

мией способствуют улучшению липидного состава крови (ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ТГ) и могут применяться в качестве альтернативной терапии или в комбинации с медикаментозной коррекцией нарушений липидного обмена.

Достоверный гиполипидемический эффект дают мед в комбинации с пыльцой (снижение уровня ОХС на 18,3%, ХС ЛПНП — на 23,9% по сравнению с исходным) и перга (снижение уровня ОХС на 15,7%, ХС ЛПНП — на 20,5%).

Улучшение липидного состава крови при применении меда в комбинации с пыльцой у больных с избыточной массой тела (ИМТ от 25 до 30) и ожирением (ИМТ более 30) наблюдается только в случае снижения массы тела. Гипергликемии и других нежелательных побочных эффектов при 12-недельном приеме продуктов пчеловодства (мед, пыльца, перга) не отмечено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Российские рекомендации "Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза". Секция атеросклероза ВНОК. Кардиоваск. тер. и профилак. 2004; 2 (прил.): 1—36.
2. Мамедов М. Н. Школа по диагностике и лечению гиперлипидемии. М.: Медиа Медика; 2006. 4—7.
3. Беленков Ю. Н., Оганов Р. Г. (ред.). Кардиология: Нац. руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
4. Чазов Е. И., Кухарчук В. В., Бойцов С. А. (ред.). Руководство по атеросклерозу и ишемической болезни сердца. М.: Медиа Медика; 2007.
5. Лазебник Л. Б., Звенигородская Л. А. Метаболический синдром и органы пищеварения. М.: Анахарсис; 2009.
6. Оганов Р. Г., Аронов Д. М., Бубнова М. Г. Применение статинов — парадигма профилактики и лечения атеросклеротических заболеваний (фокус на аторвастатин). Кардиоваск. тер. и профилак. 2006; 5 (6): 95—107.
7. Исаков В. А. Статины и печень: друзья или враги? Клин. гастроэнтерол. и гепатол. Рус. изд. 2008; 1 (5): 372—374.
8. Успенский Ю. П., Балдукова Е. В. Метаболический синдром и неалкогольный стеатогепатит: причинно-следственный континуум. Consilium Medicum. Прил. Гастроэнтерология, 2009; 1: 41—45.
9. Звенигородская Л. А., Лазебник Л. Б., Черкашова Е. А., Ефремов Л. И. Статиновый гепатит. Трудный пациент, 2009; 7 (4—5): 44—49.
10. Лазебник Л. Б., Звенигородская Л. А., Морозов И. А., Шенелева С. Д. Клинико-морфологические изменения печени при атерогенной дислипидемии и при лечении статинами. Тер. арх. 2003; 8: 51—55.
11. Мельникова Н. В. Клинико-биохимические и морфологические изменения печени у больных с атерогенной дислипидемией: Автореф. дис... канд. мед. наук. М.; 2008.
12. Яковенко Э. П., Яковенко А. В., Иванов А. Н., Агафонова Н. А. Патологические подходы к терапии лекарственных поражений печени. Consilium Medicum. Прил. Гастроэнтерология 2009; 1: 27—31.
13. Звенигородская Л. А., Мельникова Н. В. Гиполипидемическая терапия у больных с неалкогольной жировой болезнью печени: место гепатопротекторов. Consilium Medicum. Прил. Гастроэнтерология 2009; 1: 32—36.
14. Подымова С. Д. Болезни печени. М.: Медицина; 2005.
15. Garcia-Monzon C. et al. A wider view of diagnostic criteria of nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology 2002; 11: 560—565.
16. Leuschner U., James O. F. W., Dancygier H. Steatohepatitis (NASH and ASH): Dordrecht et al.: Springer; 2004.
17. Sgro C., Clinard F., Ouazir K. et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. Hepatology 2002; 36: 451—455.
18. Weinstein W. M., Hawkey C. J., Bosch J. Clinical Gastroenterology and hepatology. London: Elsevier; 2005.
19. Костина Л. Лечение медом.: АСС-Центр. Авеонт; 2005.
20. Лудянский Э. А. Апитерапия. Вологда; 1994.
21. Люсов В. А., Дудаев В. В., Горин В. В. Применение смеси пчелиного меда и цветочной пыльцы у больных ишемической болезнью сердца. В кн.: Апитерапия. Рыбное; 1993. 41—45.
22. Макарова В. Г., Узбекова Д. Г. Гепатопротекторные свойства биологически активных продуктов пчеловодства. В кн.: Апитерапия сегодня: Сборник материалов XI Всероссийской науч.-практ. конф. Рыбное; 2004. 24—27.
23. Лечение медом, продуктами пчеловодства и лекарственными травами / Сельцовский А. П., Лазебник Л. Б., Касьяненко В. И. и др. М.: Анахарсис; 2007.
24. Узбекова Д. Г., Артемьева Г. Б., Рябкова А. Н. Медико-биологические свойства продуктов пчеловодства при экспериментальной патологии печени В кн.: Апитерапия. Рыбное; 1993. 57—58.
25. Лазебник Л. Б., Звенигородская Л. А. Изменения органов пищеварения у больных с метаболическим синдромом. Экспер. и клин. гастроэнтерол. 2004; 4: 6—10.
26. Wood D., De Backer G., Faergeman O. et al. and members of the Second Joint Task Force of the Joint European and other Societies on Coronary Prevention. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Eur. Heart J. 1998; 19: 1434—1503.

Поступила 18.05.10

ОБЗОР

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

УДК 616-08:612.6.05

УСПЕХИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Д. В. Глазкова, Е. В. Богословская, Г. А. Шипулин, В. И. Покровский
ФГУ ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

Аннотация

Обзор посвящен успехам, достигнутым в последние годы в генной терапии. Обсуждается современное состояние исследований в данной области экспериментальной медицины. Основное внимание уделено генотерапевтическим подходам, эффективность которых показана в клинических испытаниях.

Ключевые слова: обзор, генная терапия, доставка генов, трансген, векторы, клинические испытания, врожденные иммунодефициты, ТКИД (тяжелый комбинированный иммунодефицит), амарроз Лебера, аденолейкодистрофия

PROGRESS IN GENE THERAPY

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

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Recent progress in gene therapy, current status of investigations in this area of experimental medicine are reviewed. Much attention is given to gene-therapeutic approaches the efficacy of which is proved in clinical trials.

Key words: *review, gene therapy, gene delivery, transgene, vectors, clinical trials, congenital immunodeficiencies, severe combined immunodeficiency, Leber's amaurosis, adrenoleukodystrophy*

ABV — аденовирусный вектор
 АДА — аденозиндезаминаза
 АДА-ТКИД — тяжелый комбинированный иммунодефицит, вызванный недостатком АДА
 АДВ — аденовирусный вектор
 ВЭБ — вирус Эпштейна—Барр
 ГСК — гемопоэтические стволовые клетки
 ГТ — генная терапия
 ГТП — генотерапевтические препараты
 ДК — дендритные клетки
 ДЦЖК — длинноцепочечные жирные кислоты
 КИ — клиническое испытание
 ЛВВ — лентивирусный вектор

PBV — ретровирусный вектор
 ТК — тимидинкиназа
 X1-ТКИД — X1-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит
 ХТ — химиотерапия
 ЦД — цитозиндезаминаза
 ЦМВ — цитомегаловирус
 FGF — фактор роста фибробластов
 L1-CAM — рецептор к L1-молекуле клеточной адгезии
 PDGF — тромбоцитарный фактор роста
 gAAV — аденоассоциированный вирус
 STN — субталамическое ядро
 VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста

В декабрьском номере 2009 г. журнала "Science" успехи в генной терапии (ГТ) были названы одним из основных научных достижений прошедшего года. В статье отмечалось, что после двух десятилетий подъемов и спадов в развитии новой области медицины использование генотерапевтических подходов дает возможность лечить тяжелые заболевания [1]. Первоначально ГТ рассматривали как метод лечения наследственных генетических заболеваний, однако в дальнейшем область ее применения заметно расширилась. В настоящее время идет разработка генотерапевтических препаратов (ГТП) для лечения широкого спектра заболеваний, как наследственных, так и приобретенных.

