



## Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов

А.А. Солдатов , Ж.И. Авдеева, Д.В. Горенков, Л.М. Хантимирова, С.Г. Гусева, В.А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Солдатов Александр Алексеевич; [Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

### Резюме

В настоящее время известно большое количество заболеваний, патогенез которых обусловлен генетическими нарушениями. Достижения в области генетики и биотехнологии привели к созданию методов, которые позволяют получить практически любой ген, что в конечном счете привело к появлению нового класса лекарственных средств – генотерапевтических препаратов (ГТП). Цель работы – критический анализ международного опыта создания и регистрации генотерапевтических лекарственных препаратов. В обзоре освещены проблемы разработки ГТП, связанные с поиском оптимального подхода для доставки терапевтического гена в клетки-мишени. Обосновано, что перспективными средствами доставки генов являются вирусные векторы, среди которых наибольшей эффективностью и безопасностью обладают препараты на основе аденовируса (AV) и аденоассоциированного вируса (AAV). Рассмотрены современные подходы для генного редактирования, позволяющие модифицировать AV и AAV для повышения эффективности и безопасности ГТП. Данные модификации необходимы для включения в вирусный вектор терапевтического гена большого размера, снижения уровня экспрессии вирусных белков и снижения иммуногенности вирусного вектора. Представлен опыт регистрации ГТП в регуляторных органах США и Европейского союза, в том числе сведения о подкомитетах в структурах FDA и EMA, выполняющих рекомендательные функции. Отмечено, что в Российской Федерации зарегистрирован один ГТП отечественного производства и активно ведутся разработки других препаратов данной группы. Сделано заключение о необходимости формирования отечественной нормативной базы для разработки и регистрации ГТП, а также нормативных рекомендаций в рамках государств – членов Евразийского экономического союза.

**Ключевые слова:** генотерапевтические препараты; аденовирусный вектор; аденоассоциированный вектор; безопасность генотерапевтических препаратов

**Для цитирования:** Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Горенков Д.В., Хантимирова Л.М., Гусева С.Г., Меркулов В.А. Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):6–22. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-6-22>

## Challenges in development and authorisation of gene therapy products

A.A. Soldatov ✉, Zh.I. Avdeeva, D.V. Gorenkov, L.M. Khantimirova, S.G. Guseva, V.A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Aleksandr A. Soldatov; [Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

### Abstracts

There are a lot of diseases known today, which are caused by genetic abnormalities. Advances in genetics and biotechnology brought about gene editing technologies that can produce almost any gene, which ultimately led to the emergence of a new class of medicines – gene therapy products (GTPs). The aim of the study was to analyse international experience in development and authorisation of GTPs. The review highlights the challenges in GTP development, related to the search for an optimal approach to therapeutic gene delivery to the target cells. Viral vectors were shown to be a promising gene delivery system, with adenovirus- (AV) and adeno-associated virus- (AAV) based products demonstrating the highest efficacy and safety. The paper reviews current approaches to gene editing that allow modification of AVs and AAVs to improve GTP efficacy and safety. These modifications are carried out with the aim of, e.g., including a large therapeutic gene into a viral vector, decreasing viral protein expression levels, and decreasing viral vector immunogenicity. The review summarises GTP authorisation procedures in the USA and the European Union, including data on FDA and EMA subcommittees and departments entrusted with advisory functions. The paper mentions that there is one Russian-produced GTP authorised in the Russian Federation, and some other GTPs are in the pipeline. Therefore, the Russian regulatory framework and the Eurasian regulations and recommendations should be updated in order to accommodate for GTP development and authorisation.

**Key words:** gene therapy products; adenoviral vector; adeno-associated vector; safety of gene therapy products

**For citation:** Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Gorenkov D.V., Khantimirova L.M., Guseva S.G., Merkulov V.A. Challenges in development and authorisation of gene therapy products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):6–22. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-6-22>

### Введение

Синтез белков, которые отвечают за процессы регуляции и участвуют в процессах роста тканей организма, происходит в клетках под контролем генов, количество которых составляет более 25 000. Несмотря на высокую стабильность передачи генетической информации следующим поколением, встречается достаточно большое количество заболеваний, патогенез которых связан с генетическими нарушениями, что проявляется недостаточностью или полным отсутствием продукции соответствующего белка. Лечение генетических заболеваний базируется на заместительной терапии биотерапевтическими препаратами (ферменты, факторы свертывания крови и др.). Однако данный вид терапии имеет ряд недостатков, в первую очередь связанных с необходимостью

их постоянного введения. Кроме того, препараты на основе белка имеют низкую растворимость и биодоступность, короткий период полувыведения и обладают иммуногенностью [1]. При этом производство биотерапевтических препаратов представляет собой сложный биотехнологический процесс с высокими материальными затратами.

Успехи в области современной генетики, биотехнологии и биохимии привели к созданию методов модификации генетических программ клеток, что позволило разработать подходы для лечения генетических нарушений. В конечном итоге появились препараты нового поколения, которые получили название генотерапевтические лекарственные средства.

Генотерапия является инновационным методом лечения, основанным на введении

в организм функциональных генов, которые заменяют дефектные или отсутствующие гены в клетке. Таким образом, однократное введение генотерапевтического препарата (ГТП) позволяет восполнить синтез белка, дефицит которого обусловлен отсутствием или недостаточностью соответствующего гена. Кроме того, ГТП при необходимости могут блокировать гены, отвечающие за избыточный синтез белка, играющего ключевую роль в патогенезе заболевания. Поэтому появление первых ГТП инициировало поиск и генотерапевтических подходов для лечения заболеваний, которые не относятся к генетическим (опухолевые, дистрофические, аутоиммунные и др.).

Так как ГТП являются лекарственными средствами последнего поколения, которые содержат генетические структуры и для которых требуются особые условия доставки к клеткам-мишеням и встраивания терапевтического гена, то, несмотря на значительные успехи данного направления, при разработке и проведении доклинических и клинических исследований ГТП производители данной группы препаратов сталкиваются с различного рода проблемами. Об этом свидетельствует тот факт, что в настоящее время зарегистрированы единичные препараты для генной терапии, а у приблизительно половины ГТП, на которые была выдана временная лицензия, позднее она была отозвана. Кроме того, в Российской Федерации утверждены нормативные требования для ГТП, применяемых *ex vivo*<sup>1</sup>, а отечественные документы, регламентирующие вопросы разработки, контроля и регистрации ГТП для применения *in vivo* и *in situ*, отсутствуют.

В работе представлен анализ международного и отечественного опыта разработки и регистрации ГТП. Основное внимание в обзоре уделено проблемным аспектам разработки и регистрации препаратов данной группы, которые необходимо учитывать при подготовке отечественных нормативных требований для оценки качества, безопасности и эффективности ГТП для *in vivo* и *in situ* применения.

Цель работы – критический анализ международного опыта создания и регистрации генотерапевтических препаратов.

## Характеристика генотерапевтических препаратов

Согласно определению, приведенному в документе Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA), к ГТП относятся препараты, которые «опосредуют свое действие путем транскрипции и/или трансляции переданного генетического материала и/или путем интеграции в геном хозяина в виде нуклеиновых кислот, вирусов или генно-инженерных методов»<sup>2</sup> [2]. В определении ГТП Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) более подробно охарактеризованы основные свойства лекарственного продукта для генотерапии: «биологический лекарственный продукт, который содержит активное вещество в виде рекомбинантной нуклеиновой кислоты или состоит из нее, который используется или вводится людям для регулирования, восстановления, замены, добавления или удаления генетической последовательности, и его терапевтический, профилактический или диагностический эффект напрямую связан с рекомбинантной последовательностью нуклеиновой кислоты, которую он содержит, или с продуктом, экспрессирующим эту генетическую последовательность»<sup>3</sup> [2]. В Российской Федерации в Федеральном законе «Об обращении лекарственных средств»<sup>4</sup> дано определение ГТП близкое к определению EMA: «Генотерапевтические лекарственные препараты – лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности»<sup>5</sup> (введено Федеральным законом от 22.12.2014 № 429-ФЗ).

Таким образом, генная терапия включает в себя определение дефектного или отсутствующего гена, его синтез и доставку гена в клетку. Функциональной единицей (действующим веществом) ГТП обычно является ДНК, мРНК, малые интерферирующие РНК (siRNA) и малые некодирующие молекулы РНК (miRNA), а также

<sup>1</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

<sup>2</sup> Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). Guidance for Industry. FDA; 2020. <https://www.fda.gov/media/113760/download>

<sup>3</sup> Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014). EMA; 2018. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf)

<sup>4</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

<sup>5</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».

