

УДК 615.03:616-035.1:616-006:602.641
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-1-329>

Обзорная статья | Review



Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности

О.В. Астапова[✉], А.А. Берчатова

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

✉ Контактное лицо: Астапова Оксана Вадимовна astapova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Генотерапевтические лекарственные препараты (ГТЛП) в настоящее время активно разрабатываются в различных странах, в том числе в Российской Федерации. Однако их применение сопряжено с особыми проблемами безопасности, специфичными для этого класса препаратов.

Цель работы: определить основные требования к доклинической оценке безопасности и особые риски применения ГТЛП, установить критерии экспертной оценки и выявить возможности оптимизации программы доклинических исследований ГТЛП на основе опыта экспертизы документов и регистрации препаратов этого класса в Российской Федерации и за рубежом.

В Российской Федерации, государствах — членах Евразийского экономического союза, Европейском союзе и США создана и продолжает совершенствоваться нормативная база, регулирующая обращение ГТЛП. Свойства ГТЛП обуславливают уникальные проблемы безопасности, такие как инсерционный мутагенез, нерегулируемая экспрессия трансгена, долговременная персистенция и нецелевое распространение, вертикальный перенос генов, а также риск для окружающей среды. В связи с этим в рамках комплексной программы доклинического изучения безопасности ГТЛП может потребоваться проведение дополнительных специальных исследований наряду со стандартными. В обзоре рассмотрены основные подходы к дизайну исследований и оценке полученных результатов изучения безопасности неклеточных ГТЛП. Определены проблемные моменты дизайна исследований и возможности его модификации, условия и ограничения экстраполяции доклинических данных и прогнозируемости профиля клинической безопасности препаратов. Ввиду того что нормативная база, регулирующая доклинические исследования ГТЛП, постоянно обновляется и актуализируется, при разработке программы доклинической оценки безопасности ГТЛП следует учитывать весь накопленный опыт и опираться как на отечественные, так и на зарубежные руководства и рекомендации в этой области.

Ключевые слова: генотерапевтические лекарственные препараты; генная терапия; трансген; вектор; безопасность; доклинические исследования; инсерционный мутагенез; онкогенез; Золгенсма; Лукстурна; lmylgic

Для цитирования: Астапова О.В., Берчатова А.А. Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(1):73–96. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-1-329>

Gene Therapy Medicinal Products: Non-clinical Safety Studies

O.V. Astapova✉, A.A. Berchatova

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

✉ Corresponding author: **Oksana V. Astapova** astapova@expmed.ru

ABSTRACT

Currently, gene therapy medicinal products (GTMPs) are actively developed in many countries, including the Russian Federation. However, the use of GTMPs raises class-specific safety concerns.

The aim of the study was to determine the main requirements for non-clinical safety testing of GTMPs, to identify risks associated with these medicinal products, to establish criteria for expert assessments, and to find optimisation opportunities for GTMP non-clinical safety programmes, using Russian and international experience in the assessment of submissions and the registration of medicinal products of this class.

The Russian Federation, the Eurasian Economic Union, the European Union, and the United States have created regulatory frameworks governing the lifecycle of GTMPs and continue improving these frameworks. The properties of GTMPs may create unique safety issues, such as insertional mutagenesis, unregulated transgene expression, long-term persistence and off-target spread, vertical germline transmission, and environmental risks. To account for these issues, a comprehensive non-clinical safety programme for GTMPs may require additional special studies along with the standard ones. This review focuses on the main approaches to designing non-cellular GTMP safety studies and evaluating the obtained results. The authors identified improvement opportunities for and problematic aspects of study design, as well as conditions for and limitations of non-clinical data extrapolation and clinical safety profile prediction. The continuous improvement and updating of the regulatory frameworks governing non-clinical studies of GTMPs mean that developers of non-clinical safety programmes for GTMPs should use all their experience, as well as relevant national and international guidelines and recommendations.

Key words: gene therapy medicinal product; gene therapy; transgene; vector; safety; non-clinical studies; insertional mutagenesis; oncogenesis; Zolgensma; Luxturna; Imlygic

For citation: Astapova O.V., Berchatova A.A. Gene therapy medicinal products: non-clinical safety studies. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(1):73–96. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-1-329>

Введение

На сегодняшний день идентифицировано более 10000 моногенных нарушений, связанных с заболеваниями человека. Генетическая мутация обычно представляет собой изменение последовательности генетического кода, которое в конечном итоге приводит к экспрессии аномальных белков или других генных продуктов [1].

Под генной терапией (ГТ) понимают группу методов, направленных на модификацию последовательности генов или управление их экспрессией, а также на изменение биологических свойств клеток для их терапевтического или профилактического использования¹. Согласно Федеральному закону Российской

Федерации от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» под ГТ понимают совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний.

Отличие и одновременно преимущество ГТ по сравнению с другими видами терапии заключается в том, что ГТ направлена на устранение причин заболевания, в то время как большинство лекарственных средств предназначены для симптоматического лечения. ГТ в настоящее время развивается как потенциальный терапевтический

¹ Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy Investigational New Drug Applications (INDs). Guidance for industry. 2008-D-0205. FDA; 2020.

метод против широкого спектра заболеваний, включая различные виды рака, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные или метаболические расстройства. Кроме того, ГТ позволяет предотвращать инфекционные заболевания посредством генетической иммунизации [2].

Экспериментальную ГТ, предназначенную для лечения пораженных соматических тканей или органов у пациентов, называют соматической. ГТ, направленная на репродуктивные клетки (сперматозоиды и яйцеклетки) или преимплантационные эмбрионы, называется ГТ зародышевой линии, она способна корректировать мутации, вызывающие заболевания, до вариантов дикого типа на ранних стадиях развития [1, 3].

В зависимости от метода доставки препарата в организм можно выделить два типа ГТ: *ex vivo* и *in vivo*. Первый заключается в индивидуализированном подходе, когда генно-инженерные манипуляции с клетками пациента осуществляются *in vitro*, а затем уже модифицированные клетки попадают обратно в организм. *In vivo* введение гена осуществляется непосредственно в организм пациента. Функциональной единицей (действующим веществом) генотерапевтического лекарственного препарата (ГТЛП) является «последовательность(и) нуклеиновой кислоты или генетически модифицированный(е) микроорганизм(ы), вирус(ы), либо клетки»².

ГТ использует несколько альтернативных стратегий. Одна из них включает доставку синтетической копии нормального гена в клетку-хозяина в дополнение к мутантной эндогенной копии (или копиям) гена. Другая основана на редактировании генома путем индукции повреждений в мутировавших генах с целью их изменения. К основным инструментам редактирования генома относятся РНК-управляемый CRISPR-Cas9, нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN) и подобные активатору транскрипции эффекторные нуклеазы (TALEN) [4]. Все вышеупомянутые технологии основаны на способности генерировать двухцепочечные разрывы (DSB) в последовательности хромосомной ДНК-мишени и инициировать механизмы эндогенной репарации клеток путем негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологически направленной репарации (HDR). С помощью данных методов можно проводить несколько типов геномных изменений, включая точечные мутации, делеции, вставки, инверсии, дупликации и транслокации в определенных локусах генома [4–7].

² Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

Еще одной перспективной стратегией ГТ является эпигенетическое редактирование, направленное на терапевтическую регуляцию экспрессии генов. Этот вид редактирования относится к локус-специфичному нацеливанию эпигенетических ферментов для перезаписи локального эпигенетического ландшафта эндогенного геномного сайта, часто с целью перепрограммирования транскрипции [8]. Эпигенетические модификации представляют собой изменения хроматина, которые не включают изменения в последовательности ДНК. Эти модификации могут включать и выключать гены, диктуя конформацию хроматина либо в транскрипционно активное, либо в молчащее состояние. Эпигенетические метки в основном включают метилирование ДНК и посттранскрипционные модификации гистоновых хвостов. Аберрантные эпигенетические модификации обратимы, что открывает широкие возможности для терапевтического вмешательства [9].

Текущие методы доставки генетического материала реализуются посредством вирусных или невирусных векторов. К вирусным векторам относятся ретровирусы, лентивирусы, аденовирусы (Ad), аденоассоциированный вирус (AAV), поксвирус и вирус простого герпеса (HSV) [10]. Вирусы ввиду своей природы высокоэффективны в трансдукции клеток млекопитающих, что делает их привлекательными для использования в качестве вектора для доставки гена. Вирусный вектор содержит белковый капсид, который определяет тропизм вектора к тканям и распознавание антигена, трансген, который при экспрессии в клетках обеспечивает желаемый терапевтический эффект, и «регуляторную кассету» (энхансер/промотор/вспомогательные элементы), контролирующую постоянную или временную экспрессию трансгена в виде эписомы или хромосомного интегранта. Аспекты дизайна этих трех компонентов различны для каждой платформы вирусного вектора, имеют уникальные особенности и свои сильные и слабые стороны [10].

Невирусный перенос гена можно осуществить с помощью различных физических (генная пушка, электропорация, сонопорация, гидродинамическая инъекция, микроиглы и магнитофекция) или химических (катионные липиды, катионные полимеры, дендримеры, полипептиды и наночастицы различного состава) методов [2]. К невирусным также относятся различные ДНК-векторы (плазмидные, хромосомные

и транспозонные) и бактериальные векторы³. В многочисленных физических методах переноса гена используют физическое воздействие для создания временных пор на клеточных мембранах, что позволяет ДНК проникать в клетки посредством диффузии. В химических методах переноса гена используются природные или синтетические соединения в качестве носителей для доставки экзогенных генетических материалов в клетки-мишени [2, 11].

В настоящее время разработка и изучение ГТЛП является одним из важнейших направлений развития биомедицины, в связи с чем вопросы безопасности ГТ, в первую очередь на доклиническом этапе изучения безопасности, особенно актуальны.

Цель работы — определить основные требования к доклинической оценке безопасности и особые риски применения ГТЛП, установить критерии экспертной оценки и выявить возможности оптимизации программы доклинических исследований ГТЛП на основе опыта экспертизы документов и регистрации препаратов этой группы в Российской Федерации и за рубежом.

Проведен анализ нормативно-правовой и методологической базы доклинических исследований ГТЛП. Различия в терминологии и нормативном регулировании разных видов биологических препаратов требуют от разработчика, чтобы в досье в достаточной мере были охарактеризованы природа и механизм действия препарата, что позволит отнести его к тому или иному типу средства ГТ, обозначить риски и представить доказательства безопасности заявляемого препарата.