ГТ: общие сведения. ГТ, т. е. буквально "лечение генами", подразумевает введение в клетку молекул ДНК или РНК, экспрессия которых приводит к исправлению нарушений в работе клетки или организма в целом. ГТ можно определить как совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат клеток человека с целью лечения различных заболеваний. Следует подчеркнуть, что на данный момент работы по ГТ человека строго ограничены соматическими клетками, и по ГТ человека строго ограничены соматическими клетками, и это исключает передачу генетических изменений по наследству.

Можно говорить о двух основных направлениях развития ГТ. Первое направление — введение в целевые клетки исправленного гена взамен неработающего гена (классический случай ГТ для лечения моногенного наследственного заболевания) или последовательности ДНК (РНК), подавляющей работу вредного гена (в случае онкогена или вирусного гена). Второе направление предполагает модификацию не целевых клеток, а клеток иммунной системы, позволяющую модулировать иммунный ответ в отношении определенных злокачественных или инфицированных клеток.

Для введения терапевтического гена в клетки пациента используют специальные генные носители (векторы). Вектор должен обеспечивать специфическую эффективную и безопасную

доставку генетического материала в соответствующие клетки-мишени пациента. Кроме того, вектор влияет на продолжительность работы встроенного гена, который должен функционировать либо на протяжении всей жизни (в случае наследственного заболевания), либо в течение определенного времени, достаточного для достижения клинического эффекта (в случае инфекционного или онкологического заболевания).

Наиболее часто используется перенос генов с помощью вирусных векторов, сконструированных на основе γ -ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных и других вирусов. Вирусные векторы обеспечивают упаковку терапевтического гена (трансгена) в белковую оболочку, характерную для данного вируса. Такая оболочка, а также некоторые регуляторные последовательности, расположенные рядом с трансгеном, обеспечивают высокую эффективность переноса генетической информации в клетки. Кроме того, ретровирусные (в том числе лентивирусные) векторы позволяют встраивать терапевтический ген в хромосому, что важно при работе со стволовыми клетками крови. Интегрированный в хромосому трансген передается в дочерние клетки и приводит к исправлению дефекта во всех популяциях клеток крови.

Вирусные векторы не универсальны, каждый из них имеет недостатки, ограничивающие область его применения (векторы могут вызывать иммунный ответ, активировать онкогены, некоторые способны переносить только короткие последовательности ДНК и др.) [2]. В практическом плане общим недостатком всех вирусных векторов является высокая цена их производства.

Простейший способ невирусной доставки трансгена — использование неупакованной "голой" ДНК, которую вводят в виде инъекций непосредственно в ткани, например в мышцы. Для увеличения стабильности *in vivo* и улучшения проникновения в клетки используют химически модифицированную ДНК или ДНК в комплексе с полимерами или липосомами [3]. Невирусные векторы являются более привлекательными для фармацевтического производства: они дешевле и их легче стандартизировать. Возможно, они также более безопасны, чем вирусы. Однако недостаточная эффективность (низкая частота модификации клеток) и кратковременность действия современных невирусных векторов ограничивают их практическое применение.

Введение упакованных в вектор генов в клетки человека может проводиться либо через введение культуры клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организм человека (*in vivo*). Метод *ex vivo* предполагает выделение и культивирование специфических типов клеток, введение в них чужеродных генов и реинфузию их тому же пациенту. Преимущество метода *ex vivo* заключается в том, что вектор не должен быть специфичен к определенному типу клеток. Это обуславливает широкий выбор векторов с разными свойствами. Кроме того, можно проводить селективный отбор клеток, содержащих трансген, до введения пациенту. Однако спектр целевых клеток для такого подхода ограничен гематопоэтическими и стволовыми клетками.

Сведения об авторах

Богословская Елена Владимировна — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ЦНИИ эпидемиологии, e-mail: lenabo@pcr.ru

Шипулин Герман Александрович — канд. мед. наук, зав. отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии, e-mail: ger-man@pcr.ru

Покровский Валентин Иванович — акад. РАМН, дир. ЦНИИ эпидемиологии, e-mail: info@pcr.ru

Контактная информация:

Глазкова Дина Викторовна — канд. биол. наук, науч. сотр., ЦНИИ эпидемиологии, тел.: 8-495-305-54-23, e-mail: glazkova@pcr.ru

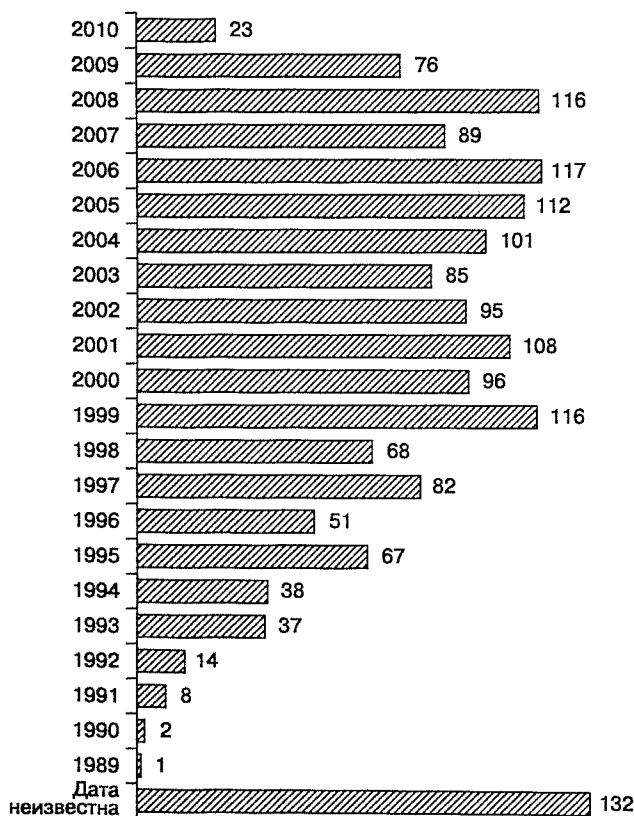


Рис. 1. КИ генотерапевтических препаратов: распределение по годам (по данным Journal of Gene Medicine <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> на 30 июня 2010 г.).

Введение генов *in vivo* может быть местным или системным. В настоящее время в клинике используют только местное введение, главным образом в виде инъекций для лечения локальных патологий, например, в офтальмологии или в онкологии при лечении солидных опухолей. Первые успехи ГТ были достигнуты именно в тех протоколах лечения, которые позволяют использовать местную доставку *in vivo* или метод *ex vivo*.