синтетические молекулы (например, антисмысловые олигонуклеотиды).

ГТП могут встраивать свой «терапевтический ген» в клетки зародышевой линии и соматические клетки. Воздействие ГТП на клетки зародышевой линии (сперматозоиды и яйцеклетки) позволяет передавать наследственные изменения потомству. Потенциал генотерапии при введении ГТП, влияющих на клетки зародышевой линии, был продемонстрирован в исследованиях на животных (мыши, крысы, кролики, овцы, свиньи, козы и крупный рогатый скот) [3]. Исследования, посвященные разработке ГТП, влияющих на клетки зародышевой линии человека, по этическим соображениям не проводились, но активно дискутируются в научной литературе [4].

Использование ГТП с внесением генетической информации в соматические клетки не вызывает передачи генетических изменений потомству.

Терапевтический ген должен быть доставлен в соответствующую клетку-мишень, что реализуется с помощью *ex vivo*, *in situ* или *in vivo* методов. Метод генной терапии *ex vivo* основан на извлечении из организма клеток, модификации их генетической информации и обратное возвращение клеток в организм. Например, зарегистрированный FDA препарат Kymriah позволяет в условиях *ex vivo* встроить в Т-лимфоциты ген, кодирующий химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR) к CD19, который распознает и вызывает гибель опухолевых В-лимфоцитов при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе [5]. Для этого у пациента берут Т-лимфоциты, внедряют в них генетическую конструкцию, полученные генетически модифицированные клетки размножают и готовый препарат вводят обратно в организм пациента. Генетически модифицированные Т-лимфоциты (CAR Т-лимфоциты) экспрессируют новый белок – химерный антигенный рецептор (CAR), который позволяет им находить и прицельно уничтожать опухолевые В-лимфоциты, экспрессирующие CD19.

Генная терапия *ex vivo* – это генетическая модификация клеток *in vitro*, которые затем доставляются пациенту. Поскольку генная терапия *ex vivo*, включающая этапы извлечения клеток, их модификации с целью изменения генетических программ и введения пациенту, требует особых условий (например, соблюдение стерильности), эти продукты должны соответ-

ствовать нормативным требованиям как в отношении лекарственных продуктов на клеточной основе, так и в отношении продуктов генотерапии [6]. Соответственно, к ГТП, применяемым *ex vivo*, предъявляются особые требования, касающиеся качества, производства, доклинических и клинических исследований и особых условий введения лекарственного средства.

При применении препаратов *ex vivo* если возможно формирование комплекса, состоящего из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения, то такой комплекс получил название биомедицинского клеточного продукта (БМКП)<sup>6</sup>. При этом, чтобы препарат был отнесен к БМКП, клетки, которые извлекаются из организма, должны быть подвергнуты модификации или культивированию<sup>7</sup>.

В Российской Федерации вопросы, связанные с разработкой, доклиническими исследованиями, экспертизой, государственной регистрацией, клиническими исследованиями, производством, реализацией и хранением БМКП, регламентируются Федеральным законом «О биомедицинских клеточных продуктах»<sup>8</sup>.

Метод генной терапии *in situ* (доставка «к месту») основан на введении ГТП непосредственно в клетки или ткани-мишени организма. Например, отечественный препарат для ревазуляризации при ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза Неоваскулген на основе плазмидного вектора, который содержит ген фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), вводится непосредственно в ишемическую ткань для стимуляции роста кровеносных сосудов [7]. В настоящее время проводятся исследования для использования метода генной терапии *in situ* для лечения муковисцидоза, мышечной дистрофии и др. При этом наиболее активно проводятся исследования по разработке ГТП, применяемых *in situ* для лечения опухолевых заболеваний.

### История развития генотерапевтических препаратов

Первым применил генную терапию M. Clive с соавт. в 1980 г. при лечении β-талассемии у двух пациентов [8]. Авторы разработали ГТП на основе ретровируса, содержащего ген β-глобина, препарат вводили в гемопоэтические стволовые

<sup>6</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

<sup>7</sup> Там же.

<sup>8</sup> Там же.

клетки. Препарат не продемонстрировал эффективности. Следует отметить, что FDA не утвердило протокол клинического исследования [8]. И только в 1988 г. было выдано первое официальное разрешение на проведение клинического исследования без оценки эффективности [9]. Исследование было запланировано с целью оценки возможности введения гена в клетку в условиях *ex vivo* без оценки эффективности. Авторам исследования удалось продемонстрировать встраивание гена в Т-лимфоциты. Именно это исследование продемонстрировало, что генная терапия возможна [9].

Первое исследование эффективности ГТП было начато в 1990 г. F. Anderson и M. Blaese (цитирование по [10]) для лечения синдрома дефицита аденозиндезаминазы (ADA), сопровождающегося тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ADA-SCID). ГТП вводили *ex vivo*, и у 4 из 6 добровольцев терапевтический эффект сохранялся в течение 43 месяцев [10].

Первые успехи значительно повысили интерес к генотерапии и стимулировали разработку препаратов для лечения рака, в первую очередь на основе генов, отвечающих за экспрессию ингибиторов роста опухоли (например, ген, ответственный за синтез белка p53). В то же время проведенные исследования выявили и определенные сложности. Следует отметить, что введение препарата непосредственно в опухоль более эффективно, чем системное введение. Однако введение непосредственно в опухоль не позволяет воздействовать на метастатические клетки. При этом системное введение противоопухолевых ГТП вызывает слабую долгосрочную экспрессию гена и широкое биораспределение ГТП [11]. Первые исследования не оправдали надежды на эффективность системного (*in vivo*) введения ГТП. Основными причинами (кроме указанных) были иммунный клиренс вектора, слабый тропизм вектора к клеткам/тканям-мишеням, недостаточное количество вирусных векторов в препарате и др.

Наиболее подходящими заболеваниями для лечения ГТП являются моногенные заболевания. Первые клинические исследования применения ГТП (*in vivo*) для лечения моногенных заболеваний (муковисцидоз и мышечная дистрофия Дюшенна) были неудачными из-за проблем с доставкой терапевтического гена в клетки-мишени. При лечении дистрофии Дюшенна проблемы доставки были связаны с тем, что поверхность мышечной ткани, включая легкие и сердце, очень обширна [12].

В конце 1990-х гг. произошли трагические события, которые на десятилетие подорвали интерес к генотерапии. Данные события про-

изошли в процессе клинического исследования в США ГТП, разработанного для лечения дефекта в результате мутации гена орнитинтранскарбамилазы (ОТ) – фермента, который отвечает за расщепление аммиака в организме. Препарат был разработан на основе аденовирусного вектора, содержащего ген ОТ, который вводили в печеночную артерию. При этом предполагалось, что произойдет трансдукция аденовируса в клетки печени с последующей экспрессией ОТ, что приведет к восстановлению процесса расщепления аммиака. Введение пациенту  $6 \times 10^{10}$  вирусных частиц/кг привело к развитию воспалительной реакции, которая началась с дисфункции печени и завершилась полиорганной недостаточностью и смертью пациента [13].

Клиническое исследование ГТП для лечения ADA-SCID на основе ретровирусного вектора, проведенное на пациентах, у которых брали Т-лимфоциты и обрабатывали их препаратом с целью восстановления дефектного гена, показало, что Т-лимфоциты, обработанные препаратом, после введения их обратно в организм начинали активно пролиферировать и развивалась клиническая картина, напоминающая Т-лимфобластный лейкоз [14]. Это привело к гибели одного пациента, а остальным трем пациентам вынужденно был проведен курс химиотерапии. Анализ причин данного осложнения показал, что терапевтический ген встраивался в геном Т-лимфоцитов непосредственно перед геном LMO2, который является хорошо охарактеризованным онкогеном [15].

Последствием данных событий стала более жесткая позиция при выдаче разрешений на проведение клинических исследований и снижение интереса к данной проблеме среди разработчиков препаратов и инвесторов.

Таким образом, в истории развития генотерапии были периоды подъема и снижения интереса к данному направлению. Внимание к данной проблеме значительно возросло с началом пандемии COVID-19, так как основные вакцины против COVID-19 фактически являются ГТП.