В данной статье рассмотрены ГТЛП, содержащие последовательность рекомбинантных нуклеиновых кислот или генетически модифицированный микроорганизм или вирус, однако изложенные принципы доклинических исследований безопасности также применимы к доклиническим исследованиям векторной части ГТЛП, содержащих генетически модифицированные клетки.

Руководящие документы

По данным ресурса Gene Therapy Trials Worldwide⁴, в настоящее время на разных стадиях разработки находятся 3180 ГТЛП. В Российской Федерации также идет активное освоение новой области, свидетельством чего является введение в действие Постановления Правительства

³ Там же.

⁴ <https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT>

Российской Федерации от 22.04.2019 № 479 «Об утверждении Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы». Стремительное увеличение количества новых технологий в сфере ГТ приводит к тому, что нормативные документы претерпевают изменения.

Обращение ГТЛП в Российской Федерации регулируется Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», в котором содержится определение биологических лекарственных препаратов, подклассом которых являются ГТЛП (дополнение введено 01.07.2015 Федеральным законом от 22.12.2014 № 429-ФЗ): «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». Принципы разработки продуктов, содержащих культивированные соматические клетки человека, в том числе с внесенной генетической модификацией, закреплены Федеральным законом Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Таким образом, национальная процедура регистрации предусматривает разделение препаратов на ГТЛП и биомедицинские клеточные продукты. Принципиальные различия государственной регистрации препаратов ГТ в соответствии с Федеральными законами № 61-ФЗ и № 180-ФЗ заключаются в видах и последовательности этапов экспертизы [12]. Однако отечественные руководства не содержат рекомендаций по изучению ГТЛП и не могут служить ориентиром для разработки программы доклинических исследований.

Регулирование обращения ГТЛП в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) осуществляется в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения», в котором ГТЛП определяется как «биологический лекарственный препарат, содержащий активное вещество, содержащее рекомбинантную нуклеиновую кислоту или состоящее из нее, используемую или вводимую человеку с целью регулирования, восстановления, замены, добавления

или удаления генетической последовательности; терапевтический, профилактический или диагностический эффекты которого напрямую обусловлены последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которую он содержит, или с продуктом генетической экспрессии этой последовательности». В соответствии с данным документом ГТЛП подразделяют на препараты, содержащие последовательность рекомбинантных нуклеиновых кислот или генетически модифицированный микроорганизм или вирус, и ГТЛП, содержащие генетически модифицированные клетки.

В Европейском союзе разработка препаратов для передовой терапии – ЛППТ (advanced therapy medicinal products, ATMPs), к которым относят ГТЛП (gene therapy medicinal products, GTMPs), регулируется Директивой 2001/83/ЕС Европейского парламента и Совета от 06.11.2001⁵ и последующим дополнением к ней – руководством по риск-ориентированному подходу⁶ (2013 г.) в соответствии с Регламентом Европейского парламента и Совета Европейского союза 1394/2007 от 13.11.2007 о лекарственных средствах современной терапии и о внесении изменений в Директиву 2001/83/ЕС и Регламент (ЕС) 726/2004 в редакции Директивы 2009/120/ЕС (ЕМА/САТ/СРWР/686637/2011) от 11.02.2013. Определения ГТЛП и требования к доклинической оценке безопасности ГТЛП, приведенные в Решении Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78, подготовлены на основе Директивы 2001/83/ЕС и в целом ей соответствуют. Также для разработчиков ГТЛП ЕМА выпустило пояснительные документы к Директиве 2001/83/ЕС Европейского парламента и Совета от 06.11.2001, содержащие вопросы и ответы по генной терапии⁷ (2009 г.) и передовой терапии⁸ (2019 г.).

Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, ЕМА), регламентирующее разработку ГТЛП в Европейском союзе, также выпустило ряд общих и частных руководств по ГТЛП.

Для разработки ГТЛП, содержащих последовательность рекомбинантных нуклеиновых кислот или генетически модифицированный микроорганизм или вирус, выпущено общее руководство по качеству, доклиническим и клиническим аспектам лекарственных средств для генной терапии⁹ (2018 г.). Данное руководство не применяется к вирусным векторным вакцинам и к лекарственным препаратам, содержащим генетически модифицированные клетки (аллогенные или аутологичные соматические клетки, модифицируемые *ex vivo* или *in vitro* с помощью генотерапевтического вектора перед введением их человеку), однако изложенные в нем принципы применяются к векторам, используемым для модификации таких клеток. В новой версии руководства также имеются указания по разработке и производству более широкого перечня последовательностей нуклеиновых кислот, включая подходы редактирования генов, вирусных и невирусных векторов. Доклиническая разработка ГТЛП в Европейском союзе также регулируются общим руководством ЕМА по качеству, доклиническим и клиническим требованиям к исследуемым препаратам для передовой терапии в клинических исследованиях¹⁰ (2019 г.).

Комитетом по передовой терапии ЕМА разработаны частные руководства по ГТЛП с углубленным анализом разных аспектов безопасности и руководства по оптимизации программы доклинических исследований ГТЛП на разных стадиях (табл. 1).

В США документом, регулирующим доклиническое изучение ГТЛП, является руководство Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) о доклинической оценке исследуемых продуктов клеточной и генной терапии¹¹. В соответствии с этим документом, исследуемые продукты генной терапии входят в группу биологических препаратов и включают помимо вирусных, невирусных и микробных векторов генетически модифицированные *ex vivo* клетки. Используемые в руководстве

⁵ Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза 2001/83/ЕС от 06.11.2001 о Кодексе Сообщества о лекарственных средствах для использования человеком.

⁶ Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to advanced therapy medicinal products. ЕМА/САТ/СРWР/686637/2011. ЕМА; 2013.

⁷ Questions and answers on gene therapy. ЕМА/СНМР/ГТWР/212377/2008. ЕМА; 2009.

⁸ Questions and answers on comparability considerations for advanced therapy medicinal products (ATMP). ЕМА/САТ/499821/2019. ЕМА; 2019.

⁹ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. ЕМА/САТ/80183/2014. ЕМА; 2018.

¹⁰ Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials. Draft. ЕМА/САТ/852602/2018. ЕМА; 2019.

¹¹ Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products. Guidance for industry. FDA-2012-D-1038. FDA; 2013.

Таблица 1. Специальные руководства Европейского агентства по лекарственным средствам**Table 1.** Special guidelines by the European Medicines Agency

Аспекты программы доклинических исследований ГТЛП <i>Aspects of GTMP non-clinical development programmes</i>	Документ <i>Document</i>
Биораспределение <i>Biodistribution</i>	ICH guideline S12 on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products (EMA/CHMP/ICH/318372/2021) General principles to address virus and vector shedding. ICH considerations (EMA/CHMP/ICH/449035/2009)
Перед первым применением у человека <i>Preclinical studies (before the first clinical use)</i>	Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (EMA/CHMP/GTWP/125459/2006, 30 May 2008)
Репродуктивная токсичность <i>Reproductive toxicity</i>	Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors (EMA/273974/2005, 16 November 2006) General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors. ICH considerations (CHMP/ICH/469991/2006)
Риск для окружающей среды <i>Environmental safety</i>	Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products (EMA/CHMP/GTWP/125491/2006, 30 May 2008) General principles to address virus and vector shedding. ICH considerations (EMA/CHMP/ICH/449035/2009)
Модификация продукта разработки <i>Design modification of GTMPs</i>	Reflection paper on design modification of gene therapy medicinal products during development (CAT/GTWP/44236/2009, 14 December 2011)
Рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы <i>Recombinant adeno-associated viral vectors</i>	Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors (EMA/CHMP/GTWP/587488/2007 Rev. 1, 24 June 2010)
Онколитические вирусные векторы <i>Oncolytic viral vectors</i>	Oncolytic viruses (EMA/CHMP/ICH/607698/2008)
Лентивирусные векторы <i>Lentiviral vectors</i>	Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors (CHMP/BWP/2458/03, 26 May 2005)

Примечание. ГТЛП – генотерапевтический лекарственный препарат; ICH – Международный совет по гармонизации.
Note. GTMP, gene therapy medicinal product; ICH, International Council for Harmonisation.

определения по сути соответствуют определениям, используемым в документах Европейского союза и ЕАЭС. В руководстве рассмотрены как общие, так и отдельные рекомендации для разрабатываемых препаратов клеточной терапии, генной терапии, а также для терапевтических вакцин.

Генотерапевтические лекарственные препараты

По данным ресурса¹² компании American Gene Technologies®, в США и странах Европейского союза 80 ГТЛП находятся на разных стадиях разработки, из них более 50 ГТЛП, содержащих последовательность рекомбинантных нуклеиновых кислот или генетически модифицированный микроорганизм или вирус. На мировом фармацевтическом рынке в настоящее время присутствуют ГТЛП, содержащие последовательность рекомбинантных нуклеиновых кислот

или генетически модифицированный микроорганизм или вирус (табл. 2), хотя количество их по-прежнему невелико [13]. Опыт разработки ГТЛП в Российской Федерации ограничивается зарегистрированным препаратом Неоваскулген®. Еще несколько препаратов (Юпикор, Корвиан и др.) находятся на разных стадиях клинических исследований¹³, и доклинические данные по ним в открытых источниках литературы ограничены.