Первые успехи и неудачи. Первой успешной работой стало лечение наследственного иммунодефицита, обусловленного мутацией в гене фермента аденозиндезаминазы (АДА). В сентябре 1990 г. в США четырехлетней девочке, страдающей этой редкой патологией (распространенность 1:100 000), пересадили ее собственные лимфоциты, в которые предварительно ввели ген, кодирующий функциональную АДА [4]. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни. Это событие принято считать рождением ГТ.

К концу 90-х годов XX века было предложено несколько протоколов доставки терапевтических генов, показавших эффективность на моделях животных (в доклинических испытаниях). Однако за рядом успешных клинических испытаний последовал период неудач и откровенных провалов. Стало понятно, что главную опасность при введении генов представляют иммунный ответ, вызываемый чужеродными белками, входящими в состав вектора, и инсерционный мутагенез, приводящий к раковому перерождению клеток. Сильнейший иммунный ответ на внутривенно введенный аденовирусный вектор (АДВ), используемый для переноса терапевтического гена, стал причиной смерти пациента с редким нарушением метаболизма в 1999 г. [5]. Случай инсерционного мутагенеза привели к развитию лейкемии у 5 из 20 детей после трансдукции клеток костного мозга ретровирусным вектором (РВВ) для лечения Х1-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита [6]. Неудачи заставили специалистов, занятых в этой области, уделить более пристальное внимание разработке терапевтических протоколов и схем введения препаратов, а также повысить требования к доклиническим испытаниям.

Современное состояние дел. На сайте Журнала генетической медицины (Journal of Gene Medicine) создана база данных всех клинических испытаний по ГТ, проводимых в мире. В ней можно найти информацию о заболевании, для лечения которого разрабатывается терапевтический препарат, о дате начала испытания, об используемом векторе и гене, название института-разработчика и т. д. В соответствии с данными этого источника со времени первого клинического испытания (КИ) в 1989 г. [7] до июля 2010 г. в 30 странах были проведены, проходят или одобрены к выполнению 1644 КИ с использованием более 100 различных генов. С 1999 г. каждый год регистрируется около 100 новых КИ по ГТ — данные на июль 2010 г. (рис. 1).

Большинство (89,1%) из КИ направлено на лечение моногенных наследственных, онкологических, сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний (рис. 2). Наиболее очевидным является применение генотерапевтических методов для лечения моногенных наследственных болезней, при которых требуется восстановление функции дефектного гена. Онкологические и сердечно-сосудистые заболевания преобладают по распространенности и высокой смертности, при этом существующая терапия во многих случаях малоэффективна. Это способствует активному поиску новых подходов для лечения таких заболеваний, в частности при помощи ГТ. Существенное количество исследований, посвященных ГТ инфекционных болезней, можно отнести к попыткам лечения ВИЧ-инфекции, неизлечимому на данный момент заболеванию, для которого до настоящего времени отсутствует эффективная вакцина.

Генная терапия моногенных заболеваний. Около 1/3 всех КИ для лечения наследственных моногенных заболеваний направлены на лечение врожденных иммунодефицитов. Среди них большую часть составляют Х1-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (Х1-ТКИД) и иммунодефицит, вызванный недостатком АДА (АДА-ТКИД). АДА-ТКИД вызван отсутствием активности фермента АДА, которое приводит к накоплению токсичных метаболитов пурина в Т-лимфоцитах и гибели этой клеточной популяции. Пока что единственным эффективным средством лечения данного заболевания является пересадка костного мозга. В отсутствие совместимых доноров проводится дорогостоящая заместительная терапия ферментом АДА-ПЭГ, при которой 5-летняя выживаемость пациентов составляет 50%. КИ, связанные с ГТ данного заболевания, проводятся по крайней мере в 4 странах, в них уже включили более 30 детей [8].

Наиболее впечатляющий результат получен в итальянском исследовании. Генетическая модификация аутологических гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) нормальным геном АДА привела к успешному излечению 8 из 10 детей. После пересадки клеток традиционная заместительная терапия была приостановлена в целях обеспечения селективного преимущества пересаженных клеток над немодифицированными клетками. Трансгенный фермент экспрессировался как в лимфоцитах, так и в миелоидных клетках, обеспечивая системную детоксикацию и восстановление функций иммунной системы [9]. В течение последних 8 лет дети не нуждаются в заместительной ферментативной терапии, дают нормальный иммунный ответ при вакцинации и живут обычной жизнью, посещая школу. По заверше-



Рис. 2. КИ генотерапевтических препаратов: распределение по заболеваниям (по данным Journal of Gene Medicine <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> на 30 июня 2010 г.).

нии КИ ГТ, по-видимому, станет терапией выбора для таких пациентов, не имеющих совместимых доноров.

X1-ТКИД вызван мутациями гена общей цепи (γ -цепи) для нескольких цитокиновых рецепторов, что приводит к нарушению передачи сигнала с участием цитокинов IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21. В 2000 г. для лечения мальчиков с X1-ТКИД в двух КИ (Франция и Англия) был проведен перенос функционального гена γ -цепи в составе РВВ в аутологичные ГСК. Лечение прошло успешно, иммунная система была полностью восстановлена. Однако у 4 из 10 детей, включенных в КИ во Франции, и в одного из 10 детей в английском КИ введение вектора привело к развитию лейкемии [6, 8, 10, 11]. Четверо первых детей впоследствии были успешно пролечены, одного ребенка спасти не удалось [6]. Причиной клональной пролиферации Т-лимфоцитов явилась активация клеточных онкогенов, связанная с интеграцией вектора в непосредственной близости от этих онкогенов. Векторная последовательность содержала ретровирусный промотор, который и вызвал экспрессию онкогена. В настоящее время созданы РВВ, которые лишены данных промоторов. Безопасность таких *самоинактивирующихся* векторов продемонстрирована на животных моделях. В Англии и США инципированы КИ препарата для лечения X1-ТКИД, на основе γ -ретровирусного самоинактивирующегося вектора [12].

Предприняты попытки лечения хронического гранулематоза — заболевания, характеризующегося повторяющимися, часто угрожающими жизни бактериальными и грибковыми инфекциями, возникающими из-за функционального дефекта фагцитирующих нейтрофилов. Заболевание вызывается мутацией в одном из генов, кодирующих многокомпонентный ферментный комплекс NADPH-оксидазу (в частности, в гене *gp91phox*). В КИ, проведенном в Германии, для лечения 2 пациентов с мутацией в гене *gp91phox* в ГСК вводили здоровую копию гена. Проведенное лечение привело к восстановлению иммунитета и ликвидации имевшихся у пациентов длительно текущих инфекций. Однако экспрессия гена оказалась нестабильной, что привело к постепенному уменьшению количества вырабатываемого фермента и возвращению симптомов заболевания. Кроме того, через 25—27 мес у больных была выявлена клональная экспансия миелоидных клеток, которая привела к миелодисплазии [15, 16]. По предварительным данным, использование модифицированного протокола в текущем американском исследовании позволило добиться длительной экспрессии трансгена без возникновения клонального доминирования [17].

По-видимому, следующим иммунодефицитом, для которого будет возможно применять ГТ, станет синдром Вискотта—Олдрича. По предварительным данным, клиническое улучшение было отмечено у 9 из 10 пациентов, получивших трансплантацию аутологичных ГСК, трансформированных вектором, несущим здоровый ген WAS [18].