### Системы доставки генотерапевтических препаратов

Одной из основных проблем для всех ГТП является доставка терапевтического гена в клетки/ткани-мишени. Проводились и продолжают исследования использования для доставки генетического материала в клетки/ткани-мишени физических, химических и биологических методов: электропорация, магнитофекция, доставка с использованием неорганических частиц (наночастицы золота, фосфат кальция, диоксид

кремния), липосомы, векторы на основе вирусов и др. На сегодня наиболее распространенными системами для передачи терапевтического гена в клетки-мишени являются вирусные векторы и векторы на основе плазмидной ДНК. Плазмидные ДНК-векторы можно вводить либо в простом солевом растворе (так называемая «голая» ДНК), либо в комплексе с носителем (например, липосома).

Среди изученных методов доставки гена наиболее эффективными оказались ГТП на основе вирусных векторов. Вирусы как средство доставки ГТП подбирают в зависимости от особенностей препаратов. В частности, для лечения онкологических заболеваний используют вирусы, обладающие онколитическими свойствами. Для разработки противоопухолевых препаратов проводятся исследования с использованием таких вирусов, как аденовирус, вирус простого герпеса, реовирус, вирус Коксаки, парвовирус, вирус Ньюкасла, вирус везикулярного стоматита, вирус кори и др. [16]. Данные вирусы используются для доставки в опухолевые клетки генов, инициирующих гибель клетки (суицидальные гены), генов, подавляющих ангиогенез, и/или генов, стимулирующих иммунный ответ против опухоли.

При разработке системы доставки гена на основе вирусного вектора в клетку необходимо учитывать следующие моменты. Терапевтическая ДНК большого размера неспособна самостоятельно проникать внутрь клетки через клеточную мембрану из-за своего размера и отрицательного заряда. Поэтому вирусный вектор должен иметь достаточную возможность включить в свой состав молекулу ДНК необходимого размера, так как если молекула гена имеет больший размер, это может привести к проблемам с ее включением в вирус. Кроме того, вирус должен обладать способностью инфицировать митотические и постмитотические клетки. При этом вирусы – кандидаты в ГТП не должны вызывать развития иммунного или воспалительного ответа, а также не должны быть патогенными. Вирусные векторы могут быть дефектными по репликации, компетентными по репликации или условно репликативными, причем каждый тип требует особого рассмотрения в отношении конструкции и безопасности. Важным аспектом является также возможность производства вирусного вектора в промышленных масштабах [17].

Основные потенциальные риски для безопасности при использовании вирусных векторов связаны с иммуногенностью вектора, нецелевыми эффектами, развитием воспаления и инсерционным мутагенезом. Появление антител к вирусному вектору может привести к сниже-

нию эффективности препарата, особенно в тех случаях, когда требуется повторное введение того же самого вирусного вектора (бустерная вакцинация, ревакцинация). Кроме того, развитие иммунного ответа может вызвать не только выработку антител к вирусу, но и инициировать развитие воспалительной реакции при введении очень высокой дозы аденовируса [18].

Риск инсерционного мутагенеза – встраивания гена в район гена-супрессора опухолевого роста или активации онкогена актуален для векторов, которые интегрируются в нежелательные участки генома, например векторы на основе ретровирусов. Для преодоления данного недостатка можно использовать векторы, которые не интегрируются в геном клетки-хозяина, или самоинактивирующиеся векторы, которые не содержат собственного промотора, а используют промотор самой клетки [19].

При производстве ГТП на основе вирусных векторов используют клетки почки эмбриона человека (HEK293) или клетки ретинобластомы человека (PER.C6), которые содержат участки раннего генома вируса, управляющие репликацией и упаковкой гена [20]. Для получения реплицирующих онколитических вирусов используют клеточные линии HeLa и A549.

Для разработки ГТП с целью *ex vivo* применения наиболее подходящими являются векторы на основе ретровирусов. Исследования различных вирусных векторов для получения препаратов для применения *in vivo* показали, что наиболее эффективными и безопасными являются ГТП на основе аденовирусных и аденоассоциированных вирусных векторов.

#### **Аденовирусный вектор**

Первым разработанным и одобренным для клинических исследований является ГТП на основе аденовирусного вектора. Возникновение названия аденовируса (AV) связано с тем, что впервые данный вирус был выделен из культуры клеток аденоидов человека в 1953 г. Существует семь видов аденовирусов человека (от А до G) и 57 серотипов. Подразделение на серотипы связано с различными способами заражения. Геном AV содержит ранние (*E1*, *E2a*, *E2b*, *E3* и *E4*), поздние (*L1*, *L2*, *L3*, *L4* и *L5*) и промежуточные гены (*IVA2* и *IX*). Кроме того, его геном несет некодирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR), последовательности упаковки и вирусные РНК [21]. Процессы репликации кодируют ранние гены *E1* и *E4*. Препараты первого поколения на основе AV векторов были с частичной делецией *E1* и *E4* генов. Они не реплицируются

и не обладают онкогенностью, но могут содержать терапевтический ген размером не более 8000 п.н., слабо экспрессируют вирусные белки и вызывают активный иммунный ответ при введении. Для устранения данных недостатков в препаратах следующего поколения на основе AV векторов дополнительно удаляли *E2a*, *E2b*, *E4* и *E3* гены, что не устраняло до конца слабую экспрессию вирусных белков и быструю потерю экспрессии терапевтического гена и, кроме того, значительно усложнило производство препарата [22]. Это привело к временной потере интереса к использованию AV векторов для разработки ГТП. В препаратах третьего поколения на основе AV вектора использовались так называемые «выпотрошенные» векторы, в которых отсутствуют все гены вируса кроме ITR. Это в первую очередь позволило вмещать терапевтические гены размером до 37000 п.н. и значительно повысило экспрессию трансгена. При этом препараты на основе данной модификации обладают значительно меньшей иммуногенностью, чем векторы первого и второго поколений [23].

Аденовирусы обладают сильным тропизмом к эпителиальным клеткам за счет связывания с Коксаки-аденовирусным рецептором (Coxsackie adenovirus receptor, CAR). При этом AV вектор не встраивается в геном клетки-хозяина, что снимает опасения по поводу активации онкогенов клетки. С другой стороны, при делении клеток это не позволяет передавать следующим поколениям клеток информацию, заложенную в терапевтическом гене. Еще одна важная особенность аденовируса связана с тем, что среди всех вирусных векторов он способен включать терапевтические гены большого размера [24]. Данные особенности AV сделали их одними из самых предпочтительных вариантов для доставки терапевтических генов в клетки.

Основным недостатком AV векторов является высокая иммуногенность AV. В обычных условиях при попадании в организм человека AV дикого типа белки капсида активируют иммунокомпетентные клетки, которые, в свою очередь, начинают секретировать цитокины и факторы хемотаксиса, привлекающие в очаг нейтрофилы, макрофаги и NK. При этом запускается иммунная реакция с выработкой через несколько суток специфических антител к AV. В том случае если AV вектор в клетке-хозяине экспрессирует белки AV, то это инициирует иммунные клеточные ответы, приводящие к гибели клеток, в которые проник векторный вирус.

Высокая иммуногенность аденовируса выявлена в отношении различных серотипов AV. Так, по разным данным 50–80% населения имеют

антитела к 5 серотипу AV, причем преобладают нейтрализующие антитела, снижающие эффективность лечения [25, 26]. Изучение частоты встречаемости антител к 36 серотипу AV показало, что их уровень коррелирует с избыточным ожирением [27].

Для снижения иммуногенности AV векторов используются различные подходы. В частности, были предприняты попытки химической модификации AV для снижения иммунного и воспалительного ответа на векторный вирус. Определенные успехи были достигнуты при создании аденовирусных химерных векторов. Так, для химерного AV вектора на основе 5 и 3 серотипов AV человека показана высокая аффинность связывания с CD46, экспрессируемым на многих солидных опухолях [28]. Химерный AV вектор на основе серотипов 5 и 35 вызывал эффективную трансдукцию клеток гладких мышц сосудов при лечении колоректального рака и ишемических ран [29]. Продемонстрирован потенциал использования химерного AV вектора на основе 5 и 11 серотипов для терапии глиомы и химерного AV вектора 3 и 11 серотипов для терапии рака толстой кишки [30].

Кроме создания химерных AV векторов активно проводятся исследования по созданию препаратов на основе вирусов, которые не встречаются у человека или встречаются редко, такие как AV человека 26 серотипа, AV собаки 2 серотипа и AV шимпанзе 3 серотипа. Одним из первых препаратов на основе данных AV был химерный AV вектор на основе AV человека 26 серотипа и AV шимпанзе 5 серотипа, которые использовались для получения вакцины против лихорадки Эбола [31].