Программа доклинических исследований безопасности ГТЛП включает исследования общетоксического и местнораздражающего действия, репродуктивной токсичности, иммуногенности, фармакологической безопасности, а также учитывает специфические риски этого класса препаратов. К ним относятся отдаленные риски применения ГТЛП: нецелевая интеграция, нежелательные мутации и онкогенный потенциал, передача по зародышевой линии,

¹² <https://www.americangene.com/blog/the-future-of-medicine-the-88-gene-therapies-in-development/>

¹³ <https://cardioweb.ru/eksperimentalnoe-proizvodstvo-mediko-biologicheskikh-preparatov>

Таблица 2. Зарегистрированные и поданные на регистрацию генотерапевтические лекарственные препараты, содержащие последовательность рекомбинантных нуклеиновых кислот или генетически модифицированный микроорганизм или вирус¹⁴

Table 2. Approved and submitted gene therapy medicinal products containing a recombinant nucleic acid sequence or a genetically modified microorganism/virus¹⁴

Торговое наименование (МНН) <i>Trade name (INN)</i>	Страна-разработчик, год регистрации в мире / в Российской Федерации <i>Developer country, year of approval abroad / in Russia</i>	Лекарственная форма <i>Dosage form</i>	Генетическая конструкция в основе препарата <i>Underlying genetic construct</i>	Показания к применению <i>Indications for use</i>
Gendicine® (recombinant p53 gene)	Китай, 2003 / – <i>China, 2003 / –</i>	Раствор для инъекций <i>Solution for injection</i>	rAV5 – вектор, содержащий ген белка p53 под контролем промотора респираторно-синцитиального вируса <i>rAV5 vector containing the p53 gene controlled by an RSV promoter</i>	Злокачественные опухоли головы и шеи <i>Head and neck cancer</i>
Oncorine® (E1B/E3 deficient adenovirus)	Китай, 2005 / – <i>China, 2005 / –</i>	Раствор для инъекций <i>Solution for injection</i>	rAV5 – вектор, содержащий ген белка p53 под контролем CMV промотора <i>rAV5 vector containing the p53 gene controlled by a CMV promoter</i>	Рак головы и шеи; рак носоглотки <i>Head and neck cancer; nasopharyngeal cancer</i>
Rexin-G (mutant cyclin G1 gene)	США, 2005* / – <i>USA, 2005* / –</i>	Раствор для инфузий <i>Solution for infusion</i>	Ретровирусный вектор, содержащий ген человеческого циклина G1 под контролем CMV промотора <i>Retroviral vector containing the human cyclin G1 gene controlled by a CMV promoter</i>	Солидные опухоли <i>Solid tumors</i>
Неоваскулген® (плазмидная ДНК [сверх-скрученная кольцевая двуцепочечная]) <i>Neovasculgen® (plasmid DNA [supercoiled circular double stranded])</i>	Россия, – / 2011 <i>Russia, – / 2011</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения <i>Lyophilisate for solution for intramuscular injection</i>	Плазмидная ДНК, содержащая фактор роста эндотелия сосудов 165 (VEGF165) под контролем промотора CMV <i>Plasmid DNA containing vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) controlled by a CMV promoter</i>	Ишемия нижних конечностей атеросклеротического генеза <i>Atherosclerotic chronic limb-threatening ischaemia</i>
Glybera® (alipogene tiparvovec)	Нидерланды, 2012** / – <i>Netherlands, 2012** / –</i>	Раствор для инъекций <i>Solution for injection</i>	rAAV1 – вектор, содержащий ген человеческой липопротеинлипазы варианта LPL ^{S447X} под контролем CMV промотора и посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка, а также производные от AAV2 инвертированные терминальные повторы <i>rAAV1 vector containing the human lipoprotein lipase gene variant LPL^{S447X} controlled by a CMV promoter and a woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; and AAV2-derived inverted terminal repeats</i>	Семейный дефицит липопротеинлипазы, сопряженный с тяжелыми или множественными приступами панкреатита <i>Familial lipoprotein lipase deficiency associated with severe or multiple pancreatitis attacks</i>

¹⁴ <https://www.genetherapynet.com/gendicine.html>
<https://clinicaltrials.gov/>
<https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Торговое наименование (МНН) <i>Trade name (INN)</i>	Страна-разработчик, год регистрации в мире / в Российской Федерации <i>Developer country, year of approval abroad / in Russia</i>	Лекарственная форма <i>Dosage form</i>	Генетическая конструкция в основе препарата <i>Underlying genetic construct</i>	Показания к применению <i>Indications for use</i>
Collategene® (bepermingene perplasmid)	Япония, 2019 / – <i>Japan, 2019 / –</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular injection</i>	Плазмида, содержащая фактор роста гепатоцитов (HGF) <i>Plasmid containing hepatocyte growth factor (HGF)</i>	Критическая ишемия нижних конечностей <i>Chronic limb-threatening ischemia</i>
Imlygic® (talimogene laherparepvec)	США, 2015 / – <i>USA, 2015 / –</i>	Раствор для инъекций <i>Solution for injection</i>	Вектор rHSV-1, полученный путем функциональной делеции двух генов (ICP34.5 и ICP47) и вставки кодирующей последовательности человеческого GM-CSF <i>rHSV-1 vector derived by functional deletion of 2 genes (ICP34.5 and ICP47) and insertion of a coding sequence for human GM-CSF</i>	Неоперабельная поверхностная, подкожная и узловая меланома <i>Unresectable superficial, subcutaneous, and nodular melanoma</i>
Лукстурна® (воритеген непарвовек) <i>Luxturna® (voretigene neparvovec-rzyl)</i>	США, 2017 / 2022 <i>USA, 2017 / 2022</i>	Концентрат и растворитель для приготовления раствора для субретинального введения <i>Concentrate and solvent for solution for subretinal injection</i>	rAAV2-вектор, содержащий ген белка пигментного эпителия сетчатки глаза человека (hRPE65) <i>rAAV2-vector containing the human retinal pigment epithelium protein (hRPE65) gene</i>	Дистрофия сетчатки с биаллельной мутацией в гене RPE65 <i>Biallelic RPE65 mutation-associated retinal dystrophy</i>
Золгенсма® (онасемногена-бепарвовек) <i>Zolgensma® (onasemnogene abeparvovec)</i>	США, 2019 / 2021 <i>USA, 2019 / 2021</i>	Раствор для инфузий <i>Solution for infusion</i>	AAV9-вектор, содержащий человеческий ген выживания моторных нейронов под контролем CMV энхансера / куриного β-актин-гибридного промотора <i>AAV9-vector containing the human survival motor neuron gene controlled by a hybrid CMV enhancer/chicken-β-actin- promoter</i>	Спинальная мышечная атрофия с биаллельной мутацией в гене SMN1 <i>Spinal muscular atrophy with bi-allelic mutations in the survival motor neuron 1 (SMN1) gene</i>
Upstaza® (eladocagene exuparvovec)	Ирландия, 2022 / – <i>Republic of Ireland, 2022 / –</i>	Раствор для инфузий <i>Solution for infusion</i>	rAAV2-вектор, содержащий ген человеческого белка декарбоксилазы ароматических L-аминокислот <i>rAAV2 vector containing the human aromatic L-amino acid decarboxylase gene</i>	Дефицит декарбоксилазы ароматических L-аминокислот <i>Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency</i>
Advexin® (contusugene ladenovec) <i>Advexin® (contusugene ladenovec)</i>	– / –*** – / –***	Суспензия для инъекций <i>Suspension for injection</i>	Ad5-вектор, содержащий функциональную копию человеческого гена p53 под контролем CMV промотора (Ad5CMV-p53) <i>Ad5 vector containing a functional copy of the human p53 gene (Ad5CMV-p53) controlled by a CMV promoter</i>	Онкологические заболевания на фоне синдрома Ли-Фраумени <i>Li-Fraumeni syndrome-associated cancers</i>

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Торговое наименование (МНН) <i>Trade name (INN)</i>	Страна-разработчик, год регистрации в мире / в Российской Федерации <i>Developer country, year of approval abroad / in Russia</i>	Лекарственная форма <i>Dosage form</i>	Генетическая конструкция в основе препарата <i>Underlying genetic construct</i>	Показания к применению <i>Indications for use</i>
Cerepro® (sitimagene ceradenovex)	- / -*** - / -***	Концентрат для приготовления раствора для инъекций <i>Concentrate for solution for injection</i>	Ad5-вектор с делецией E1 и частичной делецией E3, содержащий ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (<i>HSV-tk</i>) <i>Ad5 vector with E1 and partial E3 deletions, containing the transgene herpes simplex virus thymidine kinase gene (HSV-tk)</i>	Глиомы <i>Gliomas</i>

Примечание. МНН – международное непатентованное наименование; CMV – цитомегаловирус; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; HSV – вирус простого герпеса; rAAV – рекомбинантный аденоассоциированный вирус; Ad – аденовирус.

* Препарат зарегистрирован на Филиппинах.

** По экономическим соображениям регистрация препарата не продлена.

*** Результаты программы разработки препаратов Advexin® и Cerepro® были поданы в регуляторные органы, но препараты не были зарегистрированы из-за недостаточной доклинической/клинической эффективности и/или безопасности.

Note. INN, international non-proprietary name; CMV, cytomegalovirus; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HSV, herpes simplex virus; rAAV, recombinant adeno-associated virus; Ad, adenovirus; RSV, respiratory syncytial virus.

* Rixin-G was registered in the Philippines.

** The marketing authorisation was not renewed because of economic reasons.

*** The results of Advexin® and Cerepro® development programmes were submitted to the regulatory authorities, but the medicinal products were not registered because of insufficient non-clinical/clinical efficacy and/or safety.

экологический риск / опасность для окружающей среды. Учитывая природу ГТЛП, регуляторные органы ЕАЭС, США и ЕС предлагают применять подход, основанный на анализе рисков, для определения объема необходимых сведений и требований к доклиническому изучению [14].

Оптимизация программы доклинической разработки ГТЛП. Доклинические исследования безопасности ГТЛП допускается объединять с исследованиями биораспределения (распределение, персистенция¹⁵ и клиренс)¹⁶. Исследование общей токсичности препарата Cerepro®, например, было объединено с исследованием специфической активности и с исследованием биораспределения препарата, что также является допустимым¹⁷. При таком подходе модель заболевания должна быть высокоспециализированной и валидированной, а объединенные исследования специфической активности и биораспределения проведены с соблюдением

принципов Надлежащей лабораторной практики (GLP). Такое исследование возможно, если оно позволит четко идентифицировать токсическое действие ГТЛП и проявления заболевания, что также дает возможность оценить безопасность препарата на фоне заболевания. Примером может служить препарат Advexin®, разработчиком которого было рекомендовано изучить конструкцию на модельных системах с дефицитом гена *p53*, что соответствовало ситуации у пациентов с синдромом Ли-Фраумени и могло позволить интерпретировать обнаруженные у животных истощение лимфоцитов и некроз отдельных клеток¹⁸.

Выбор исследуемых тканей. При разработке препарата Золгенсма® гистологические исследования были ограничены либо вовлеченными в патологию заболеваниями органами, либо органами, предположительно подвергающимися высокой трансдукции на основе известного тропизма переносчика. Почки не входили

¹⁵ Персистенция ГТЛП – долгосрочное обнаружение векторных последовательностей или продукта трансгена после введения препарата.

¹⁶ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

¹⁷ Cerepro. Withdrawal assessment report for EMEA/203243/2008. EMA; 2007.

Cerepro. Withdrawal assessment report. EMEA/H/C/001103. EMA; 2011.

¹⁸ Advexin. Withdrawal assessment report. EMEA/692328/2008. EMA; 2008.