Как видно из приведенных примеров, одной из основных проблем ГТ врожденных иммунодефицитов является онкотрансформация клеток, вызванная интеграцией вектора. Ожидается, что применение самоинактивирующихся векторов сможет решить эту проблему. Сравнение результатов лечения X1-ТКИД и АДА-ТКИД, для которых использовали одни и те же векторы, свидетельствует о том, что на возникновение инсерционного мутагенеза, или генотоксичности, влияет не только вектор, но также природа гена и сила промотора, т. е. вся совокупность генетических элементов, используемых в конструкции. Сейчас уже разработаны чувствительные животные модели, позволяющие оценить и сравнить онкогенный потенциал конструкции в доклинических испытаниях.

С 2005 г. в КИ для модификации ГСК начали использовать лентивирусный вектор (ЛВВ), или лентивектор, созданный на основе ВИЧ. Как и для γ -РВВ, для ЛВВ сконструирован самоинактивирующийся вариант. В отличие от γ -РВВ, ЛВВ может трансформировать делящиеся и неделящиеся клетки-мишени. Кроме того, особенности встраивания ЛВВ в хромосому уменьшают вероятность возникновения инсерционного мутагенеза. С помощью этого вектора удалось достичь высокого и стабильного уровня экспрессии трансгенов и более эффективного переноса в ГСК. Эти свойства вектора сделали теоретически возможным лечение β -талассемии или серповидно-клеточной анемии, коррекция которых требует высокой концентрации, кодируемого трансгеном белка, в большинстве клеток [19—21]. Первые результаты переноса гена с помощью ЛВВ для лечения β -талассемии, проведенного в ходе клинического испытания во Франции, достаточно обнадеживающи: у одного из 2 пациентов аутогенная трансплантация модифицированных клеток прошла успешно, в результате больной не нуждался в трансфузии эритроцитов в течение последних 16 мес наблюдения [21].

Успешное применение ЛВВ для переноса генов было продемонстрировано при лечении X-сцепленной adrenoleukodistroфии, (меланокожная лейкодистрофия, болезнь Аддисона—Шильдера) — редкого заболевания, связанного с нарушением деградации длинноцепочечных жирных кислот (ДЦЖК) в пероксисомах. Причиной является мутация в гене ABCD1, кодирующем мембранный белок пероксисом ALDP, который участвует в транспорте эфиров ДЦЖК. Заболевание характеризуется накоплением ДЦЖК, которое приводит к прогрессирующей демиелинизации белого вещества головного мозга и недостаточности надпочечников. Первые симптомы, включающие в себя изменение в поведении, потерю зрения, нарушения походки, дизартрию и затруднения глотания, обычно отмечаются в возрасте 3—12 лет. Болезнь быстро прогрессирует и приводит к летальному исходу через 1—4 года после появления первых симптомов [22]. Единственным способом лечения является аллогенная трансплантация костного мозга. После трансплантации миелоидные клетки донора, содержащие нормальный ген, мигрируют в мозг и дают начало микроглиальным клеткам, которые и позволяют восстановить процесс миелинизации. Двух пациентов 7 лет и 7,5 года, для которых не смогли подобрать совместимых доноров, включили в КИ с использованием ГТП. В собственные ГСК больных вводили нормальный ген ABCD1 в составе ЛВВ. Спустя 14—16 мес после трансплантации у пациентов прекратилась прогрессирующая демиелинизация пирамидного пути, передней доли и других пораженных зон головного мозга. Это сопровождалось снижением уровня ДЦЖК в плазме на 38—39% и последующим исчезновением спешической симптоматики. Спустя 30 и 24 мес (соответственно для 1-го и 2-го пациентов) положительная динамика сохранялась. Важно отметить, что экспрессия функционально полноценного ALDP лишь в 14% моноцитов оказалась достаточной для коррекции уровня ДЦЖК. Анализ сайтов интеграции показал отсутствие клональной экспансии и онкотрансформации [23].

Основные направления в онкологии. В настоящее время на долю препаратов, направленных на лечение злокачественных опухолевых заболеваний, приходится 64,5% КИ по ГТ. Для лечения опухолей различной этиологии предложено и опробовано несколько стратегий ГТ: введение в опухолевые клетки генов, кодирующих клеточные белки-супрессоры (p53), использование онколитических вирусов, введение суицидных генов, иммунотерапия опухолей и др. [24].

В 50% опухолей человека наблюдается повреждение гена p53, продукт которого контролирует клеточный цикл и является супрессором опухолевого роста [25]. На культуре клеток показано, что доставка гена p53 и образование нормального белка в злокачественной клетке ведут к остановке деления и гибели последней посредством апоптоза. Опыты на мышах подтвердили способность белка вызывать регрессию опухоли [26]. В соответствии с базой данных журнала "Генетическая медицина" исследованию эффективности препаратов, содержащих ген p53, для лечения опухолей посвящено 73 КИ.

Гендацин — ГТП Ad-p53, представляет собой ген p53, упакованный в аденовирусный вектор. В КИ препарата II/III фазы включили 135 пациентов с диагнозом: плоскоклеточный рак головы и шеи, из них 63 получали инъекции в опухоль препарата Ad-p53 в комбинации с облучением. Контрольная группа ($n = 72$) получала только радиационную терапию. Полная ремиссия наблюдалась у 64% пациентов, получавших комбинированную терапию, и только у 20% пациентов контрольной группы [27]. Препарат был одобрен для клинического применения в Китае в октябре 2003 г. и стал первым, официально разрешенным ГТП в мире. Весной 2004 г. фирма SiBiono GeneTech Co. получила лицензию для коммерческого использования данного препарата. В декабре 2006 г. компания утверждала, что уже более 6000 пациентов получили лечение гендацином. Проводятся КИ по использованию гендацина для лечения других форм рака, в том числе рака носоглотки, рака шейки матки, злокачественных опухолей щитовидной железы.

Другой препарат на основе аденовируса, несущего нормальный ген p53, адвексин (Introgen Therapeutics, Inc. США), проходит III фазу КИ. В ходе II фазы КИ были применены 2 различные дозы препарата, показано увеличение продолжительности жизни и уменьшение смертности больных в течение первых 150 дней. Причем лучшие результаты были получены при использовании более высокой дозы препарата [28, 29].

Онкорин (Oncofine, H-101) — второй противораковый ГТП, одобренный для применения в Китае в 2005 г. (компания Shanghai Sunway Biotech Co Ltd). Этот препарат представляет собой условно-реплицирующийся аденовирус с делетированной областью E1B-E3. Такой вирус может размножаться только в опу-

хлевых клетках с нарушенной экспрессией p53, приводя к гибели данных клеток (онколитический вирус). В КИ III фазы исследовали комбинацию внутривенных инъекций вирусного вектора и химиотерапии (ХТ). В группе из 160 пациентов ответ на комбинированную терапию был получен у 78% в отличие от 39% в контрольной группе, получавшей только ХТ [30]. Разрешение на применение этих двух препаратов в Китае встретило противоречивую оценку международной научной общественности, так как на момент принятия решения не было проведено их многоцентровых рандомизированных исследований.