Кроме иммуногенности существует еще потенциальный риск инициации вирусом воспалительной реакции. В частности, при разработке ГТП, содержащего ген, кодирующий орнитин-транскарбамилазу, на этапе клинического исследования было показано отсутствие трансдукции терапевтического гена, секвестрация AV вектора в печени и развитие тяжелой гепатотоксичности с летальным исходом [32].

Несмотря на значительные успехи, требуются дальнейшие усилия для модификации вирусных векторов. В частности проблемой при производстве препаратов на основе AV векторов может быть присутствие значительного количества «пустых» AV частиц, не содержащих терапевтический ген. При создании вакцины против лихорадки Эбола было установлено, что эффективность вакцины зависит от количества AV частиц, при этом оптимальным является содержание  $10^{10}$ – $10^{12}$  AV частиц в дозе препарата [33]. Од-

нако получение препарата в производственных условиях с высоким титром вируса и удаление пустых векторов остается проблемой.

Таким образом, активные исследования применения AV векторов для доставки терапевтического гена позволили выявить их слабые места и определить подходы для устранения недостатков. При этом во многих лабораториях были созданы библиотеки AV векторов, что позволило создать новые векторы для лечения рака простаты и поджелудочной железы, а также глиомы [34]. В частности, в исследовании Y. Yamamoto с соавт. был получен AV вектор, несущий ген лиганда, вызывающего сильный онколитический эффект при раке поджелудочной железы [35].

Показана эффективность использования AV вектора для встраивания гена фактора IX свертывания крови в хромосому собак с гемофилией B, у которых в течение 960 суток наблюдался синтез фактора IX [36]. Успешной оказалась также разработка AV вектора для долговременной экспрессии гена, кодирующего аланин-глиоксилат аминотрансферазу (AGT) у пациентов с первичной гипероксалурией 1 типа, редким заболеванием почек, вызывающим рецидивы почечнокаменной болезни [37]. Достигнуты успехи в создании ГТП на основе AV для лечения опухолевых заболеваний, причем разработанные препараты не только инициировали гибель опухолевых клеток, но и воздействовали на опухолевое микроокружение (рост сосудов, иммунный ответ и др.) [38].

#### **Аденоассоциированный вирусный вектор**

В качестве средства доставки терапевтического гена в клетки-мишени также широко используется аденоассоциированный вирус (AAV). Впервые AAV был выделен как контаминант аденовируса обезьяны, что послужило основой для его названия. В дальнейшем было установлено, что он встречается у человека, животных и птиц. AAV содержит одноцепочечную ДНК длиной 4700 нуклеотидов и не содержит оболочки. Геном AAV содержит промоторы p5, p19 и p40 и три гена, фланкированные двумя ITR: ген *rep* (кодирует белки, обеспечивающие репликацию вируса), ген *cap* (кодирует капсидные белки) и ген *aar* (кодирует белок, отвечающий за сборку). Ген *rep* кодирует четыре белка (Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40), которые необходимы для репликации и упаковки вирусного генома. Ген *cap* отвечает за синтез капсидных белков (VP1, VP2, VP3), которые образуют внешнюю оболочку капсида [39]. Ген *aar* кодирует белок (AAP), активирующий сборку в альтернативной рамке считывая, перекрывающей ген *cap*. Для инфи-

цирования клеток и репликации AAV требуются вспомогательные белки, факторы или вирусы, такие как AV, вирус простого герпеса, вирус псевдобешенства, цитомегаловирус, УФ-излучение или гидроксимочевина [40]. Для продукции AAV обычно используют культуру клеток HEK293, в которых экспрессируются гены, необходимые для сборки AAV (гены белков E1a, E1b, E2a и E4orf6) [41].

При трансдукции клеток AAV вектором вирусный геном, содержащий терапевтический ген, проникает в ядро клетки и интегрируется, но также вирусный геном может доставляться в эпизомальной форме. Так, имеются данные, что терапевтический ген фактора IX свертывания крови сохранялся у одного пациента в течение 10 лет клинического исследования [42]. Для эффективной трансдукции AAV вектора на поверхности клеток-мишеней должны экспрессироваться определенные рецепторы, к которым AAV проявляет высокую тропность: гепарансульфат протеогликан, интегрин  $\alpha v\beta 5$  и  $\alpha 5\beta 1$ , рецептор фактора роста фибробластов 1 типа, рецептор фактора роста тромбоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, рецептор эпидермального фактора роста, рецептор ламинина и фрагменты сиаловой кислоты. Известно, что разные AAV серотипы обладают разным тропизмом к тканям организма. Так, из 13 существующих серотипов AAV не все способны к трансдукции в клетку. В частности, для серотипа AAV1 установлена высокая способность трансдукции в мышцы, нейроны, сердце и пигментный эпителий сетчатки. Серотип AAV2 может инфицировать многие типы опухолевых клеток (нейроны, почки, пигментный эпителий и фоторецепторные клетки сетчатки). Причем AAV2 является единственным серотипом, при использовании которого возможна трансдукция и доставка терапевтического гена в почки. Векторы на основе серотипов AAV4 и AAV5 могут трансдуцировать пигментный эпителий сетчатки. Векторы на основе серотипа AAV6 обладают высоким тропизмом к тканям сердца и эпителиальным клеткам дыхательных путей, а AAV7 – к клеткам печени [43]. Препарат на основе AAV8 вектора использовался для доставки гена фактора IX в клетки печени при лечении гемофилии. Продемонстрирована успешная трансдукция AAV8 вектором клеток лимфомы, однако при использовании данной конструкции возможно повреждение клеток поджелудочной железы [44].

Для повышения эффективности AAV векторов были разработаны химерные AAV. Например, химерный вектор, содержащий геном AAV2 и капсидные белки AAV5, за счет высокой



тропности последних к нейронам более эффективно трансдуцировал нейрональные клетки, чем родительский AAV2. Кроме того, были созданы химерные AAV, включающие геном одного серотипа и капсидные белки нескольких других серотипов. В частности, химерный вектор AAV-DJ, содержащий капсидные белки восьми различных серотипов AAV, продемонстрировал более высокую эффективность трансдукции *in vitro* по сравнению с серотипом дикого типа и высокую тропность к широкому спектру тканей *in vivo*, а его модификация, серотип AAV-DJ8, проявил повышенную тропность к тканям мозга [45].

При этом одна из проблем применения AAV векторов обусловлена наличием специфических к AAV антител и клеток памяти. Более 50% взрослого населения имеют нейтрализующие антитела к AAV, а в Северной Америке антитела, специфичные к AAV, встречаются у 80% населения [46, 47]. Наиболее высокий уровень иммуногенности выявлен в отношении AAV2, тогда как иммуногенность других серотипов менее выражена. Иммуные реакции против серотипа AAV2, которые развиваются в организме, могут привести к повреждению тканей организма [48]. В частности, при лечении ГТП на основе AAV2 вектора для доставки фактора IX свертывания крови у пациента наблюдалось развитие трансамината (феномен повышения активности печеночных ферментов без проявлений гепатотоксичности) с дальнейшим формированием Т-клеточного иммунного ответа против AAV2 и гепатоцитов [49].

Наличие специфических антител к AAV является одной из причин не только низкой эффективности ГТП, но и причиной тяжелых побочных реакций [50]. Учитывая иммуногенность AAV вектора, повторное системное введение такого препарата осложнено риском развития иммунного ответа. Значительно меньше риск иммуногенности при введении ГТП в органы, которые слабо контактируют с иммунокомпетентными клетками, например в глаз.

Для ускользания от иммунного распознавания были разработаны мозаичные или гибридные векторы [51]. Например, применение гибридов, состоящих из комбинации AAV серотипов 2 и 5 (вектор AAV2.5), приводит к снижению распознавания системой иммунитета и позволяет ускользать от действия нейтрализующих антител [52]. Учитывая, что индукция иммунного ответа в первую очередь связана с наличием в вирусе цитозин-фосфат-гуанин динуклеотидного мотива (CpG), для снижения иммунного ответа были разработаны AAV векторы без CpG [53]. Созданные для внутривенной доставки терапев-

тических генов векторы AAV6.2, AAV2i8, AAVrh10 и AAVrh32.33 обладают сниженной способностью к секвестрации в печени и индукции ответа Т-клеток, что было отмечено при клиническом наблюдении [54].

Потенциальный риск применения AAV вектора также может быть связан со способностью встраивания AAV в геном клетки и с развитием генотоксичности, что было продемонстрировано в исследованиях на модельных животных [55]. Обычно ГТП на основе векторных вирусов конструируют таким образом, чтобы они не встраивались в зародышевые клетки. Тем не менее один случай обнаружения AAV2 вектора в сперматозоидах зарегистрирован при системном введении ГТП [56].