в список анализируемых у животных органов, однако тропизм вирусного вектора не ограничивался выбранными органами, что было подтверждено результатами отчетов о вскрытии двух пациентов, умерших в период проведения клинического исследования: почки были определены в качестве органов-мишеней, в них была обнаружена векторная ДНК и экспрессия трансгена¹⁹. В связи с этим в исследовании биораспределения рекомендуется анализировать набор органов и тканей / биологических жидкостей, включающий головной и спинной мозг (шейный, грудной и поясничный отделы), печень, почки, легкие, сердце, селезенку, надпочечники, половые железы, ткани места введения и кровь, который может быть уменьшен только при отсутствии системного воздействия ГТЛП, а также, по усмотрению разработчика, он может быть расширен²⁰. Набор анализируемых тканей для исследования общей токсичности должен соответствовать руководству по изучению токсичности повторных доз²¹, он включает больше тканей, чем приведенный в руководстве по изучению биораспределения. При использовании разных видов животных в исследованиях специфической активности и токсичности рекомендуется изучить биораспределение ГТЛП у всех использованных видов, чтобы иметь представление о видоспецифических различиях, влиянии заболевания, а также для правильной экстраполяции данных на человека. Токсические эффекты, обнаруженные в токсикологических исследованиях, должны быть интерпретированы как в отношении целой генотерапевтической конструкции (то есть к ГТЛП), так и в отношении продуктов экспрессии.

Продолжительность исследований общей токсичности. Для многих ГТЛП предполагается однократное терапевтическое применение с последующей длительной многолетней экспрессией трансгена, что является их существенным преимуществом перед существующей заместительной терапией с многократным применением. Продолжительность исследований

общей токсичности таких препаратов, а именно периода от введения препарата до запланированной эвтаназии животных, отражает ожидаемую продолжительность экспрессии трансгена у человека, а также включает период восстановления. Таким образом, для ГТЛП, предназначенного для однократного введения в клинических условиях, допустимо проведение токсикологического исследования с однократным введением, но продленным периодом наблюдения. Данные исследования с однократным введением не являются, по сути, исследованием острой токсичности. Они предусматривают те же конечные точки, что и исследования токсичности при повторном введении, такие как результаты патоморфологических, гематологических и биохимических исследований, а также продолжительность и обратимость токсических эффектов²². Полученные в таких исследованиях результаты будут достаточны как для получения разрешения на проведение клинического исследования с первым применением препарата у человека, так и для последующей регистрации препарата.

Продолжительность исследования токсического действия должна соответствовать рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека (ICH)²³, однако может быть скорректирована с учетом продолжительности экспрессии трансгена²⁴ или видоспецифических особенностей. Исследования специфической активности дают информацию о продолжительности и величине экспрессии трансгена, а исследования биораспределения – о фармакокинетике препарата у экспериментального вида животного (персистенции вектора, а также о клиренсе и мобилизации²⁵). Продолжительность исследования биораспределения определяется промежутком времени до полного исчезновения обнаруживаемого сигнала или до достижения долгосрочного плато положительного сигнала (в англоязычных источниках – long-term plateau)²⁶. Следует помнить, что сигнал учитывается как в целевых, так

¹⁹ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

²⁰ ICH harmonised guideline S12 on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products. EMA/CHMP/ICH/318372/2021. EMA; 2021.

²¹ Guideline on repeated dose toxicity. CPMP/SWP/1042/99 Rev1 Corr. EMA; 2010.

²² Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

²³ ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. EMA/CPMP/ICH/286/1995. EMA; 2009.

²⁴ Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

²⁵ Мобилизация – способность вируса / вирусной последовательности выходить из латентного состояния и ее реактивация вследствие непреднамеренной репликации после комплементации.

²⁶ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

и в нецелевых органах, а продолжительность обнаружения долгосрочного сигнала является предметом научного рассмотрения. Если персистенция вектора, экспрессия трансгена и/или его продукта сохраняются в течение большего периода времени, чем указано в руководстве по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов²⁷ и рекомендациях ICH²⁸, продолжительность периода наблюдения в токсикологическом исследовании при однократном или многократном введении должна как минимум отражать продолжительность экспрессии (может быть больше, чем для стандартных токсикологических исследований других биофармацевтических продуктов) и зависит также от степени и места экспрессии и/или ожидаемых дополнительных рисков²⁹.

Вторым наиболее важным и дискуссионным моментом являются сроки оценки конечных точек и связанное с этим количество экспериментальных животных в группах. В токсикологические исследования рекомендуется включать промежуточные группы животных для оценки показателей токсичности на пиковых значениях биораспределения³⁰. К примеру, для AAV-вектора это изменения, связанные с начальным пиком экспрессии трансгена (через 4 недели) и стационарным воздействием трансгена (через 13 недель), которые требуют проведения эвтаназии животных. Также требуется мониторинг острых эффектов взаимодействия вирусного вектора с тест-системой, который можно осуществить посредством оценки клинического состояния животных и прижизненных клинических и лабораторных данных [15]. При ограниченном объеме данных об используемом виде животных для исследований ГТЛП данного типа следует включать в исследование также фоновую контрольную группу. Группы контроля и фоновой группы достаточно только в том случае, если нет опасений относительно широкого распространения ГТЛП в популяции. В таком случае целесообразно

включение дополнительных групп животных, получающих препарат внутривенно³¹.

Путь и режим дозирования. Дизайн исследований биораспределения и токсикологии нового ГТЛП должен отражать условия клинического применения. Допускается использовать в экспериментах путь введения, обеспечивающий большее распределение препарата у животных, чем при клиническом применении. Например, в доклинических исследованиях препарата Advexin® использован внутривенный путь введения, тогда как в клинике его вводят интратуморально, а при подкожном введении продемонстрировано ограниченное распределение³². В исследованиях биораспределения препарата Glybera®, наоборот, большее количество препарата было обнаружено в семенниках и придатках яичек при внутримышечном введении по сравнению с внутривенным³³. Из чего следует, что, хотя внутривенный путь введения, как правило, рассматривается как создающий наихудший сценарий, в исследованиях биораспределения это должно быть подтверждено или опровергнуто.

Режим введения ГТЛП в доклинических исследованиях должен быть максимально приближен к условиям клинического применения. Существенным недостатком программы доклинических исследований препарата Advexin®, в частности, было несоответствие терапевтического режима дозирования (2 раза в неделю циклами по 28 сут, 6 циклов), результатов изучения персистенции векторной ДНК у животных (12 месяцев) и режима дозирования препарата в токсикологических исследованиях (2 введения с периодом наблюдения 15 сут)³⁴. С другой стороны, следует предусмотреть исследования токсичности повторных доз, если ожидается долгосрочная персистенция векторной ДНК и при этом кинетика вектора у экспериментального животного не соответствует таковой у человека или если планируется многократное введение ГТЛП пациентам³⁵.

²⁷ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

²⁸ ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. EMA/CPMP/ICH/286/1995. EMA; 2009.

²⁹ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

³⁰ Там же.

³¹ Рекомендации по организации производства, оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований генотерапевтических лекарственных препаратов. М.: Лаборатория знаний; 2018.

³² Advexin. Withdrawal assessment report. EMEA/692328/2008. EMA; 2008.

³³ Glybera. Assessment report EMA/882900/2011. EMA; 2012.

³⁴ Advexin. Withdrawal assessment report. EMEA/692328/2008. EMA; 2008.

³⁵ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

Группы контроля. Интерпретация результатов изучения биораспределения и общей токсичности ГТЛП на основе вирусного вектора часто основана на анализе актуальной научной литературы по полученным ранее доклиническим/клиническим данным о подобном вирусном векторе, и довольно редко требуется использование в исследованиях в качестве группы контроля вектора без трансгена или содержащего нефункциональный трансген. Для ГТЛП, содержащих невирусные векторы, наоборот, целесообразно проводить исследования биораспределения и безопасности с включением в эксперимент группы животных, получающих данный вектор без трансгена, учитывая, как правило, небольшое количество имеющихся данных литературы по безопасности таких конструкций³⁶.

Изучаемые дозы. Дозы препарата для доклинических исследований должны быть скорректированы с учетом характеристик использованной животной модели, в то же время обеспечивая определение широты терапевтического действия препарата³⁷. Особенностью ГТЛП является применение препарата в начальной дозе, соответствующей минимальной эффективной дозе уже при первом применении у людей. Этот подход основан на принципах этики и связан с выработкой нейтрализующих антител, которые препятствуют повторному введению ГТЛП. Применение ГТЛП в минимальной эффективной дозе допустимо с учетом медицинской потребности, дефицита разрешенных способов лечения некоторых заболеваний и узкого временного окна возможностей применения ГТЛП. Изучаемые дозы должны выявить клинически значимые токсические эффекты и все потенциальные органы-мишени. Например, в доклиническом исследовании на поросятах и нечеловекообразных приматах, где была достигнута сверхфизиологическая экспрессия человеческого *SMN* трансгена, после внутривенного введения серотипов нейротропного AAV наблюдались нарушения проприоцепции и атаксия, что было связано с высокой трансдукцией спинномозговых ганглиев и последующей токсичностью [16]. Результаты метаанализа 33 доклинических исследований, охватывающих

256 нечеловекообразных приматов, также показали, что у большинства животных, которым вводили векторы AAV внутривенно или через спинномозговую жидкость, наблюдались патологии спинномозговых ганглиев, причем было показано, что доза значительно влияла на тяжесть клинических проявлений патологии [17]. Эти эффекты могли быть упущены в исследованиях на нечеловекообразных приматах с внутривенным введением препарата Золгенсма® в связи с его применением в низкой дозе, однако дополнительное исследование с интратекальным введением (которое приводит к локальному увеличению концентрации) препарата продемонстрировало развитие воспалительных и нейродегенеративных процессов без влияния на функции нервной системы. Имеет принципиальное значение, что разработчик расценил данную находку как значимую и предусмотрел мониторинг нейротоксических эффектов при проведении клинических исследований с внутривенным введением препарата³⁸. Данные этих и других исследований демонстрируют, что, несмотря на накопленный объем информации, дальнейшая оценка соответствующих путей введения и доз ГТЛП, выбора капсида и дизайна генома вектора с целью достижения тканевой или клеточной специфичности все еще необходима даже для разрешенных к применению лекарственных средств [10].

Лабораторные тест-системы. Анализ векторной ДНК и продукта трансгена (мРНК или белка) имеет критическое значение для оценки эффективности и безопасности разрабатываемого ГТЛП. Используемые методы анализа нуклеотидных последовательностей должны быть высокочувствительными, специфичными и валидированными. Приоритетными методами считаются количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (qPCR) для определения ДНК и ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) – для РНК³⁹. При достаточном обосновании могут быть использованы и другие методы. Например, разработчиком препарата Glybera® после тщательной оценки было принято решение использовать метод nrLAM-PCR (non-restrictive linear-amplification mediated PCR) в сочетании

³⁶ Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

³⁷ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

³⁸ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

³⁹ ICH harmonised S12 guideline on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products. EMA/CHMP/ICH/318372/2021. EMA; 2021.