Еще один разрабатываемый препарат ONYX-015 (DL1520) также является условно-реплицирующимся аденовирусом, селективно уничтожающим раковые клетки. ONYX был эффективным в сочетании с ХТ для лечения рака головы и шеи: из 30 пациентов, получавших комбинированное лечение, у 19 был получен клинический эффект. У 8 из них наблюдалась полная регрессия опухоли, у 11 больных получили частичный ответ — уменьшение опухоли более чем на 50%. Через 6 мес у всех 19 пациентов отметили отсутствие прогрессирования заболевания, в то время как у всех пациентов контрольной группы (только ХТ) прогрессирование наблюдалось [31]. Проводятся испытания этого препарата также для лечения опухолей мозга [32].

Другое направление в разработке противораковых препаратов — препараты, содержащие суицидальный ген, который кодирует фермент, преобразующий нейтральное вещество-предшественник в цитотоксический препарат. Наиболее изучены и часто применяются два фермента: тимидинкиназа (ТК) герпес-вируса и цитозин-дезаминаза (ЦД). ТК преобразует нетоксичный ганцикловир в токсичный трифосфат ганцикловира, который, взаимодействуя с клеточной ДНК-полимеразой, нарушает синтез ДНК и вызывает гибель делящихся клеток. ЦД превращает 5-фторурацил в высокотоксичный метаболит 5-флуораурил, часто используемый в ХТ опухолей [33]. Онколитический аденовирус, экспрессирующий оба суицидных гена ТК и ЦД, был применен для лечения рака простаты совместно с радиационной терапией. Одно из испытаний проведено с участием 23 пациентов с впервые поставленным диагнозом рака простаты с высоким или средним риском прогрессирования. Через 2 года количество положительных биопсий составило всего 22% по сравнению с 40%, ожидаемыми в данной группе. При этом в группе среднего риска, состоящей из 12 пациентов, результаты анализа были отрицательны у всех пациентов [34]. В другом КИ введение аналогичного вектора пациентам с местным рецидивом рака простаты позволило отсрочить на 2 года проведение гормональной терапии [35]. Иницировано КИ III фазы для лечения больных раком простаты из группы среднего риска с применением комбинации лучевой терапии и аденовирусного генотерапевтического вектора (ClinicalTrials.gov).

Иммунотерапия. ГТ в иммунологии направлена на усиление иммунного ответа против опухолевых клеток или клеток, инфицированных вирусом. Это обширная область исследований и разработок, в которой ГТ тесно переплетается с клеточными технологиями [36]. Для лечения онкологических и вирусных заболеваний особое значение имеет Т-клеточный иммунитет. Т-лимфоциты разрушают опухолевые и инфицированные клетки, при этом они могут активно проникать через межклеточные барьеры, а также способны к самообновлению. Цитотоксические лимфоциты распознают клетки-мишени с помощью Т-клеточных рецепторов, специфичных к определенным антигенам, представленным на поверхности клеток в комплексе с собственной молекулой HLA. Описано большое количество специфических для опухолей антигенов, которые могли бы стать мишенью для Т-клеточного ответа. Однако такие антигены обладают слабой иммуногенностью, поскольку являются собственными белками организма, к которым Т-клетки имеют толерантность. Аналогично часть вирусных антигенов, особенно в случае латентной формы заболевания, являются слабоиммуногенными; кроме того, вирусы используют различные механизмы ухода от иммунного ответа. Направить Т-лимфоциты против опухолевых антигенов можно с помощью введения генов, кодирующих рецепторы, специфичные для данного антигена [37].

Группе американских исследователей удалось получить аутологичные лимфоциты периферической крови, несущие рецепторы к опухолевому антигену MART-1. Такой Т-клеточный рецептор, состоящий из α - и β -цепи, конструировался с учетом HLA гаплотипа. После введения этих лимфоцитов пациентам с меланомой высокий уровень трансгенных клеток поддерживался в течение 1 года и привел к регрессии повреждений, вызванных метастазами у 2 из 17 пациентов [38]. Те же авторы использовали другой высокоаффинный рецептор, узнающий MART-1-

антиген, после введения модифицированных клеток 20 пациентам с метастатической меланомой у 7 из них была достигнута полная ремиссия [39].

В других КИ введение α - и β -цепи искусственного рецептора, распознающего онкомаркеры HA-2 или MDM2, оказалось неэффективным из-за образования гибридных рецепторов, состоящих из цепи эндогенного рецептора и цепи искусственного рецептора [36].

Предложено создание химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptors CARs), молекулы которых состоят из нескольких доменов. Внеклеточный домен представляет собой связывающую антиген область, которая через петлю и трансмембранную область связана с цитоплазматическим сигнальным доменом (CD3 β -цепь или γ -цепь Fc-рецептора), необходимым для активации Т-клеточной цитотоксичности. В отличие от искусственных $\alpha\beta$ -рецепторов CAR состоят из одной цепи и не рестрицированы по HLA, поэтому являются универсальными для пациентов с различными гаплотипами HLA [37].

В КИ I фазы с использованием CAR-рецептора к молекуле L1 клеточной адгезии (L1-CAM), которая активно экспрессируется на поверхности опухолевых клеток, включили 6 детей с метастазирующей рецидивирующей или рефрактерной нейробластомой из группы высокого риска (прогноз продолжительности жизни менее года). Несмотря на то что трансгенные клетки персистировали всего лишь в течение 1 нед, у 3 пациентов наблюдалось уменьшение размера опухоли более чем на 50%, у одного из них продолжительность жизни после инфузии клеток составила 4,5 года [40].

Было показано, что короткое время жизни модифицированных лимфоцитов связано с отсутствием дополнительного клеточного сигнала, обеспечивающего рост и персистенцию данных клеток в организме. Для обеспечения такого сигнала предложено использовать CAR-рецепторы, содержащие дополнительный домен, который активирует пролиферацию (CD28, CD137, OX40, ICOS) или экспрессируется в той же клетке гены, кодирующие цитокины/факторы роста, стимулирующие размножение. Интересным решением является модификация популяции лимфоцитов, специфичных к антигену вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ). Данный антиген присутствует у большинства пациентов и обеспечивает активацию и длительное существование специфичных лимфоцитов [36]. Использование таких лимфоцитов в комплексе с химерным рецептором позволит достичь длительной цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток. В работе, проводимой в Центре клеточной и геновой терапии в Техасе, в аутологичные цитотоксические лимфоциты, специфичные к этому вирусу, вводили гены химерного рецептора, распознающие опухолевый антиген GD2. В испытание включили 8 пациентов с нейробластомой IV степени. После инфузии модифицированные клетки обнаруживались в кровотоке в течение 6 нед. Однократное введение клеток привело к полной ремиссии у одного пациента и некрозу и временной регрессии опухоли еще у 3 больных через 16 нед [41].

Исследования в области ГТ показывают, что активность Т-лимфоцитов можно значительно повысить, уменьшив время культивирования *in vitro* и используя специальный набор цитокинов, а также отбирая лимфоциты с определенным фенотипом, например фенотипом клеток центральной памяти или наивных лимфоцитов. Ожидается, что совершенствование методов работы с клетками приведет и к повышению эффективности терапии в планируемых КИ [42].