Одной из проблем является сложность масштабирования производства ГТП на основе AAV векторов. При масштабном производстве ГТП на основе AAV векторов достаточно большое количество капсидов в препарате остаются «пустыми» (без терапевтического гена) [57]. В литературе дискутируется вопрос о необходимости удаления «пустых» капсидов, так как их удаление основано на методе ультрацентрифугирования, что очень сложно осуществить при масштабном производстве препарата при соблюдении принципов надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) [58].

Таким образом, несмотря на ряд достоинств AAV векторов, к которым можно отнести непатогенность AAV, безопасность и широкое применение в качестве платформы для доставки генов, основными факторами, которые ограничивают их применение в генотерапии, являются следующие: возможность доставки небольшого по размерам терапевтического гена (не более 5000 п.н.), иммуногенность капсидных белков, сложность производства препарата в больших объемах, необходимость введения высоких доз для достижения эффективности, широкий тропизм и потенциальный риск развития активного иммунного ответа против AAV [59].

## Генотерапевтические препараты

Несмотря на множество доклинических и клинических исследований к настоящему времени на рынке находится небольшое количество ГТП. Первый препарат для генотерапии, Gendicine (Shenzhen Sibiono GeneTech Co., Ltd, Китай), разработанный на основе рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген белка p53 человека дикого типа (rAd-p53), был одобрен в Китае в 2003 г. Препарат предназначен для лечения плоскоклеточного рака головы и шеи, раз-

витие которого в 50% случаев сопровождается мутацией гена *p53*. Введение препарата вызывало торможение клеточного цикла и апоптоз в опухолевых клетках. Препарат применялся путем интратуморальных инъекций и/или внутримышечных инфузий один раз в неделю в течение 8 недель. Препарат Gendicine продемонстрировал высокую эффективность и безопасность при лечении более чем 30000 онкологических пациентов [60]. Недостатком данного препарата является необходимость непосредственного введения в опухоль, и, следовательно, он не эффективен в отношении тех видов опухолей, в которые не может быть введен, или против метастатических клеток.

Компанией Introgen Therapeutics разработан аналогичный препарат Advexin на основе AV вектора, несущего ген *p53*. В отличие от Gendicine препарат Advexin вводится не интратуморально, что позволяет расширить спектр показаний. Однако при регистрации данного препарата по ускоренной процедуре FDA в 2008 г. заявка на его регистрацию не была одобрена из-за опасений по поводу безопасности AV векторов после того, как в 1999 г. умер участник клинических исследований [61].

Компанией Ark Therapeutics (Великобритания) была подана заявка в EMA на регистрацию препарата Sergero на основе аденовирусного вектора с геном, кодирующим тимидинкиназу, для лечения глиомы. Однако эксперты EMA пришли к заключению, что разработчиками были нечетко продемонстрированы эффективность и безопасность препарата.

Препарат Oncorine (Shanghai Sunway Biotech Co., LTD, Китай) на основе онколитического вируса с дефектом репликации, несущий ген *p53*, предназначен для лечения рака головы и шеи, был одобрен в Китае в 2005 г. Препарат Oncorine в сочетании с химиотерапией продемонстрировал высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности.

Препарат Rixin-G (Epeius Biotechnologies Corporation, США) создан на основе химерного ретровирусного вектора, несущего ген цитотоксического циклина G1, экспрессия которого приводит к блокированию активности циклина G1 и ингибированию пролиферации опухолевых клеток. Препарат был одобрен в Республике Филиппины в 2005 г., а позже – в США в качестве орфанного препарата для лечения опухоли поджелудочной железы. Препарат вводится внутривенно. В ретровирусные частицы встроены мотив, полученный из фактора свертывания крови фон Виллебранда, который избирательно связывается с коллагеновыми белками микроо-

кружения опухоли и с рецепторами опухолевых клеток, что способствует проникновению в клетки и последующей интеграции генетического материала в хромосомы активно делящихся опухолевых клеток [62]. Клинические исследования препарата подтвердили его безопасность, противоопухолевую активность и возможность увеличения средней продолжительности жизни пациентов.

Первым зарегистрированным в EMA препаратом на основе AAV1 вектора является Glybera (UniQure, Нидерланды). Препарат предназначен для лечения редкого моногенного синдрома семейной хиломикронемии (Lipoprotein lipase deficiency, LPLD). Заболевание связано с мутацией гена, кодирующего продукцию липопротеинлипазы (lipoprotein lipase, LPL) и передается по аутосомно-рецессивному типу. Внутримышечное введение Glybera в ткань скелетной мускулатуры приводит к трансдукции AAV1 вектором клеток мышц, и в этих клетках начинается синтез LPL. Введенный в мышечную ткань ген LPL в составе AAV1 вектора не встраивается в хромосомы, а остается в эписомальной форме. Так как мышечные клетки делятся очень медленно, то терапевтический ген сохраняется в течение многих лет, что было показано при исследовании на приматах [63]. Для предотвращения развития иммунного ответа на вирус введение препарата осуществляют на фоне иммуносупрессивной терапии. Учитывая высокую стоимость препарата и очень малое количество лиц, у которых встречается LPLD, руководство Голландской компании UniQure не стало в 2017 г. продлевать лицензию на продажу препарата.

Препарат Luxturna (Spark Therapeutics, Inc.) на основе AAV2 вектора одобрен FDA в 2017 г. в качестве орфанного для лечения хориодермии, которая является редким наследственным рецессивным дегенеративным заболеванием сетчатки, приводящим к дегенерации хориокапилляров пигментного эпителия сетчатки и фоторецепторов глаза. Заболевание связано с дефектом гена, кодирующего геранилтрансферазу. Препарат содержит в составе вирусного вектора дикий тип гена *RPE65* и вводится больным пациентам с дистрофией сетчатки (при подтвержденной двуаллельной мутации гена *RPE65*) для восстановления зрения в течение нескольких месяцев. Лечение препаратом вызывает заметное улучшение способности пациентов видеть при тусклом свете [64].

Препарат Imlygic (разработка компании BioVex Inc., приобретенная Amgen) зарегистрирован FDA как препарат с показанием для лечения меланомы. Препарат разработан

на основе вектора вируса простого герпеса, который является онколитическим вирусом. Введение препарата и инфицирование опухолевых клеток вирусным вектором приводит к тому, что вирус начинает реплицироваться в опухолевых клетках и синтезировать гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), что приводит к лизису опухолевых клеток и высвобождению опухолевых антигенов, на которые затем при стимуляции GM-CSF формируется иммунный ответ. Препарат вводят *in situ* в кожные, подкожные и узловые пораженные участки [65]. Курс лечения Imlygic включает серию инъекций в очаги меланомы в течение 6 месяцев для полного излечения. Препарат также зарегистрирован в ЕС и Австралии для лечения меланомы.

Российским ПАО «Институт стволовых клеток человека» был разработан и зарегистрирован в 2012 г. препарат Неоваскулген, который является первым отечественным невирусным препаратом для генотерапии<sup>9</sup>. Препарат разработан для лечения заболеваний с атеросклеротическим поражением периферических артерий и представляет собой плазмидную ДНК, несущую ген VEGF, клонированный под промотором CMV. Терапевтический ген стимулирует ангиогенез и кровоснабжение в пораженном участке. Препарат вводится внутримышечно по возможности максимально близко к участку ишемии. Клинические пострегистрационные исследования свидетельствуют об эффективности препарата, которую оценивали по значительному увеличению расстояния при движении пациентов без возникновения боли.

### Клинические исследования генотерапевтических препаратов

Первое в мире клиническое исследование препарата для генотерапии было проведено в 1989 г. В настоящее время в мире зарегистрировано более 3700 клинических исследований ГТП в 204 странах мира. Более половины клинических исследований проводятся с использованием ГТП на основе AV и ретровирусов. Следует отметить, что преобладают разработки препаратов для онколитической терапии и вакцинации.

Более чем 200 клинических исследований проводится с препаратами на основе AAV векторов. Учитывая, что многие векторы AAV (осо-

бенно AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9) способны проникать через гематоэнцефалический барьер, на основе данных векторов проводятся клинические исследования препаратов для лечения лизосомных болезней накопления, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, эпилепсии, спинальной мышечной атрофии, болезни Баттена и др. [66]. Кроме того, разработаны и проходят клинические исследования препараты на основе AAV векторов для лечения тяжелой гемофилии В, которые содержат ген фактора IX [67].