с секвенированием⁴⁰. Разработчик Cerepro® анализировал мПНК HSV-tk методом RT-qPCR только в тканях с наибольшим содержанием копий ДНК препарата⁴¹. Таким образом, при планировании исследований и интерпретации результатов необходимо принимать во внимание чувствительность метода.

Представление полученного в исследовании результата в виде выражения числа копий вектора на 1 мкг геномной ДНК дает информацию о степени трансдукции во все ткани. Помимо вышперечисленного, от разработчика препарата Золгенсма® уполномоченный орган при регистрации препарата запросил данные, которые выражают трансдукцию вектора в виде числа копий на диплоидный набор. Эти данные позволили получить представление о трансдуцируемости тканей на уровне одной клетки и оценить риск клеточного стресса при введении векторных геномов / экспрессии трансгена в большом количестве, а также, в случае препарата Золгенсма®, позволили установить причину выявленной кардиотоксичности препарата⁴².

Данные исследований биораспределения целесообразно анализировать на предмет определения тканевого тропизма вектора, поскольку разные серотипы вируса тропны к разным тканям организма и характеризуются видоспецифическими особенностями, что имеет значение при переносе доклинических данных на человека⁴³. Например, в исследованиях препарата Imlygic® установлено, что сохранился некоторый тропизм вектора к нервной ткани, что являлось нежелательным и неожиданным, поскольку было выполнено удаление гена *ICP34.5* из вирусного генома⁴⁴.

Релевантность. Особое значение имеет релевантность экспериментальной модели. В исследованиях биологических лекарственных препаратов, не относящихся к ГТЛП, обезьяны часто являются единственным релевантным видом животных. Исследования общей токсичности препарата Золгенсма® были проведены

на двух видах животных: мышах линии FVB/п (дикий тип), которые обычно не используются для токсикологических исследований из-за их генетических особенностей, и на яванских макаках (только пилотные исследования без опасности). Это было сделано, чтобы иметь возможность сравнить и достоверно интерпретировать результаты исследования специфической активности и безопасности препарата⁴⁵. Токсикологические исследования препарата Glybera® были проведены только на мышах дикого типа⁴⁶. Использование грызунов дикого типа не противоречит рекомендациям по выбору релевантных видов животных для доклинических исследований ГТЛП, тем более что при проведении исследования токсичности рекомендуется использовать ту же животную модель, что и в исследовании специфической активности⁴⁷. Тем не менее выбор релевантных животных для доклинических исследований разрабатываемого ГТЛП должен быть подробно обоснован разработчиком в материалах регистрационного досье и основываться на сходстве между экспериментальным видом животного и человеком по следующим ключевым критериям: трансдукция, инфекционная способность вектора реплицироваться в тканях, тканевое распределение и экспрессия клеточных рецепторов вектора (селективность, изоляция), активность регуляторных элементов (промоторов, энхансеров и др.), гомологичность и биологический ответ на продукт трансгена, допустимый объем для введения животным, другие особенности фармакокинетики (в частности, метаболизма)⁴⁸.

Использование крупных животных в качестве второго экспериментального вида оправдано их бóльшим биологическим и физиологическим сходством с человеком. Исследование только на крупном виде животных порой сопряжено с малым размером выборки, что отчасти может быть компенсировано увеличением частоты и продолжительности наблюдения.

⁴⁰ Glybera. Assessment report. EMA/882900/2011. EMA; 2012.

⁴¹ Cerepro. Withdrawal assessment report. EMEA/203243/2008. EMA; 2007.

Cerepro. Withdrawal assessment report. EMEA/H/C/001103. EMA; 2011.

⁴² Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

⁴³ Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors. EMEA/CHMP/GTWP/587488/2007 Rev. 1. EMA; 2010.

⁴⁴ Imlygic. Assessment report. EMA/734400/2015/ corr. 1. EMA; 2015.

⁴⁵ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

⁴⁶ Glybera. Assessment report EMA/882900/2011. EMA; 2012.

⁴⁷ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

⁴⁸ Там же.

При невозможности проведения исследований безопасности на здоровом релевантном животном выходом является проведение единого исследования токсичности и специфической активности на животных путем добавления конечных точек безопасности. При отсутствии релевантных видов животных следует рассмотреть использование животных с подавленным иммунитетом или использование суррогатного трансгена животного (гомологичная модель)⁴⁹ вместо человеческого трансгена или использование серотипа вируса, специфичного конкретного вида животных. Например, в исследованиях препарата Imlygic® использовали бестимусных и иммунокомпетентных мышей, а также был создан мышинный суррогатный вектор HSV-1 и мышинный трансген из-за неспособности человеческого GM-CSF связываться с рецептором GM-CSF мыши⁵⁰.

Для ГТЛП на основе вирусных векторов при выборе экспериментальной животной модели целесообразно определять уровни антител к серотипу вектора у животных до начала эксперимента [18]. При этом распространенность антител может различаться у разных видов крупных животных, полученных из разных источников (вивариев), и между разными видами нечеловекообразных приматов. Иммунный статус животного также является одним из важных параметров выбора релевантного вида и, с другой стороны, позволяет получить дополнительную информацию. Так, в исследованиях препарата Imlygic® с использованием мышей с ослабленным иммунитетом было продемонстрировано, что летальная системная вирусная инфекция развивается у 20% животных при дефиците функции Т-лимфоцитов и у 100% животных при дефиците как Т-, так и В-лимфоцитов⁵¹.

Фармакологическая безопасность. Исследования влияния ГТЛП в терапевтических дозах на функционирование жизненно важных систем организма (исследование фармакологической безопасности) допустимо комбинировать с исследованиями общей токсичности и биораспределения (например, персистенции)⁵². Оценку необходимости проведения уточняющих и дополнительных исследований фармакологической безопасности следует выполнять с учетом

данных исследований биораспределения, селективности ГТЛП и полученных доклинических и клинических данных разрабатываемого ГТЛП. Продолжительность исследований фармакологической безопасности может быть скорректирована при отсроченных фармакодинамических эффектах.

Иммунотоксичность. Применение ГТЛП у человека сопряжено с развитием иммунологических реакций. К примеру, AAV вызывают слабый воспалительный ответ и ответ IFN1-типа, однако при системном введении высоких доз может возникать иммунотоксичность [19], как правило, обусловленная развитием Т-клеточного иммунного ответа [20]. По одной из версий иммунотоксичность при интратекальном введении препарата Золгенсма® у обезьян могла быть связана с воспалением и некрозом спинальных ганглиев задних корешков, поэтому одновременное применение иммунодепрессантов у человека снижает риск нейротоксичности⁵³.

Иммуногенность. Обширные исследования в области разработки векторов выявили серьезные проблемы, связанные с высокой распространенностью во всем мире иммунитета против различных серотипов вирусов человека, используемых в качестве платформ для векторов ГТ. Было показано, что циркулирующие антитела значительно ухудшают способность векторов трансдуцировать клетки-мишени и ослаблять результирующие адаптивные иммунные ответы. До сих пор адаптивный иммунитет к капсиду и чужеродному трансгену представляет собой основные факторы снижения эффективности даже несмотря на однократное введение препарата и отсутствие необходимости в повторной дозе [19–22].

Технологии редактирования генома также могут быть сопряжены с риском иммуногенности. В частности, метод редактирования CRISPR/Cas9 заимствован из естественных механизмов адаптивного иммунного ответа у архей и бактерий, в том числе тех, которые с высокой частотой заражают человеческую популяцию [23, 24]. Было продемонстрировано, что белки Cas9 обладают иммуногенностью у животных моделей мышей [25]. Другие исследования [26–28] показывают, что у людей уже существуют гуморальные и клеточно-опосредованные адаптивные

⁴⁹ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

⁵⁰ Imlygic. Assessment report. EMA/734400/2015/ corr. 1. EMA; 2015.

⁵¹ Там же.

⁵² Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

⁵³ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

иммунные ответы на Cas9 и они, в свою очередь, могут влиять на безопасность ГТ на основе CRISPR/Cas9.

Иммуногенность также является одной из возможных проблем при использовании невирусных векторов. Липосомальные составы широко используются в качестве невирусных систем доставки, однако из-за своей катионной природы липосомы неспецифически связываются с белками сыворотки, а также вызывают повреждение клеток наряду с активацией иммунной системы [29, 30]. Сообщалось, что липидные наночастицы вызывали сильный иммунный ответ при достижении паренхимы головного мозга у мышей после внутривенной инъекции [31].

Таким образом, при разработке ГТЛП для многократного применения необходимо провести оценку его иммуногенности (формирования антивекторного иммунного ответа)⁵⁴. Образование антител рекомендуется изучить даже при планируемом однократном клиническом применении, если информация о потенциале иммуногенности не получена из других источников. Иммуногенность трансгенного продукта следует изучать, если данные о качестве указывают на образование aberrantных продуктов или белка с измененной структурой⁵⁵. Помимо того, на этапе доклинических исследований ГТЛП необходимо провести оценку риска развития иммунологических реакций у человека (если условия позволяют, такие конечные точки допустимо включить в исследования общей токсичности на животных, например возникновение иммунотоксичности, полиорганное воспаление, отложение иммунных комплексов во внутренних органах, цитокиновый шторм и др.). Особое внимание необходимо уделить риску перекрестной реактивности и фоновых аутоиммунных реакций⁵⁶. Важно помнить, что целевой популяцией ГТЛП зачастую являются дети раннего возраста с несформированной иммунной системой. В связи с этим при проведении доклинических исследований токсичности с использованием неполовозрелых животных может возникнуть ситуация, когда у животных не образуются антитела, в то время как образование антител

является ожидаемым. Так, введение препарата Золгенсма® неполовозрелым мышам не сопровождалось образованием антител к трансгену, у обезьян же, напротив, образование антител к трансгену было зарегистрировано⁵⁷.

Местнораздражающее действие. Исследования местнораздражающего действия препаратов Glybera® показали увеличение частоты и тяжести воспалительной инфильтрации и миодегенерации в месте введения препаратов. Дополнительно определяли состав клеточного инфильтрата на предмет наличия цитотоксических Т-клеток⁵⁸.

Модификации процесса производства. Различные партии препарата Glybera®, а именно полученные с использованием плазмиды и полученные с использованием бакуловируса, согласно отчету, сравнивали в промежуточных (связующих) доклинических исследованиях биораспределения и безопасности⁵⁹. Любая модификация последовательности нуклеиновой кислоты ГТЛП потенциально способна повлиять на безопасность конечного продукта и требует дополнительной оценки безопасности и/или промежуточных/связующих экспериментальных данных⁶⁰.