Другое направление в иммунотерапии — воздействие на иммунитет, используя презентующие антиген клетки, в частности дендритные клетки (ДК). Они захватывают и процессируют антигены, превращая белки в пептиды, которые представляют на поверхности клеток в комплексе с молекулами HLA. Затем ДК мигрируют во вторичные лимфоидные органы, где презентуют антигены Т-клеткам, инициируя иммунный ответ, специфичный для антигена. ДК получают из моноцитов периферической крови, дифференцируя их *in vitro*. Использование генотерапевтических методов позволяет нагрузить клетки антигеном несколькими способами: введением мРНК, плазмиды или вирусного вектора, кодирующего антиген [43]. После этого с помощью этих клеток можно либо активировать Т-клетки в лаборатории, сокультивируя два типа клеток, и затем ввести пациенту, либо проводить инъекцию модифицированных ДК подкожно или в лимфоидный узел.

Осуществимость первого подхода показана при лечении злокачественных опухолей, ассоциированных с ВЭБ. В таких опухолях клетки с латентным вирусом экспрессируют ВЭБ антигены LMP1 и LMP2, которые обладают слабой иммуногенностью; кроме того, раковые клетки используют механизмы укло-

нения от иммунного ответа. Введение в ДК конструкции, активно экспрессирующей эти слабые антигены, позволило *in vitro* активировать цитотоксические лимфоциты пациента, специфичные к данным антигенам. Последующая инфузия активированных лимфоцитов привела к полной регрессии опухоли у 4 из 6 пациентов с ассоциированной с ВЭБ лимфомой и рецидивом заболевания. У 9 из 10 пациентов высокого риска развития рецидива стадия ремиссии сохранялась по крайней мере в течение 3 лет после лечения [44]. Аналогичные результаты были получены у больных с ассоциированной с ВЭБ назофарингеальной карциномой [45].

Еще один пример использования ДК — защита от вирусной инфекции больных с ослабленным иммунитетом. При пересадке костного мозга вирусные инфекции — цитомегаловирусная (ЦМВ), ВЭБ, аденовирусная — одна из наиболее частых причин смерти. Перенос иммунологически компетентных, специфичных для вирусов реактивных Т-клеток донора в организм пациента помогает предотвратить инфекции. В клиническом испытании ДК донора костного мозга трансформировали антигеном ВЭБ в составе АВВ. Модифицированные таким образом ДК использовали *in vitro* для стимуляции и отбора лимфоцитов, специфичных к ВЭБ и аденовирусу, которые затем вводили пациентам. Ни у одного из 13 пациентов не наблюдалось развития лимфопролиферативного заболевания, связанного с ВЭБ, 2 избавились от аденовирусной инфекции [46]. Предложен аналогичный метод отбора Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам сразу 4 вирусов (ЦМВ, ВЭБ, БК полиомавируса, аденовируса) [47].

Успешная противоопухолевая вакцинация ДК проведена у 5 пациентов с острой миелоидной лейкемией в стадии полной или частичной ремиссии. ДК были трансформированы мРНК, кодирующей антиген WT1 (Wilm's tumor 1 antigen), и введены подкожно. У 2 пациентов с частичной ремиссией была достигнута полная ремиссия, еще 3 оставались в стадии ремиссии в течение по крайней мере 4 лет. Уровень маркера, ассоциированного с опухолью, вернулся к норме у всех пациентов [48].

ГТ инфекционных болезней. Доля КИ по лечению инфекционных заболеваний с помощью ГТ выросла с 6,5% в 2007 г. до 8% в 2010 г. Большинство работ составляли испытания препаратов против ВИЧ, на втором месте — препараты для лечения вирусных гепатитов.

Один из основных подходов в ГТ инфекционных заболеваний, активно развивающийся в настоящее время, направлен на усиление иммунного ответа хозяина против вируса, что может быть достигнуто за счет Т-клеточной терапии, экспрессии *in vivo* цитокинов, терапевтической иммунизации рекомбинантными плазмидами или модифицированными ДК [49]. Принципы и примеры данного подхода рассмотрены в предыдущем разделе.

Другой подход основан на введении в целевые клетки генов, подавляющих репликацию вируса. Это направление использовано для разработки ГТП против ВИЧ-инфекции. В данном случае проводится модификация лимфоцитов или ГСК методом *ex vivo*. Для придания этим клеткам устойчивости к ВИЧ используют различные гены, различающиеся по механизму действия. Экспрессия таких трансгенов может препятствовать проникновению вируса в клетку (ингибиторы слияния, гены, выключающие экспрессию корцептора CCR5), интеграции вируса в геном (модифицированный фактор врожденного иммунитета TRIM5) или ингибировать репликацию вируса в клетке (антисмысловые последовательности, рибозимы, аптамеры, короткие интерферирующие РНК, доминантно-негативные белки) [49, 50].

Вследствие высокой мутагенности ВИЧ введение в клетку одного противовирусного гена в большинстве случаев приводит к появлению устойчивых к этому агенту мутантов вируса. Одним из решений данной проблемы может быть использование в структуре одного вектора комбинации из нескольких генов, механизм действия которых различен. Вектор, содержащий 3 различных гена (*triple vector*), оказался высокоэффективным для подавления репликации вируса в культуре клеток и показал хорошие результаты на животной модели мышей, восприимчивых к ВИЧ [51]. Начаты клинические испытания данного препарата. В другом проекте отсутствие устойчивых мутантов обеспечило использование протяженной (более 900 п. н.) антисмысловой последовательности. Вектор, несущий данную последовательность, проявил высокую эффективность в доклинических испытаниях и безопасность в первой фазе КИ. Предварительные результаты, полученные на большой группе пациентов ($n = 60$), демонстрируют длительный контроль вирусной нагрузки после инфузии клеток, модифицированных вектором [52].

Лечение сердечно-сосудистых заболеваний. Количество КИ, связанных с ГТ сердечно-сосудистых заболеваний, с 2007 г. занимает второе место после КИ по онкологии (8,7%). В основном предпринимаются попытки лечения ишемической болезни сердца и облитерирующих заболеваний сосудов нижних конечностей. ГТ направлена на улучшение кровоснабжения ишемизированных областей за счет терапевтического ангиогенеза. Для этой цели вводят гены, кодирующие белки, которые способствуют росту сосудов, такие как фактор роста фибробластов (FGF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF) [53]. Разработки конструкций, содержащих ген VEGF, велись и в российских исследовательских институтах [54]. Кроме того, в доклинических испытаниях было показано успешное применение генов, кодирующих тромбоцитарный фактор роста (PDGF), ангиопоэтин Ang-1, стромальный, полученный из клеток фактор SDF-1 [55].

В целом, несмотря на достигнутую эффективность в доклинических испытаниях на животных моделях и безопасность применения, показанную в испытаниях I фазы, КИ II фазы не дали достоверных положительных клинических результатов в течение длительного времени [53]. Это связано в основном с тем, что в случае данной патологии особенно сложно осуществить доставку генетической конструкции, так как вектор должен преодолеть несколько анатомических барьеров: эндотелий, базальную мембрану, внеклеточный матрикс. Решение имеющихся проблем связывают с появлением новых кардиотропных векторов (например, аденоассоциированный вектор серотип 9), имеющих повышенное сродство к миоцитам [55].

ГТ глазных болезней. Глаз является уникальным органом, так как его анатомическая изолированность облегчает доставку ГТП. Современные технологии в области микрохирургии глаза позволяют вводить вектор в определенную область внутри глаза. Небольшого количества вектора вполне достаточно для того, чтобы эффективно трансформировать клетки, не опасаясь системного распространения. Это, а также разработка рекомбинантных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (gAAV), по-видимому, сыграли решающую роль в успехе ГТ в области офтальмологии.