### Регуляторные требования к генотерапевтическим препаратам

#### Нормативные требования FDA

Один из первых законов, регламентирующий безопасность биологических препаратов, был разработан в США в 1902 г. Причиной появления закона явилась трагедия с заражением столбняком и гибелью детей после введения противодифтерийной сыворотки в 1901 г. [68].

В составе FDA в 1972 г. был организован Центр оценки и исследования биологических препаратов (Center for Biologics Evaluation and Research, CBER). В 1980-х годах, когда начались исследования по переносу генов в стволовые клетки, возникла необходимость в создании подразделения, специализирующегося по данной проблеме. Это привело к образованию нового подразделения CBER, которое получило название Управление клеточной, тканевой и генотерапии (Office of Cellular, Tissue and Gene Therapies, OCTGT), которое занимается регулированием вопросов, в первую очередь связанных с безопасностью проведения клинических исследований ГТП<sup>10</sup>.

С появлением первых продуктов на основе генно-инженерных технологий (лекарственные средства, продукты питания и др.), в первую очередь на основе рекомбинантной ДНК, к вопросам, связанным с генно-модифицированными продуктами, значительно возрос интерес общественности. В связи с этим в США в 1974 г. при Национальном институте здравоохранения (National Institutes of Health, NIH) был образован Консультативный комитет по рекомбинантной ДНК (Recombinant DNA Advisory Committee, RAC). В RAC было разработано Руководство по исследованиям молекул, полученных с использованием рекомбинантной ДНК<sup>11</sup>, которое регламентирует систему надзора за исследова-

<sup>9</sup> <https://neovasculgen.info/dose-preparata-neovaskulgen>

<sup>10</sup> [www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/ucm232821.htm](http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/ucm232821.htm)

<sup>11</sup> NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules (NIH guidelines). NIH; 2019. <https://osp.od.nih.gov/biotechnology/nih-guidelines/>

ниями по переносу генов. Несмотря на то что RAC контролирует исследования, финансирование которых одобрено NIH, в США все частные компании, работающие в данном направлении, соблюдают рекомендации RAC и NIH. Кроме того, RAC проводит открытые заседания для анализа критических проблем безопасности при их появлении.

В последнее время Американское общество генной и клеточной терапии (American Society of Gene and Cell Therapy, ASGCT) начало активную дискуссию по вопросу о необходимости одобрения программ клинических исследований в RAC<sup>12</sup>. Свою позицию ASGCT обосновывает тем, что RAC был образован с целью предотвращения возможности попадания терапевтического гена в клетки зародышевой линии или мутации вирусных векторов. Однако по данным ASGCT в течение 30 лет применения генотерапии не было случаев развития данных осложнений.

#### **Нормативные требования ЕМА**

В Европейском союзе (ЕС) в составе регуляторного органа ЕМА вопросами, связанными с лекарственными препаратами, в том числе и генотерапевтическими, занимается Комитет по лекарственным средствам для человека (Committee for Proprietary Medicinal Products, CHMP). При появлении ГТП и других современных лекарственных средств в Европейском союзе была разработана особая нормативно-правовая база – Регламент № 1394/2007<sup>13</sup> по лекарственным препаратам для передовой терапии (advanced therapy medicinal products, ATMPs). По мнению специалистов ЕМА лекарственные препараты для передовой терапии представляют собой основной класс инновационных методов лечения, существенно отличающихся от классических терапевтических средств. Разработанный Регламент № 1394/2007 вместе с Директивой 2009/120 ЕС<sup>14</sup> устанавливают основные требования к лекарственным препаратам для передовой терапии и их регистрации.

Данный документ регламентирует четыре различных типа продуктов, в том числе и лекарственные препараты для генотерапии (Gene therapy medicinal products, GTMPs).

Регламентом № 1394/2007 было инициировано создание Комитета по передовой терапии (Committee for Advanced Therapies, CAT). В состав CAT входят 22 эксперта, значительная часть которых с опытом работы в области генотерапии. Основная функция CAT заключена в рассмотрении заявок на регистрацию. При этом решение CAT не является решающим, оно должно быть одобрено в том числе и CHMP.

Первый документ, регламентирующий вопросы качества, доклинических и клинических исследований ГТП, был подготовлен ЕМА в 2001 г.<sup>15</sup> Следует отметить, что данный документ распространяется не только на ГТП, но и на генетически модифицированные клетки и ДНК-вакцины для профилактики инфекционных заболеваний. Со временем появилась новая информация, были разработаны новые технологии и методы исследования, был накоплен опыт регистрации и применения ГТП, что потребовало пересмотра данного документа. В связи с этим ЕМА пересмотрело руководство и утвердило в 2018 г. новую редакцию Руководства ЕМА по качеству, доклиническим и клиническим аспектам лекарственных средств генотерапии<sup>16</sup>. В пересмотренном руководстве были учтены правовые и технические требования, изложенные в Регламенте № 1394/2007 по лекарственным препаратам для передовой терапии и Директиве 2009/120/ЕС. Учитывая, что в последней Директиве дано новое определение лекарственных препаратов для генотерапии, пересмотренное Руководство ЕМА не распространяется на продукты на основе генетически модифицированных клеток и ДНК-вакцин (для профилактики инфекционных заболеваний).

Раздел, посвященный вопросам оценки качества и производства ГТП в пересмотренном Руководстве ЕМА, переработан таким образом,

<sup>12</sup> <https://www.kurzweilai.net/gene-therapists-ask-to-be-released-from-the-rac>

<sup>13</sup> Regulation (EC) No 1394/2007 of the European parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1394&from=EN>

<sup>14</sup> Commission directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0120>

<sup>15</sup> Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products (CPMP/BWP/3088/99). EMA; 2001. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-quality-preclinical-clinical-aspects-gene-transfer-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-quality-preclinical-clinical-aspects-gene-transfer-medicinal-products_en.pdf)

<sup>16</sup> Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf)

чтобы охарактеризовать как можно более широкий спектр векторов доставки (новые вирусные векторы, невирусные и бактериальные векторы)<sup>17</sup>. В разделах Руководства, посвященных доклиническим исследованиям, представлена информация об исследованиях по обоснованию пути и схемы введения препарата. Кроме того, представлены подробные рекомендации по подбору моделей *in vitro* и *in vivo*, которые позволяют оценить эффекты, вызываемые непосредственно ГТП.

В части Руководства ЕМА, посвященной клиническим исследованиям ГТП с учетом особенности данной группы препаратов, включены рекомендации по изучению не только самого ГТП, но и трансгенного продукта<sup>18</sup>. В новой редакции Руководства были обновлены рекомендации по фармакологическим исследованиям, например: изменение требований к исследованиям биораспределения и выведения вектора, введение специальных требований к исследованиям фармакокинетики трансгенного продукта. Также были переработаны и расширены требования к исследованиям эффективности и безопасности, подробно описаны вопросы, касающиеся конечных точек клинической безопасности. Кроме того, в разделе клинических исследований представлены требования к фармаконадзору<sup>19</sup>.

#### **Опыт регистрации генотерапевтических препаратов в ЕМА**

В работе М. Carvalho с соавт. проанализированы особенности регистрации ГТП в ЕМА в настоящее время [69]. Так, в период с 2008 по 2017 г. ЕМА рассмотрело 7 заявок на регистрацию ГТП, из них только 3 препарата были зарегистрированы. Среди поданных на регистрацию преобладали препараты для лечения опухолевых заболеваний (5 препаратов). По данным авторов практически ко всем препаратам (кроме одного) были замечания экспертов ЕМА по параметрам качества, которые касались характеристики производственного процесса и спецификации [69]. При этом в досье двух (Advexin и CLG) из четырех отклоненных заявок на регистрацию не были в полной мере охарактеризованы показатели репликации вирусов. Присутствие в сериях препаратов, которые вводятся человеку, реплицирующихся аденовирусов нежелательно, поскольку они могут бесконтрольно реплицироваться у пациента, что создает потенциальные риски для безопасности [69].