Дополнительные исследования, связанные с отдаленными рисками

Специфические свойства ГТЛП могут создавать проблемы безопасности, такие как инсерционный мутагенез, эктопическая или нерегулируемая экспрессия трансгена, долговременная персистенция и нецелевое распространение, которые не возникают при применении других лекарственных препаратов, в том числе биологических. Поэтому в ряде случаев требуется проведение дополнительных доклинических исследований.

Интеграция векторной ДНК и онкогенный потенциал. Нежелательная интеграция векторной ДНК в геном клетки-хозяина может приводить к инсерционному мутагенезу, одним из последствий которого является онкогенность. Первые испытания ГТЛП на основе вирусных векторов показали, что препараты клинически

⁵⁴ Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

⁵⁵ Там же.

⁵⁶ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

⁵⁷ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

⁵⁸ Glybera. Assessment report EMA/882900/2011. EMA; 2012.

⁵⁹ Там же.

⁶⁰ Reflection paper on design modification of gene therapy medicinal products during development. EMA/CAT/GTWP/44236/2009. EMA; 2011.

эффективны, но при этом выявили генотоксичность, вызванную нецелевой интеграцией. В частности, применение первого поколения гамма-ретровирусных векторов для лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID) сопровождалось высокой частотой (4 из 9 пациентов) Т-клеточных лейкозов [32]. Хотя и гамма-ретроверусный, и лентивирусный векторы интегрируются в транскрипционно-активные области, гамма-ретровирусные векторы часто интегрируются вблизи сайтов начала транскрипции и обладают сродством к онкогенам, что, по-видимому, является одним из факторов, определяющих различия в генотоксичности этих двух векторов [33]. Кроме того, путем интеграции потенциально возможно формирование химерных слияний генов, состоящих из последовательностей провируса и хозяина. Наконец, было показано, что лентивирусные векторы вызывают аберрантный сплайсинг клеточных транскриптов [34]. Постоянные усилия по улучшению или разработке новых типов ретровирусных векторов значительно снизили генотоксичность, однако инсерционный мутагенез все еще остается актуальной проблемой [35].

Руководствами ЕМА рекомендовано перед первым введением ГТЛП человеку изучить возможность интеграции для обнаружения случайного встраивания даже для тех вирусных векторов, для которых она не ожидается. Например, для препарата Золгенсма® исследований интеграции векторной ДНК в геном не проводили, поскольку, по мнению разработчика, несмотря на существующую возможность редких событий интеграции для вектора AAV, последствия, связанные с инсерционным мутагенезом, незначительны⁶¹. Уверенность разработчиков в данном случае основывается на том, что векторы AAV всегда считались неинтегрирующимися и нерепликативными из-за своей «дефектности» (отсутствия способности к продуктивной репликации без помощи Ad или вирусов герпеса) и в связи с этим относительно безопасными в отношении инсерционного мутагенеза. Однако имеются данные о том, что AAV могут интегрироваться в геном клетки-хозяина, хотя и с очень низкой частотой [36, 37]. Более того, недавно было продемонстрировано, что геномы векторов AAV, несущие компоненты CRISPR, могут интегрироваться в геном клетки-хозяина в местах

двухцепочечных разрывов [38], что вновь вызвало опасения по поводу онкогенной интеграции AAV и, как следствие, опасения по поводу долгосрочного профиля безопасности таких препаратов. Учитывая отсутствие единого мнения по вопросу случайного интегрирования AAV в геном⁶², целесообразно хранить образцы, полученные при проведении токсикологических исследований, для оценки интеграционной способности ГТЛП по запросу регулирующего органа или при появлении сигналов в процессе комплексного доклинического исследования безопасности препарата [15].

Для векторов, природа которых предполагает возможность встраивания в геном клетки-мишени, необходимо идентифицировать ткани, в которых происходит интеграция (мишени и вне мишеней), число копий и сайты встраивания копий вектора в геном (*in vitro* или *in vivo*), структурную целостность интегрированного вектора, его геномную стабильность. В случае использования нуклеиновых кислот с элементами для встраивания / интегрирующимися свойствами они должны рассматриваться как встраивающиеся векторы⁶³.

Опосредованное нуклеазами редактирование генома инициирует двухцепочечные разрывы ДНК [4], что также является источником нестабильности генома, который может привести к мутациям, вызывающим рак. Вполне вероятно, что любая сконструированная нуклеаза будет способствовать транслокациям между разрывом на мишени и спонтанными, случайными разрывами в других частях генома. Несмотря на то что ученые приложили огромные усилия для ограничения нецелевого воздействия, нецелевое редактирование все еще часто наблюдается у лабораторных животных, что ограничивает безопасное и широкое применение ГТ на основе методов редактирования. Редактирование генома также может привести к большим делециям и перестройкам ДНК. Подобные масштабные делеции могут иметь серьезные последствия для клеток-хозяев. Недавние исследования показали, что белки Cas9 в системе редактирования CRISPR-Cas9 активируют путь p53 (белок, регулирующий клеточный цикл) и вызывают мутации, инактивирующие p53, в различных линиях раковых клеток человека, в то же время усиливая механизмы репарации клеточной ДНК,

⁶¹ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

⁶² Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors. EMEA/CHMP/GTWP/587488/2007 Rev. 1. EMA; 2010.

⁶³ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

что еще больше снижает эффективность редактирования генома и повышает потенциальный риск онкогенеза [39–42].

Несмотря на перечисленные риски, стандартные исследования генотоксичности и стандартные пожизненные исследования канцерогенности ГТЛП на грызунах, как правило, не требуются. Тем не менее наличие онкогенного потенциала следует оценить *in silico* (например, наличие последовательностей белка онкогена или способ действия ГТЛП в геноме)⁶⁴. В случаях обнаружения онкогенного потенциала *in silico* или при наличии иных рисков канцерогенности ГТЛП необходимо провести исследования онкогенности и/или канцерогенности, при этом исследования онкогенности *in vivo* не имеют преимуществ перед исследованиями в условиях *in vitro* (на устоявшихся клеточных линиях, первичных клетках)⁶⁵. Для препарата Imlygic®, например, исследования канцерогенности и онкогенности не проводили на основании отсутствия в опубликованных эпидемиологических исследованиях ассоциации между HSV и развитием рака у человека. Вектор и сам вирус дикого типа не интегрируются в геном, а учитывая широкую распространенность вируса дикого типа среди людей, канцерогенный риск применения препарата разработчик посчитал маловероятным⁶⁶.

Для векторов, способных и условно способных к интеграции, должны быть изучены передача по зародышевой линии и онкогенез перед первым применением препарата у человека⁶⁷.

Вертикальный перенос генов. Стандартные исследования репродуктивной токсичности ГТЛП обладают низкой предиктивностью, однако в некоторых случаях при наличии пробелов в имеющейся информации такие исследования могут быть полезны⁶⁸. Необходимо представить

результаты исследований фертильности, эмбриофетальной и постнатальной токсичности исходя из вида и механизма действия препарата, показаний к медицинскому применению и популяции пациентов, если нецелесообразность проведения таких исследований должным образом не аргументирована. Для проведения клинических исследований ранней стадии данный вид исследований на животных может не потребоваться, если нет особых опасений⁶⁹. Так, для препарата Imlygic® было проведено исследование эмбриофетальной токсичности препарата и продемонстрирована способность преодолевать плацентарный барьер при отсутствии влияния на эмбриофетальное развитие, данная информация была включена в соответствующий раздел общей характеристики лекарственного препарата⁷⁰. Помимо этого, при необходимости (при устойчивых уровнях векторной ДНК в гонадах, гаметах, по результатам исследования сперматогенеза и анализа интеграции⁷¹) следует проводить доклинические исследования возможности непреднамеренной передачи векторов переноса генов по зародышевой линии и возможности вирусывыделения (а именно выделение вируса со спермой) еще до первого применения препарата у человека⁷². Программа доклинических исследований препарата Золгенсма® не предусматривала проведение стандартных исследований репродуктивной токсичности и переноса генов по зародышевой линии на основании того, что AAV-вектор является неинтегрирующим и нерепликативным, концентрация векторной ДНК низкая в гонадах и снижается в сперматоцитах, а повышенная экспрессия трансгена не представляет значительного риска на ранних стадиях развития эмбриона. Данные литературы свидетельствовали об отсутствии трансдукции сперматозоидов и передачи по зародышевой

⁶⁴ Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

⁶⁵ Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors. EMEA/CHMP/GTWP/587488/2007 Rev. 1. EMA; 2010.

Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

⁶⁶ Imlygic. Assessment report. EMA/734400/2015/ corr. 1. EMA; 2015.

⁶⁷ Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

⁶⁸ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

⁶⁹ Рекомендации по организации производства, оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований генотерапевтических лекарственных препаратов. М.: Лаборатория знаний; 2018.

⁷⁰ Imlygic. Assessment report. EMA/734400/2015/ corr. 1. EMA; 2015.

⁷¹ Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors EMEA/273974/2005. EMA; 2006.

⁷² Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

линии в экспериментах на животных. Кроме того, популяция пациентов включала детей в очень раннем возрасте (предпочтительно введение препарата в возрасте до 6 месяцев). Однако регуляторный орган, осуществлявший экспертизу препарата, подчеркнул оставшийся невыясненным вопрос, почему трансген не сохраняется в ооцитах, присутствующих до рождения и начинающих созревать в репродуктивном периоде у человека⁷³.

Перспективными направлениями разработки ГТЛП являются расширение популяции пациентов на беременных женщин, в лечении которых врачи имеют малый арсенал терапевтических средств, а также использование препаратов для внутриутробного лечения развивающегося эмбриона/плода с генетическим заболеванием. Таким образом, представляется возможность лечения нейродегенеративных моногенных заболеваний, для которых существующие препараты не способны преодолеть гематоэнцефалический барьер [43]. Экспериментально подтверждено, что некоторые серотипы векторов доставки генов AAV обладают способностью проникать через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры после внутривенного введения [43]. При разработке препаратов для внутриутробного лечения могут потребоваться исследования эмбриофетальной и перинатальной токсичности в целях изучения влияния на плод, например, плацентарного переноса цитокинов, вырабатываемых локально.

Риск для окружающей среды. Спектр рисков вредного воздействия ГТЛП на окружающую среду и здоровье человека определяется специфическими свойствами препаратов этого класса. Для идентификации опасностей используют метод описания развития событий по наихудшему сценарию, оценивают также потенциальные последствия выявленных возможных вредных воздействий в случае их возникновения. Основные потенциальные риски для здоровья человека связаны с выделением в окружающую среду векторных частиц, образованием рекомбинантных вирусов во время производства или после инфузии ГТЛП, инсерционным мутагенезом⁷⁴.

