.
18. Ott M.G., Schmidt M., Schwarzwaelder K., Stein S., Siler U., Koehl U., Glimm H., Kuhlcke K., Schilz A., Kunkel H., Naundorf S., Brinkmann A., Deichmann A., Fischer M., Ball C., Pilz I., Dunbar C., Du Y., Jenkins N.A., Copeland N.G., Luthi U., Hassan M., Thrasher A.J., Hoelzer D., von Kalle C., Seger R., Grez M. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* 2006; 12 (4): 401–409.
19. Westwood J.A., Kershaw M.H. Genetic redirection of T cells for cancer therapy. *J. Leuk. Biol.* 2010; 87 (5): 791–803.
20. Montini E., Cesana D., Schmidt M., Sanvito F., Ponzoni M., Bartholomae C., Sergi L., Benedicenti F., Ambrosi A., Di Serio C., Doglioni C., von Kalle C., Naldini L. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24 (6): 687–696.
21. Montini E., Cesana D., Schmidt M., Sanvito F., Bartholomae C.C., Ranzani M., Benedicenti F., Sergi L.S., Ambrosi A., Ponzoni M., Doglioni C., Di Serio C., von Kalle C., Naldini L. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J. Clin. Invest.* 2009; 119 (4): 964–975.
22. Baum C. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology. *Curr. Opin. Hematol.* 2007; 14 (4): 337–342.
23. Sinn P.L., Sauter S.L., McCray P.B., Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors — design, biosafety, and production. *Gene Ther.* 2005; 12 (14): 1089–1098.
24. Modlich U., Bohne J., Schmidt M., von Kalle C., Knoss S., Schambach A., Baum C. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood.* 2006; 108 (8): 2545–2553.
25. Modlich U., Navarro S., Zychlinski D., Maetzig T., Knoess S., Brugman M.H., Schambach A., Charrier S., Galy A., Thrasher A.J., Bueren J., Baum C. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol. Ther.* 2009; 17 (11): 1919–1928.
26. Cavazzana-Calvo M., Payen E., Negre O., Wang G., Hehir K., Fusil F., Down J., Denaro M., Brady T., Westerman K., Cavallese R., Gillet-Legrand B., Caccavelli L., Sgarra R., Maouche-Chretien L., Bernaudin F., Girot R., Dorazio R., Mulder G.J., Polack A., Bank A., Soulier J., Larghero J., Kabbara N., Dalle B., Gourmel B., Socie G., Chretien S., Cartier N., Aubourg P., Fischer A., Cornetta K., Galacteros F., Beuzard Y., Gluckman E., Bushman F., Hacein-Bey-Abina S., Leboulch P. Transfusion independence and HMG2A activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature.* 2010; 467 (7313): 318–322.
27. DiGiusto D.L., Krishnan A., Li L., Li H., Li S., Rao A., Mi S., Yam P., Stinson S., Kalos M., Alvarnas J., Lacey S.F., Yee J.K., Li M., Couture L., Hsu D., Forman S.J., Rossi J.J., Zaia J.A. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 2010; 2 (36): 36–43.
28. Deichmann A., Hacein-Bey-Abina S., Schmidt M., Garrigue A., Brugman M.H., Hu J., Glimm H., Gyapay G., Prum B., Fraser C.C., Fischer N., Schwarzwaelder K., Siegler M.L., de Ridder D., Pike-Overzet K., Howe S.J., Thrasher A.J., Wagemaker G., Abel U., Staal F.J., Delabesse E., Villeval J.L., Aronow B., Hue C., Prinz C., Wissler M., Klanke C., Weissenbach J., Alexander I., Fischer A., von Kalle C., Cavazzana-Calvo M. Vector integration is non-random and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J. Clin. Invest.* 2007; 117 (8): 2225–2232.
29. Biffi A., Aubourg P., Cartier N. Gene therapy for leukodystrophies. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20 (1): 42–53.
30. Biffi A., Bartholomae C.C., Cesana D., Cartier N., Aubourg P., Ranzani M., Cesani M., Benedicenti F., Plati T., Rubagotti E., Merella S., Capotondo A., Sgualdino J., Zanetti G., von Kalle C., Schmidt M., Naldini L., Montini E. Lentiviral-vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood.* 2011; 117 (20): 5332–5339.
31. Radic M. Armed and accurate: engineering cytotoxic T cells for eradication of leukemia. *BMC Biotechnol.* 2012; 12: 6.
32. Tebas P., Stein D., Zifchak L., Seda A., Binder G., Abera F., Collman R., McGarrity G., Levine B., June C. Prolonged control of viremia after transfer of autologous CD4 T Cells genetically modified with a lentiviral vector expressing long antisense to HIV env (VRX496). 17th CROI Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. *San-Francisco CA.* February 16–19, 2010.
33. Suerth J.D., Maetzig T., Galla M., Baum C., Schambach A. Self-inactivating alpharetroviral vectors with a split-packaging design. *J. Virol.* 2010; 84 (13): 6626–6635.
34. Lindemann D., Rethwilm A. Foamy virus biology and its application for vector development. *Viruses.* 2011; 3 (5): 561–585.
35. Mussolino C., Cathomen T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012; 23 (5): 644–50.
36. Palpant N.J., Dudzinski D.M. Zinc-finger nucleases: looking toward translation. *Gene Ther.* 2012. In press.
37. Silva G., Poirot L., Galetto R., Smith J., Montoya G., Duchateau P., Pques F. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 2011; 11 (1): 11–27.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Богословская Елена Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Тел.: (495) 974-96-46, **факс:** (495) 305-54-23

E-mail: elena.bogoslovskaya@pcr.ru

Глазкова Дина Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Тел.: (495) 974-96-46, (916) 958-09-57, **факс:** (495) 305-54-23

E-mail: glazkova@pcr.ru

Шипулин Герман Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Тел.: (495) 974-96-46, **факс:** (495) 305-54-23

E-mail: german@pcr.ru

Покровский Вадим Валентинович, доктор медицинских наук, академик РАМН, заместитель директора ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора по научной работе

Адрес: 111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

Тел.: (495) 974-96-46, **факс:** (495) 305-54-23

E-mail: info@pcr.ru