В 2008 г. сразу 3 группы исследователей сообщили об успешном проведении I фазы КИ для лечения наследственного заболевания сетчатки — врожденной слепоты Лебера (врожденный амавроз Лебера) [56]. Одна из мутаций, вызывающих это заболевание, находится в гене RPE65, который кодирует фермент, необходимый для рециркуляции витамина А. В отсутствие этого фермента происходит медленная дегенерация клеток сетчатки, приводящая к полной слепоте в возрасте 20–30 лет. В ходе клинических испытаний нормальный ген RPE65 в составе вектора gAAV вводили в субретинальную область глаза. Всего в I фазу 3 КИ включили 9 пациентов в возрасте 17–26 лет. Были отмечены хорошая переносимость лечения, слабая иммуногенность препарата и длительное функциональное улучшение зрения, особенно у пациентов с менее выраженной дегенерацией сетчатки [57]. По результатам этих работ была инициирована следующая стадия КИ с включением в нее детей. Максимальный эффект достигнут у 4 детей в возрасте 8–11 лет, зрение которых восстановилось настолько, что они смогли пойти в школу и заниматься спортом. У самого младшего пациента уровень светочувствительности сетчатки достиг нормального уровня для этого возраста [58].

После успешного исправления данной мутации были начаты работы по лечению наследственной слепоты, вызванной нарушениями в других генах, а также пигментного ретинита, вызываемого мутацией в генах, участвующих в фототрансдукции [56]. На модели беличьих обезьян продемонстрирована принципиальная возможность лечения дальтонизма при помощи доставки гена L-опсина [59]. Предпринимаются попытки лечения приобретенных заболеваний, таких как возрастная макулярная дегенерация, диабетический макулярный отек, глаукома, поверхностное помутнение роговицы [56].

ГТ в неврологии. С помощью ГТ предпринимаются попытки лечения нескольких неврологических заболеваний, среди которых наиболее обнадеживающие результаты получены при лечении болезни Паркинсона [60]. В основе этого заболевания лежит разрушение дофаминовых нейронов в ряде структур ствола мозга (главным образом в черной субстанции). В результате уменьшается количество дофамина и возникает преобладание других нейромедиаторов в стриатуме, что приводит, в частности, к сверхактивности субталамического ядра (STN), высвобождению возбуждающего нейротрансмиттера глутамата и как следствие развитию характерных для болезни Паркинсона двигательных нарушений. Один из генотерапевтических подходов

— внесение с помощью малоинвазивной нейрохирургической операции в субталамические ядра аденоассоциированного вектора с геном декарбоксилазы глутаминовой кислоты. В результате STN начинает синтезировать ингибирующий ГАВА-трансммиттер, необходимый для восстановления нормального физиологического функционирования цепей нейронов. В I фазе КИ у пациентов были отмечены значительные улучшения их состояния, которые проявлялись через 3 мес после начала лечения и наблюдались не менее года. Клинические улучшения сопровождались нормализацией метаболизма в задействованных областях мозга [61].

Другой подход, использованный для лечения болезни Паркинсона, направлен на увеличение концентрации дофамина в стриатуме. Для этого в составе аденоассоциированного вектора вводили ген, кодирующий L-ДОФА — декарбоксилазу, лимитирующий фермент в синтезе дофамина. Через 6 мес после введения такого вектора у пациентов наблюдалось улучшение моторики в среднем на 46% по "Единой оценочной шкале болезни Паркинсона" [62]. Еще одна группа исследователей использовала ЛВВ, содержащий 3 гена, необходимые для синтеза дофамина, который был успешно протестирован на модели обезьян [63].

Заключение. В настоящее время ГТ, несомненно, достигла успехов в лечении целого ряда заболеваний. Полученные результаты впечатляют, применение усовершенствованных векторов и предварительное тестирование иммунореактивности препарата позволяют избежать серьезных побочных эффектов. Протоколы КИ продолжают модифицироваться, приводя к повышению эффективности и безопасности лечения. Предложены новые векторы, которые обладают строгой специфичностью к определенным типам клеток и способны проникать в соответствующие ткани из кровотока [64]. Использование данных векторов должно привести к прорыву в некоторых областях, например в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, мышечных дистрофий и заболеваний, связанных с дефицитом лизосомальных ферментов [65]. Перспективным направлением в ГТ является применение РНК-интерференции, в частности микроРНК, для регуляции работы генов [66].

В практическом плане ограничением для развития и широкого применения ГТ являются сложность стандартизации работ с биологическим материалом (клетками пациента, векторными вирусными частицами) и высокая стоимость терапии. Предпринимаются активные шаги для решения этих проблем. Так, для работы с клетками разрабатывается полностью закрытая и автоматизированная система, которая позволит стандартизовать все манипуляции с клетками *in vitro* [67]. Ведутся работы по увеличению эффективности производства генотерапевтических вирусных частиц, рассматривается вариант замены вирусных векторов на ДНК векторы для терапии *ex vivo* [68], что позволило бы радикально уменьшить затраты на производство и контроль качества препаратов.

Уже два препарата одобрены для клинического применения в Китае. Еще два (Сергеро и Glybera) после прохождения III фазы КИ были направлены для утверждения в Европейское агентство по регулированию медицинских препаратов. По-видимому, следует ожидать появления препарата, направленного на лечение АДА-ТКИД. Таким образом, можно констатировать начало внедрения методов ГТ в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Breakthrough of the year. The runners-up. *Science* 2009; 326 (5960): 1600—1607.
2. Heilbronn R., Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2010; 197: 143—170.
3. Viola J. R., El-Andaloussi S., Oprea I. I., Smith C. I. Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2010; 7 (6): 721—735.
4. 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 (5235): 475—480.
5. Somia N., Verma I. M. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 2000; 1 (2): 91—99.
6. Hacein-Bey-Abina S., Garrigue A., Wang G. P. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (9): 3132—3142.
7. Rosenberg S. A., Aebersold P., Cornetta K. et al. Gene transfer into humans — immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by

- retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323 (9): 570—578.
8. Aiuti A., Roncarolo M. G. Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. In: *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2009. 682—689.
9. Aiuti A., Cattaneo F., Galimberti S. et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (5): 447—548.
10. Hacein-Bey-Abina S., Hauer J., Lim A. et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363 (4): 355—364.
11. Gaspar H. B., Parsley K. L., Howe S. et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004; 364 (9452): 2181—2187.
12. European Community clinical trials database EudraCT No.: 2007-000684-16: <http://eudract.emea.europa.eu>.
13. Zhang F., Thornhill S. I., Howe S. J. et al. Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells. *Blood* 2007; 110 (5): 1448—1457.
14. Thornhill S. I., Schambach A., Howe S. J. et al. Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Mol. Ther.* 2008; 16 (3): 590—598.
15. Kang E. M., Malech H. L. Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol. Res.* 2009; 43 (1—3): 77—84.
16. 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-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* 2006; 12 (4): 401—409.
17. Kang E. M., Choi U., Theobald N. et al. Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. *Blood* 2010; 115 (4): 783—791.
18. Boztug K., Schmidt M., Schwarz A. et al. Correction of Wiskott-Aldrich syndrome by hematopoietic stem cell gene therapy. In: XVIII Annual congress of the European Society of Gene and Cell Therapy. (ESGCT) October 22—25, 2010. Milan, Italy: 49.
19. Pawliuk R., Westerman K. A., Fabry M. E. et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 2001; 294 (5550): 2368—2371.
20. Sadelain M., Lisowski L., Samakoglu S. et al. Progress toward the genetic treatment of the beta-thalassemias. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; 1054: 78—91.
21. Kaiser J. Gene therapy: Beta-thalassemia treatment succeeds, with a caveat. *Science* 2009; 326 (5959): 1468—1469.
22. Semmler A., Köhler W., Jung H. H. et al. Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Expert Rev. Neurother.* 2008; 8 (9): 1367—1379.
23. Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C. C. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009; 326 (5954): 818—823.
24. Sharma A., Tandon M., Bangari D. S., Mittal S. K. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy. *Curr. Drug Ther.* 2009; 4 (2): 117—138.
25. Sherr C. J., McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2 (2): 103—112.
26. Roth J. A. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006; 6 (1): 55—61.
27. Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther.* 2005; 16 (9): 1016—1027.
28. INGN 201: Ad-p53, Ad5CMV-p53, adenoviral p53, p53 gene therapy-introgen, RPR/INGN 201. *Drugs in R. D.* 2007; 8 (3): 176—187.
29. Shimada H., Matsubara H., Shiratori T. et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2006; 97 (6): 554—561.
30. Yu W., Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr. Cancer Drug Targets* 2007; 7 (2): 141—148.
31. Khuri F. R., Nemunaitis J., Ganly L., et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* 2000; 6 (8): 879—885.

32. *Aghi M., Martuza R. L.* Oncolytic viral therapies — the clinical experience. *Oncogene* 2005; 24 (52): 7802—7816.
33. *Aghi M., Kramm C. M., Chou T. C.* et al. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90 (5): 370—380.
34. *Freytag S. O., Movsas B., Aref I.* et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer. *Mol. Ther.* 2007; 15 (5): 1016—1023.
35. *Freytag S. O., Stricker H., Peabody J.* et al. Five-year follow-up of trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy for treatment of prostate cancer. *Mol. Ther.* 2007; 15 (3): 636—642.
36. *Brenner M. K., Okur F. V.* Overview of gene therapy clinical progress including cancer treatment with gene-modified T cells. In: *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2009: 675—681.
37. *Westwood J. A., Kershaw M. H.* Genetic redirection of T cells for cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87 (5): 791—803.
38. *Morgan R. A., Dudley M. E., Wunderlich J. R.* et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314 (5796): 126—129.
39. *Johnson L. A., Morgan R. A., Dudley M. E.* et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 2009; 114 (3): 535—546.
40. *Park J. R., Digusto D. L., Slovak M.* et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol. Ther.* 2007; 15 (4): 825—833.
41. *Pule M. A., Savoldo B., Myers G. D.* et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat. Med.* 2008; 14 (11): 1264—1270.
42. *Mondino A., Dardalhon V., Michelini R. H.* et al. Redirecting the immune response: role of adoptive T cell therapy. *Hum. Gene Ther.* 2010; 21 (5): 533—541.
43. *Koido S., Haza E., Homma S.* et al. Cancer vaccine by fusions of dendritic and cancer cells. *Clin. Dev. Immunol.* 2009; 2009:657369: 1—13.
44. *Bollard C. M., Gotschalk S., Leen A. M.* et al. Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer. *Blood* 2007; 110 (8): 2838—2845.
45. *Straathof K. C., Bollard C. M., Popat U.* et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein — Barr virus-specific T lymphocytes. *Blood*. 2005; 105 (5): 1898—1904.
46. *Leen A. M., Christin A., Myers G. D.* et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein — Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 2009; 114 (19): 4283—4292.
47. *Gerdemann U., Christin A. S., Vera J. F.* et al. Nucleofection of DCs to generate Multivirus-specific T cells for prevention or treatment of viral infections in the immunocompromised host. *Mol. Ther.* 2009; 17 (9): 1616—1625.
48. *Van Tendeloo V. F., Van de Velde A., Van Driessche A.* et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107 (31): 13824—13829.
49. *Von Laer D., Baum C., Protzer U.* Antiviral gene therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009; 189: 265—297.
50. *Rossi J. J., June C. H., Kohn D. B.* Genetic therapies against HIV. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25 (12): 1444—1454.
51. *Anderson J., Li M. J., Palmer B.* et al. Safety and efficacy of a lentiviral vector containing three anti-HIV genes — CCR5 ribozyme, tat-rev siRNA, and TAR decoy — in SCID-hu mouse-derived T cells. *Mol. Ther.* 2007; 15 (6): 1182—1188.
52. http://www.natap.org/2009/HIV/012709_01.htm
53. *Gupta R., Tongers J., Losordo D. W.* Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ. Res.* 2009; 105 (8): 724—736.
54. *Бокерия Л. А., Аракелян В. С., Еремеева М. В.* и др. Опыт лечения хронической ишемии нижних конечностей с помощью стимуляторов ангиогенеза. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2007; 3: 159—164.
55. *Jazwa A., Jozkowicz A., Dulak J.* New vectors and strategies for cardiovascular gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 2007; 7 (1): 7—23.
56. *Roy K., Stein L., Kaushal S.* Ocular gene therapy: an evaluation of recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy interventions for the treatment of ocular disease. *Hum. Gene Ther.* 2010; 21 (8): 915—927.
57. *Bainbridge J. W., Ali R. R.* Success in sight: The eyes have it! Ocular gene therapy trials for LCA look promising. *Gene Ther.* 2008; 15 (17): 1191—1192.
58. *Maguire A. M., High K. A., Auricchio A.* et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase I dose-escalation trial. *Lancet* 2009; 374 (9701): 1597—1605.
59. *Mancuso K., Hauswirth W. W., Li Q.* et al. Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates. *Nature* 2009; 461 (7265): 784—787.
60. *Feng L. R., Maguire-Zeiss K. A.* Gene therapy in Parkinson's disease: rationale and current status. *CNS Drugs* 2010; 24 (3): 177—192.
61. *Kaplit M. G., Feigin A., Tang C.* et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007; 369 (9579): 2097—2105.
62. *Muramatsu S., Fujimoto K., Kato S.* et al. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol. Ther.* 2010; 18 (9): 1731—1735.
63. *Jarraya B., Boulet S., Ralph G. S.* et al. Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci. Transl. Med.* 2009; 1 (2): 2—4.
64. *Zhong L., Li B., Mah C. S.* et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105 (22): 7827—7832.
65. *Asokan A., Conway J. C., Phillips J. L.* et al. Reengineering receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (1): 79—82.
66. *Marquez R. T., McCaffrey A. P.* Advances in microRNAs: implications for gene therapists. *Hum. Gene Ther.* 2008; 19 (1): 27—38.
67. *Klapper J. A., Thomasian A. A., Smith D. M.* et al. Single-pass, closed-system rapid expansion of lymphocyte cultures for adoptive cell therapy. *J. Immunol. Meth.* 2009; 345 (1—2): 90—99.
68. *Hackett P. B., Largaespada D. A., Cooper L. J.* A transposon and transposase system for human application. *Mol. Ther.* 2010; 18 (4): 674—683.

Поступила 01.11.10