⁷³ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

⁷⁴ Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125491/2006. EMA; 2008.

⁷⁵ General principles to address virus and vector shedding. ICH Considerations. EMEA/CHMP/ICH/449035/2009. EMA; 2009.

Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

⁷⁶ Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

⁷⁷ Там же.

Риски, связанные с выделением частиц-переносчиков, заключаются в непреднамеренном воздействии ГТЛП на людей, для которых данный препарат не предназначен, с возникновением сверхэкспрессии нормального человеческого белка и индукции иммунного ответа против частиц-переносчиков. Аналогичный риск актуален для животных. Исходя из этого для прогнозирования рисков применения ГТЛП и для планирования клинических исследований следует провести исследования выделения препарата с секретами и физиологическими жидкостями (в том числе со слюной, слезами, потом)⁷⁵. Предпочтительной является количественная оценка методом ПЦР. Исследования выделения целесообразно объединять с другими доклиническими фармакокинетическими исследованиями.

Особое значение для здоровых людей имеет использование в ГТЛП генов устойчивости к антибиотикам. В целом, их использование не рекомендуется, но в исключительных случаях при создании такого ГТЛП перед первым применением у человека должна быть изучена непреднамеренная экспрессия гена устойчивости в соматических клетках человека⁷⁶.

Следующим риском при разработке ГТЛП на основе вирусных систем является непреднамеренное образование способного к репликации провируса [10]. Разработчиком должна быть оценена целесообразность проведения исследования непреднамеренной репликации вследствие комплементарности с вирусом дикого типа или с продуцентными клетками. Для препаратов, содержащих вирусные конструкции, в которых вирусы сохраняют полную способность к репликации или к репликации в определенных условиях (условно-репликативные вирусные векторы), и для вирусов, получивших такую способность в результате рекомбинации, нужно определить, ведут ли себя векторы ожидаемым образом. Последствия такой рекомбинации нужно оценивать по потенциалу репликации, патогенности, вирулентности вектора, распространенности и тяжести заболевания, которое может быть вызвано у человека и животных векторной системой⁷⁷. К примеру, при производстве препарата Золгенсма® последовательности

гер и *сар* в рамках контроля качества тестируют на наличие компетентных к репликации AAV. Однако, учитывая ограниченную способность анализа, разработчики подробно теоретически проанализировали последствия возможности образования компетентных к репликации AAV⁷⁸. Другой пример — препарат Advexin®, который был сконструирован таким образом, чтобы лишить вектор способности к репликации. Однако в клинических партиях препарата регулярно обнаруживали Ad-частицы, способные к репликации, хотя их уровень был низким⁷⁹. Следует подчеркнуть, что в рамках контроля качества целесообразно тестировать препараты на наличие репликативно-компетентных вирусов/микроорганизмов и определять элементы репликации вектора и капсидных белков в культуре клеток продуцентов.

Некоторые вирусы, например вирусы герпеса, могут находиться в латентном состоянии с последующей реактивацией (мобилизация). В таком случае требуется определить, ограничена ли латентность конкретными тканями и остается ли у вектора способность к реактивации. Могут также потребоваться исследования потенциала экспрессии генов вектора⁸⁰.

Токсические эффекты невирусных векторов определяются также небiorазлагаемой природой некоторых из этих соединений (прежде всего, неорганических), что является дополнительным препятствием для их клинического применения. Серьезной проблемой с неразлагаемыми неорганическими наночастицами является их потенциальное накопление в организме. Наночастицы размером менее ~6 нм могут фильтроваться посредством клубочковой фильтрации в почках и выводиться из организма с мочой, а более крупные наночастицы, особенно со значительным поверхностным зарядом, могут накапливаться в тканях в течение длительного времени [30, 44].

Заявитель разрабатывает меры для минимизации вероятности развития последствий, обусловленных вышеперечисленными рисками, в зависимости от их ранга. Примером может служить препарат Imlygic®, для которого разработчик установил как важный выявленный риск диссеминированную герпетическую

инфекцию у лиц с тяжелым иммунодефицитом и риск для беременных, контактирующих с пациентом, получающим препарат Imlygic®. Риски были внесены в план управления рисками и общую характеристику лекарственного средства⁸¹. Для препарата Advexin® продемонстрировано длительное выделение вектора из организма пациента совместно с не исключенным риском интеграции препарата. Недостаточная оценка разработчиком риска для окружающей среды внесла вклад в отрицательное соотношение «польза–риск» применения препарата⁸².

Анализ требуемых исследований общей и специфической токсичности

В свете активной интеграции России в мировое сообщество в области развития медицинских технологий важным аспектом является применение общих принципов, выработанных в актах международного значения. Обобщенный анализ требуемых исследований общей и специфической токсичности для различных типов препаратов, в том числе ГТЛП, приведен в *таблице 3*.

Очевидно, что для отдельных фармакологических классов препаратов (например, противоопухолевых), при определенных свойствах препарата, показаниях к применению и целевой популяции пациентов или в других исключительных случаях проведение тех или иных исследований может не потребоваться. Однако существует необходимость придерживаться гибкого подхода при планировании программы доклинических исследований ГТЛП, которая в большей степени, чем для других препаратов, зависит от актуальных данных научной литературы, международного опыта разработки, регистрации и клинического применения похожих ГТЛП. Еще одной особенностью разработки ГТЛП является то, что основной объем исследований требуется проводить до первого применения у человека, в то время как для низкомолекулярных синтетических и для высокомолекулярных биологических (не ГТЛП) препаратов характерно изменение программы доклинических исследований в зависимости от стадии клинических исследований.

⁷⁸ Zolgensma. Assessment report. EMA/200482/2020. EMA; 2020.

⁷⁹ Advexin. Withdrawal assessment report. EMEA/692328/2008. EMA; 2008.

⁸⁰ Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

⁸¹ Imlygic. Assessment report. EMA/734400/2015/ corr. 1. EMA; 2015.

⁸² Advexin. Withdrawal assessment report. EMEA/692328/2008. EMA; 2008.

Таблица 3. Программа доклинических исследований безопасности, необходимых для государственной регистрации разных типов лекарственных препаратов в Российской Федерации и Евразийском экономическом союзе**Table 3.** Non-clinical safety programmes required to support marketing authorisation in the Russian Federation and the Eurasian Economic Union, by medicinal product type

Вид стандартных исследований <i>Type of standard studies</i>	Необходимость включения исследования в программу доклинического изучения <i>Necessity of the study in the non-clinical safety programme</i>		
	Низкомолекулярные синтетические лекарственные препараты <i>Small molecules</i>	Высокомолекулярные биологические лекарственные препараты (но не ГТЛП) <i>Biologicals (other than GTMPs)</i>	ГТЛП <i>GTMPs</i>
Токсикокинетика <i>Toxicokinetics</i>	+	+	–*
Фармакологическая безопасность <i>Safety pharmacology</i>	+	+**	+**
Общетоксическое действие <i>General toxicity</i>	+	+	+
Репродуктивная токсичность <i>Reproductive toxicity</i>	+***	+***	+***
Генотоксичность <i>Genotoxicity</i>	+	–	–
Канцерогенность <i>Carcinogenicity</i>	+****	–	–
Местнораздражающее действие <i>Local tolerance</i>	+**	+**	+**
Другие исследования токсичности <i>Other toxicity studies</i>	Фотобезопасность, иммунотоксичность и аллергенность, сенсibilизация, гемолитическая активность, потенциал лекарственной зависимости и т.д. <i>Photosafety, immunotoxicity and allergenicity, sensitisation, haemolytic activity, abuse potential, etc.</i>	Иммуногенность и иммунотоксичность, перекрестная реактивность, гемолитическая активность, провоспалительный цитокиновый шторм и т.д. <i>Immunogenicity and immunotoxicity, cross-reactivity, haemolytic activity, pro-inflammatory cytokine storm, etc.</i>	Иммуногенность и иммунотоксичность, вертикальный перенос генов, инсерционный мутагенез и онкогенный потенциал, провоспалительный цитокиновый шторм и т.д. <i>Immunogenicity and immunotoxicity, vertical germline transmission, insertional mutagenesis and oncogenic potential, pro-inflammatory cytokine storm, etc.</i>
Оценка безопасности примесей и продуктов деградации <i>Safety assessment of impurities and degradation products</i>	+	+	+
Экотоксичность <i>Ecotoxicity</i>	–	–	+

Примечание. ГТЛП – генотерапевтический лекарственный препарат; «+» – требуется проведение исследования; «–» – не требуется проведение исследования.

* Требуется проведение исследований биораспределения.

** Могут быть включены в исследования общей токсичности.

*** Зависит от свойств препарата, показаний к применению и целевой популяции пациентов.

**** Зависит от области применения.

Note. GTMP, gene therapy medicinal product; +, required; –, not required.

* Biodistribution studies are required.

** These studies may be included in general toxicity studies.

*** It depends on the properties, proposed indications, and target population of the medicinal product.

**** It depends on the application of the medicinal product.

Заключение

Интеграция Российской Федерации в единый рынок лекарственных средств ЕАЭС создает необходимость совершенствования требований к аспектам безопасности лекарственных препаратов. На данный момент на этапе доклинических исследований целесообразно использовать актуальные международные рекомендации по изучению безопасности ГТЛП.

Определенные в настоящей статье особые риски ГТЛП и основные требования к доклинической оценке безопасности, выявленные возможные варианты оптимизации программы и дизайна доклинических исследований и установленные критерии экспертной оценки результатов доклинических исследований ГТЛП позволят разработчикам ГТЛП рационализировать планирование доклинических исследований и повысить качество доклинического резюме для подачи документов в экспертное учреждение с целью проведения клинических исследований или регистрации ГТЛП.

Все виды доклинических исследований ГТЛП существенно отличаются от исследований других видов лекарственных препаратов. Отличия затрагивают в том числе исследования специфической активности, фармакокинетики и общетоксического действия, которые рекомендуется объединять. Исследования фармакокинетики ГТЛП заменяют исследования биораспределения. Программа доклинических исследований безопасности ГТЛП, как для остальных биологических лекарственных препаратов, включает обязательные исследования общетоксического и местнораздражающего действия, фармакологической безопасности и иммуногенности. Продолжительность исследований общетоксического действия, как правило, больше, чем для других биологических препаратов, так как определяется длительностью экспрессии трансгена. Необходимость исследований репродуктивной токсичности определяется наличием данных научной литературы в отношении риска

вертикального переноса генов. Стандартные исследования иммунотоксичности, генотоксичности и канцерогенности являются необходимыми. Однако применение ГТЛП может быть сопряжено с указанными рисками, что может потребовать дополнительных исследований иммунотоксичности и исследований интеграции векторной ДНК. Для ГТЛП необходимо тщательно оценивать безопасность для окружающей среды, которая касается здоровья людей, контактирующих и не контактирующих с пациентом, а также животных. Природа вектора и гена, особенности механизма действия ГТЛП, популяция пациентов, результаты исследований выделения препарата и онкогенный потенциал в совокупности определяют экологический риск и значительно влияют на оценку отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения разрабатываемого ГТЛП.