Проблемы оценки эффективности ГТП в клинических исследованиях связаны не только с особенностью данных препаратов, но и с другими факторами. Во-первых, очень часто ГТП разрабатываются как орфанные препараты. Обычно орфанные препараты регистрируются «на условиях», т. е. на основании оценки на ограниченной выборке и им выдается временная лицензия до представления материалов в полном объеме. При этом очень сложно бывает набрать выборку до регистрации, чтобы с высокой степенью статистической достоверности продемонстрировать эффективность препарата. В частности, в ЕМА (в период с 2007 по 2017 г.) из 7 заявок на регистрацию в 5 были заявки на регистрацию орфанных препаратов. Во-вторых, в литературе уже достаточно долго дискутируется вопрос о конечных точках эффективности противоопухолевых препаратов. В своих требованиях по оценке противоопухолевых лекарственных средств ЕМА рекомендует в качестве приемлемых конечных точек эффективности следующие критерии: уровень излечения, общая выживаемость, выживаемость без прогрессирования или выживаемость без заболевания [70]. Среди 7 заявок на регистрацию в ЕМА (в период с 2007 по 2017 г.) к представленным материалам 5 препаратов у экспертов ЕМА были замечания, касающиеся достоверности результатов оценки эффективности. Причем по данным экспертов ЕМА один препарат (CLG) оказывал более негативное влияние на выживаемость больных с опухолью по сравнению со стандартным лечением.

Как свидетельствует опыт разработки, основная проблема безопасности связана с иммуногенностью ГТП. В частности, при регистрации в ЕМА препарата Glybera результаты его клинического исследования показали, что введение препарата активно инициирует гуморальный и клеточный ответ на препарат. Для решения данной проблемы разработчиками было предложено введение препарата на фоне трехмесячной иммуносупрессивной терапии. При регистрации ГТП необходимо оценить иммуногенность не только к самому препарату, но и к белку, за экспрессию которого отвечает терапевтический ген в препарате. В частности, при регистрации препарата Strimvelis в ЕМА для лечения заболевания, вызванного дефицитом аденозиндезаминазы, разработчики констатировали, что препарат обладает низкой иммуногенностью, но не представили результаты оценки уровня антител против аденозиндезами-

<sup>17</sup> Там же.

<sup>18</sup> Там же.

<sup>19</sup> Там же.

назы, что послужило поводом для представления замечаний со стороны экспертов EMA [69].

## Заключение

В настоящее время зарегистрировано незначительное количество ГТП (FDA зарегистрировано 13 ГТП, EMA – 16 ГТП), что обусловлено и особенностью данной группы препаратов, и проблемами, общими для регистрации всех лекарственных средств. Одна из основных проблем ГТП связана с использованием вирусных векторов для доставки терапевтического гена в клетку-мишень. Современные методы редактирования генома позволяют получать вирусные векторы с необходимыми свойствами, однако для каждого конкретного ГТП требуются особые условия модификации вирусного вектора.

Учитывая, что ГТП являются препаратами последнего поколения, совершенствование нормативно-правовой базы для оценки качества, эффективности и безопасности данной группы препаратов, а также их регистрации яв-

ляется необходимым. Опыт FDA и EMA показал, что для оценки безопасности и эффективности ГТП недостаточно процедурных мероприятий, которые используются при регистрации традиционных препаратов. В структурах FDA и EMA образованы подкомитеты с рекомендательными функциями, которые профессионально занимаются экспертной оценкой генотерапевтических препаратов.

В Российской Федерации в настоящее время активно ведутся разработки новых ГТП. Зарегистрирован и успешно применяется один отечественный ГТП для лечения нарушений периферического кровоснабжения.

Представленный обзор свидетельствует о необходимости создания отечественной нормативной базы, а также нормативных рекомендаций в рамках государств – членов Евразийского экономического союза для разработки, оценки качества, безопасности и эффективности ГТП, а также регистрации этой группы препаратов.

## Литература/References

1. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Медуницын НВ, Крючков НА. Механизмы развития нежелательного иммунного ответа при применении биотехнологических препаратов. *Иммунология*. 2017;38(5):271–83. [Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Medunitsyn NV, Kryuchkov NA. Mechanisms of development of the undesirable immune response at use of biotechnological medicines. *Immunologiya = Immunology*. 2017;38(5):271–83 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-5-271-283>
2. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttua S. History of gene therapy. *Gene*. 2013;525:162–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
3. Cartier-Lacave N, Ali R, Ylä-Herttua S, Kato K, Baetschi B, Lovell-Badge R, et al. Debate on germline gene editing. *Hum Gene Ther Methods*. 2016;27(4):135–42. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.28999.deb>
4. McCarthy M. Scientists call for moratorium on clinical use of human germline editing. *BMJ*. 2015;351:h6603. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6603>
5. Morrow T. Novartis's Kymriah: harnessing immune system comes with worry about reining in costs. *Manag Care*. 2017;26(10):28–30.
6. Yano K, Watanabe N, Tsuyuki K, Ikawa T, Kasanuki H, Yamato M. Regulatory approval for autologous human cells and tissue products in the United States, the European Union, and Japan. *Regen Ther*. 2015;1:45–56. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2014.10.001>
7. Deev R, Plaksa I, Bozo I, Mzhavanadze N, Suchkov I, Chervyakov Y, et al. Results of 5-year follow-up study in patients with peripheral artery disease treated with PL-VEGF165 for intermittent claudication. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2018;12(9):237–46. <https://doi.org/10.1177/1753944718786926>
8. Wade N. UCLA gene therapy racked by friendly fire. *Science*. 1980;210(4469):509–11. <https://doi.org/10.1126/science.6932738>
9. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, 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;323:570–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>
10. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Zhang F, Adams S, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase – deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med*. 2011;3(97):97ra80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002716>
11. Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther*. 2000;7:2–8. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3501084>
12. Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13714–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.240335297>
13. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80:148–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016>
14. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al.

- LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302(5644):415–9. <https://doi.org/10.1126/science.1088547>
15. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LM02 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther*. 2006;13(1):15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.09.010>
  16. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol*. 2017;3(6):841–9. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>
  17. Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release*. 2012;161(2):377–88. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.008>
  18. Chattopadhyay S, Sen GC. dsRNA-activation of TLR3 and RLR signaling: gene induction-dependent and independent effects. *J Interferon Cytokine Res*. 2014;34(6):427–36. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0034>
  19. Herrero MJ, Sabater L, Guenechea G, Sendra L, Montilla AI, Abargues R, et al. DNA delivery to 'ex vivo' human liver segments. *Gene Ther*. 2012;19:504–12. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.144>
  20. Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013;13(6):421–33. <https://doi.org/10.2174/1566523213666131125095046>
  21. Majhen D, Ambriović-Ristov A. Adenoviral vectors—how to use them in cancer gene therapy? *Virus Res*. 2006;119(2):121–33. <https://doi.org/10.1016/j.virus-res.2006.02.001>
  22. Wen S, Schneider DB, Driscoll RM, Vassalli G, Sassani AB, Dichek DA. Second-generation adenoviral vectors do not prevent rapid loss of transgene expression and vector DNA from the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1452–8. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.6.1452>
  23. Sakhuja K, Reddy PS, Ganesh S, Cantaniag F, Pattison S, Limbach P, et al. Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2003;14(3):243–54. <https://doi.org/10.1089/10430340360535797>
  24. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther*. 2005;12:S18–27. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302612>
  25. Fausther-Bovendo H, Kobinger GP. Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(10):2875–84. <https://doi.org/10.4161/hv.29594>
  26. Wang X, Xing M, Zhang C, Yang Y, Chi Y, Tang X, et al. Neutralizing antibody responses to enterovirus and adenovirus in healthy adults in China. *Emerg Microbes Infect*. 2014;3(5):e30. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.30>
  27. Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB, Augustus AS. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29:281–6. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802830>
  28. Trinh HV, Lesage G, Chennampampil V, Vollenweider B, Burckhardt CJ, Schauer S, et al. Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J Virol*. 2012;86(2):1623–37. <https://doi.org/10.1128/jvi.06181-11>
  29. Cho YS, Do MH, Kwon SY, Moon C, Kim K, Lee K, et al. Efficacy of CD46-targeting chimeric Ad5/35 adenoviral gene therapy for colorectal cancers. *Oncotarget*. 2016;7:38210–23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9427>
  30. Li X, Mao Q, Wang D, Xia H. A novel Ad5/11 chimeric oncolytic adenovirus for improved glioma therapy. *Int J Oncol*. 2012;41:2159–65. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1674>
  31. Tapia MD, Sow SO, Lyke KE, Haidara FC, Diallo F, Doumbia M, et al. Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(1):31–42. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00362-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00362-x)
  32. Irons EE, Flatt JW, Doronin K, Fox TL, Acchione M, Stewart PL, Shayakhmetov DM. Coagulation factor binding orientation and dimerization may influence infectivity of adenovirus-coagulation factor complexes. *J Virol*. 2013;87(17):9610–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.01070-13>
  33. Ledgerwood JE, DeZure AD, Stanley DA, Coates EE, Novik L, Enama ME, et al. Chimpanzee adenovirus vector Ebola vaccine. *N Engl J Med*. 2017;376:928–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1410863>
  34. Miura Y, Yamasaki S, Davydova J, Brown E, Aoki K, Vickers S, Yamamoto M. Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by high-throughput screening of adenovirus-formatted library. *Mol Ther*. 2013;21(1):139–48. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.205>
  35. Yamamoto Y, Nagasato M, Rin Y, Henmi M, Ino Y, Yachida S, et al. Strong antitumor efficacy of a pancreatic tumor-targeting oncolytic adenovirus for neuroendocrine tumors. *Cancer Med*. 2017;6(10):2385–97. <https://doi.org/10.1002/cam4.1185>
  36. Hausl MA, Zhang W, Mütter N, Rauschhuber C, Franck HG, Merricks EP, et al. Hyperactive sleeping beauty transposase enables persistent phenotypic correction in mice and a canine model for hemophilia B. *Mol Ther*. 2010;18(11):1896–906. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.169>
  37. Castello R, Borzone R, D'Aria S, Annunziata P, Piccolo P, Brunetti-Pierrri N. Helper-dependent adenoviral vectors for liver-directed gene therapy of primary hyperoxaluria type 1. *Gene Ther*. 2016;23:129–34. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.107>
  38. Rosewell Shaw A, Suzuki M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. *Curr Opin*