При подготовке комплекта документов с целью получения разрешения на проведение клинического исследования или регистрацию препарата от разработчика ГТЛП требуется подробная научно аргументированная позиция по выбору программы доклинических исследований, релевантности животной модели и ключевых точек дизайна исследований: продолжительность введения препарата и период восстановления, режим дозирования, используемые методы, лабораторные тест-системы и другое. Особое внимание необходимо уделить подробному обоснованию отсутствия отдаленных рисков после введения ГТЛП, таких как нецелевая интеграция, нежелательные мутации клетки и онкогенный потенциал, вертикальный перенос генов, риск для окружающей среды.

По мере накопления опыта разработки, производства, доклинических и клинических исследований и применения ГТЛП происходит пересмотр связанных с ними рисков и получение новых данных по безопасности, что требует динамичного и своевременного обновления существующих требований по доклиническим исследованиям безопасности ГТЛП.

Литература / References

1. Wolf DP, Mitalipov PA, Mitalipov SM. Principles of and strategies for germline gene therapy. *Nat Med*. 2019;25(6):890–7. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0473-8>
2. Sharma D, Arora S, Singh J, Layek B. A review of the tortuous path of nonviral gene delivery and recent progress. *Int J Biol Macromol*. 2021;183:2055–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.192>
3. Ormond KE, Mortlock DP, Scholes DT, Bombard Y, Brody LC, Faucett WA, Garrison NA, Hercher L, Isasi R, Middleton A, Musunuru K, Shriner D, Virani A, Young CE. Human Germline Genome Editing. *Am J Hum Genet*. 2017;101(2):167–76. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.012>
4. Gaj T, Gersbach CA, Barbas 3rd CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.

- Trends Biotechnol.* 2013;31(7):397–405.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
5. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49–55.
<https://doi.org/10.1038/nrm3486>
 6. Porteus MH. A new class of medicines through DNA editing. *N Engl J Med.* 2019;380(10):947–59.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1800729>
 7. Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee SS, Chakraborty C. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Mol Ther.* 2021;29(2):571–86.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.028>
 8. Gjaltema RAF, Rots MG. Advances of epigenetic editing. *Curr Opin Chem Biol.* 2020;57:75–81.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.020>
 9. Handal T, Eiges R. Correction of heritable epigenetic defects using editing tools. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):3966.
<https://doi.org/10.3390/ijms22083966>
 10. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):53.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
 11. Wahane A, Waghmode A, Kapphahn A, Dhuri K, Gupta A, Bahal R. Role of lipid-based and polymer-based non-viral vectors in nucleic acid delivery for next-generation gene therapy. *Molecules.* 2020;25(12):2866.
<https://doi.org/10.3390/molecules25122866>
 12. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Чапленко АА, Рачинская ОА, Меркулов ВА. Мировой опыт регистрации и применения препаратов для генной терапии в клинической практике. *Антибиотики и химиотерапия.* 2019;64(1–2):58–68.
Melnikova EV, Merkulova OV, Chaplenko AA, Rachinskaya OA, Merkulov VA. International practices of registration and use of drugs for gene therapy in clinical practice. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2019;64(1–2):58–68 (In Russ.).
 13. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Горенков ДВ, Хантимирова ЛМ, Гусева СГ, Меркулов ВА. Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(1):6–22.
Soldatov AA, Avdeeva ZI, Gorenkov DV, Khamtimirova LM, Guseva SG, Merkulov VA. Challenges in development and authorisation of gene therapy products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2022;22(1):6–22 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-6-22>
 14. Таубэ АА. Регуляторные аспекты доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов. *Фармация.* 2020;(6):38–45.
Taube AA. Regulatory aspects of preclinical and clinical trials of drugs. *Pharmacy.* 2020;(6):38–45 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29296/25419218-2020-06-07>
 15. Assaf BT, Whiteley LO. Considerations for preclinical safety assessment of adeno-associated virus gene therapy products. *Toxicol Pathol.* 2018;46(8):1020–7.
<https://doi.org/10.1177/0192623318803867>
 16. Hinderer C, Katz N, Buza EL, Dyer C, Goode T, Bell P, et al. Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN. *Hum Gene Ther.* 2018;29(3):285–98.
<https://doi.org/10.1089/hum.2018.015>
 17. Hordeaux J, Buza EL, Dyer C, Goode T, Mitchell TW, Richman L, et al. Adeno-associated virus-induced dorsal root ganglion pathology. *Hum Gene Ther.* 2020;31(15–16):808–18.
<https://doi.org/10.1089/hum.2020.167>
 18. Long BR, Sandza K, Holcomb J, Crockett L, Hayes GM, Arens J, et al. The impact of pre-existing immunity on the non-clinical pharmacodynamics of AAV5-based gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;13:440–52.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.03.006>
 19. Shirley JL, de Jong YP, Terhorst C, Herzog RW. Immune responses to viral gene therapy vectors. *Mol Ther.* 2020;28(3):709–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.001>
 20. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-mediated in vivo gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;8:87–104.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.11.007>
 21. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood.* 2013;122(1):23–36.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-306647>
 22. Huang X, Yang Y. Innate immune recognition of viruses and viral vectors. *Hum Gene Ther.* 2009;20(4):293–301.
<https://doi.org/10.1089/hum.2008.141>
 23. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Krzowski L, Saluk-Bijak J, Bijak M. Various aspects of a gene editing system—CRISPR–Cas9. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9604.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249604>
 24. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67–83.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
 25. Chew WL, Tabebordbar M, Cheng JK, Mali P, Wu EY, Ng AH, et al. A multifunctional AAV–CRISPR–Cas9 and its host response. *Nat Methods.* 2016;13(10):868–74.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3993>
 26. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med.* 2019;25(2):249–54.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0326-x>
 27. Ferdosi SR, Ewaisha R, Moghadam F, Krishna S, Park JG, Ebrahimkhani MR, et al. Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced

- human T cell epitopes. *Nat Commun.* 2019;10(1):1842. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09693-x>
28. Wagner DL, Amini L, Wendering DJ, Burkhardt LM, Akyüz L, Reinke P, et al. High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat Med.* 2019;25(2):242–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0204-6>
 29. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release.* 2006;114(1):100–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>
 30. Luly KM, Choi J, Rui Y, Green JJ, Jackson EM. Safety considerations for nanoparticle gene delivery in pediatric brain tumors. *Nanomedicine (Lond).* 2020;15(18):1805–15. <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0110>
 31. Huang JY, Lu YM, Wang H, Liu J, Liao MH, Hong LJ, et al. The effect of lipid nanoparticle PEGylation on neuroinflammatory response in mouse brain. *Biomaterials.* 2013;34(32):7960–70. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.009>
 32. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3132–42. <https://doi.org/10.1172/JCI35700>
 33. Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol.* 2006;24(6):687–96. <https://doi.org/10.1038/nbt1216>
 34. Moiani A, Paleari Y, Sartori D, Mezzadra R, Miccio A, Cattoglio C, et al. Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. *J Clin Invest.* 2012;122(5):1653–66. <https://doi.org/10.1172/JCI61852>
 35. Elsner C, Bohne J. The retroviral vector family: something for everyone. *Virus Genes.* 2017;53(5):714–22. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1489-0>
 36. Deyle DR, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther.* 2009;11(4):442–7. PMID: 19649989
 37. Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, Trivedi NS, Carrillo-Carrasco N, Senac JS, et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest.* 2015;125(2):870–80. <https://doi.org/10.1172/JCI79213>
 38. Hanlon KS, Kleinstiver BP, Garcia SP, Zaborowski MP, Volak A, Spirig SE, et al. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun.* 2019;10(1):4439. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12449-2>
 39. Enache OM, Rendo V, Abdusamad M, Lam D, Davison D, Pal S, et al. Author correction: Cas9 activates the p53 pathway and selects for p53-inactivating mutations. *Nat Genet.* 2020;52(7):748–9. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0663-9>
 40. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med.* 2018;24(7):927–30. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>
 41. Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, Frias E, Ho D, Theriault K, et al. P53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med.* 2018;24(7):939–46. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0050-6>
 42. Zhang B. CRISPR/Cas gene therapy. *J Cell Physiol.* 2021;236(4):2459–81. <https://doi.org/10.1002/jcp.30064>
 43. Karda R, Buckley SMK, Mattar CN, Ng J, Massaro G, Hughes MP, et al. Perinatal systemic gene delivery using adeno-associated viral vectors. *Front Mol Neurosci.* 2014;7:89. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00089>
 44. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond).* 2008;3(5):703–17. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *О.В. Астапова* — планирование, разработка дизайна исследования, сбор и систематизация данных отечественных и международных рекомендаций и нормативных документов по генотерапевтическим лекарственным препаратам, анализ результатов доклинических исследований, написание и редактирование текста рукописи, формулировка выводов; *А.А. Берчатова* — идея исследования, анализ и систематизация данных научной литературы по разработке и изучению генотерапевтических лекарственных препаратов, написание и редактирование текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Oksana V. Astapova* planned and designed the study, collected and structured the data from Russian and international recommendations and regulatory documents on gene therapy medicinal products, analysed the results of non-clinical studies, drafted and edited the text of the manuscript, and formulated the conclusions. *Anastasia A. Berchatova* elaborated the study idea, analysed and structured scientific literature data on the development and study of gene therapy medicinal products, drafted and edited the text of the manuscript.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Астапова Оксана Вадимовна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3089-8395>
astapova@expmed.ru

Берчатова Анастасия Александровна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1462-2911>
berchatovaaa@expmed.ru

Статья поступила 03.08.2022

После доработки 01.11.2022

Принята к печати 13.12.2022

Online first 03.02.2023

Oksana V. Astapova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3089-8395>
astapova@expmed.ru

Anastasia A. Berchatova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1462-2911>
berchatovaaa@expmed.ru

Received 3 August 2022

Revised 1 November 2022

Accepted 13 December 2022

Online first 3 February 2023