- Virology*. 2016;21:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.virology.2016.06.009>
39. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):427–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355>
40. Carter BJ. Adeno-associated virus and the development of adenoassociated virus vectors: a historical perspective. *Mol Ther*. 2004;10:981–9. <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2004.09.011>
41. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol*. 2012;507:229–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386509-0.00012-0>
42. Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, Hawk SM, Flake AW, Mingozi F, High KA. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood*. 2012;119(13):3038–41. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-382317>
43. Strobel B, Duechs MJ, Schmid R, Stierstorfer BE, Bucher H, Quast K, et al. Modeling pulmonary disease pathways using recombinant adeno-associated virus 6.2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(3):291–302. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0338MA>
44. Nathwani AC, Nienhuis AW, Davidoff AM. Our journey to successful gene therapy for hemophilia B. *Hum Gene Ther*. 2014;25(11):923–6. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.2540>
45. Smith LJ, Ul-Hasan T, Carvaines SK, Van Vliet K, Yang E, Wong KK Jr, et al. Gene transfer properties and structural modeling of human stemcell-derived AAV. *Mol Ther*. 2014;22(9):1625–34. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.107>
46. Murphy SL, Li H, Zhou S, Schlachterman A, High KA. Prolonged susceptibility to antibody-mediated neutralization for adenoassociated vectors targeted to the liver. *Mol Ther*. 2008;16(1):138–45. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300334>
47. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis*. 2009;199(3):381–90. <https://doi.org/10.1086/595830>
48. Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther*. 2011;11(4):321–30. <https://doi.org/10.2174/156652311796150354>
49. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011;365:2357–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108046>
50. Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Pogoda JM, et al. Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. *Gene Ther*. 2016;23(3):313–9. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.109>
51. Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, et al. In silico reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep*. 2015;12(6):1056–68. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.019>
52. Bowles DE, McPhee SW, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, et al. Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV-vector. *Mol Ther*. 2012;20(2):443–55. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.237>
53. Faust SM, Bell P, Cutler BJ, Ashley SN, Zhu Y, Rabinowitz JE, Wilson JM. CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2994–3001. <https://doi.org/10.1172/jci68205>
54. Mays LE, Vandenberghe LH, Xiao R, Bell P, Nam HJ, Agbandje-McKenna M, Wilson JM. Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins. *J Immunol*. 2009;182(10):6051–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803965>
55. Chandler RJ, Sands MS, Venditti CP. Recombinant adeno-associated viral integration and genotoxicity: insights from animal models. *Hum Gene Ther*. 2017;28(4):314–22. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.009>
56. Brandon EF, Hermsen HP, van Eijkeren JC, Tiesjema B. Effect of administration route on the biodistribution and shedding of replication-deficient AAV2: a qualitative modelling approach. *Curr Gene Ther*. 2010;10(2):91–106. <https://doi.org/10.2174/156652310791111047>
57. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol*. 2012;507:229–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386509-0.00012-0>
58. Wright JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies. *Gene Ther*. 2008;15(11):840–8. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.65>
59. Ertl HCJ, High KA. Impact of AAV-capsid-specific T-cell responses on design and outcome of clinical gene transfer trials with recombinant adenoassociated viral vectors: an evolving controversy. *Hum Gene Ther*. 2017;28(4):328–37. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.172>
60. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The first approved gene therapy product for cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 years in the clinic. *Hum Gene Ther*. 2018;29(2):160–79. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>
61. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol*. 2011;29:121–8. <https://doi.org/10.1038/nbt.1769>
62. Kim S, Federman N, Gordon EM, Hall FL, Chawla SP. Rexin-G®, a tumor-targeted retrovector for malignant peripheral nerve sheath tumor: a case report. *Mol Clin Oncol*. 2017;6:861–5. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1231>
63. Wang D, Zhong L, Nahid MA, Gao G. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(3):345–64. <https://doi.org/10.1517/1742524.7.2014.871258>



64. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet*. 2014;383(9923):1129–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62117-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62117-0)
65. Breitbach CJ, Lichty BD, Bell JC. Oncolytic viruses: therapeutics with an identity crisis. *EBioMedicine*. 2016;9:31–6. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.046>
66. Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S, Cartier N. Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS diseases. *Hum Gene Ther*. 2016;27(7):478–96. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.087>
67. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosaes C, Chowdhury P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371:1994–2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407309>
68. Roossinck MJ, Bazán ER. Symbiosis: viruses as intimate partners. *Annu Rev Virol*. 2017;4:123–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042323>
69. Carvalho M, Martins AP, Sepodes B. Hurdles in gene therapy regulatory approval: a retrospective analysis of European Marketing Authorization Applications. *Drug Discovery Today*. 2019;24(3):823–8. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.12.007>
70. Dabisch I, Dethling J, Dintsios CM, Drechsler M, Kalanovic D, Kaskel P, et al. Patient relevant endpoints in oncology: current issues in the context of early benefit assessment in Germany. *Health Econ. Rev*. 2014;4(1):2. <https://doi.org/10.1186/2191-1991-4-2>

**Вклад авторов.** А.А. Солдатов – разработка дизайна статьи, обработка и анализ литературных данных, написание текста рукописи; Ж.И. Авдеева – критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; Д.В. Горенков – анализ и обобщение литературных данных, доработка текста рукописи; Л.М. Хантимирова – анализ литературных данных, редактирование текста рукописи; С.Г. Гусева – сбор материала для статьи, доработка текста рукописи; В.А. Меркулов – критическое обсуждение текста рукописи.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** В.А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Authors' contributions.** A.A. Soldatov – elaboration of the study design, review and analysis of literature, writing of the text; Zh.I. Avdeeva – revision and editing of the text; D.V. Gorenkov – analysis and consolidation of literature data, follow-on revision of the text; L.M. Khantimirova – analysis of literature, editing of the text; S.G. Guseva – analysis of literature, follow-on revision of the text; V.A. Merkulov – review of the text.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** V.A. Merkulov is the Editor-in-chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

## Об авторах / Authors

**Солдатов Александр Алексеевич**, д-р мед. наук.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>  
[Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

**Авдеева Жанна Ильдаровна**, д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>  
[Avdeeva@expmed.ru](mailto:Avdeeva@expmed.ru)

**Горенков Дмитрий Витальевич**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>  
[gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru)

**Хантимирова Лейсан Маратовна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>  
[Khantimirova@expmed.ru](mailto:Khantimirova@expmed.ru)

**Гусева Светлана Геннадиевна**. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7341-101X>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>  
[merkulov@expmed.ru](mailto:merkulov@expmed.ru)

**Aleksandr A. Soldatov**, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>  
[Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

**Zhanna I. Avdeeva**, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>  
[Avdeeva@expmed.ru](mailto:Avdeeva@expmed.ru)

**Dmitry V. Gorenkov**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>  
[gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru)

**Leysan M. Khantimirova**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>  
[Khantimirova@expmed.ru](mailto:Khantimirova@expmed.ru)

**Svetlana G. Guseva**. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7341-101X>

**Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>  
[merkulov@expmed.ru](mailto:merkulov@expmed.ru)

Поступила 05.08.2021

После доработки 03.02.2022

Принята к публикации 11.03.2022

Received 5 August 2021

Revised 3 February 2022

Accepted 11 March 2022