

Генная терапия нейродегенеративных заболеваний: достижения, разработки, проблемы внедрения в клиническую практику

Е.В. Мельникова^{1,✉}, В.А. Меркулов^{1,2}, О.В. Меркулова¹

¹ 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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Мельникова Екатерина Валерьевна; melnikovaev@expmed.ru

Резюме

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) являются одними из перспективных объектов для разработки препаратов генной терапии, в первую очередь ввиду возможной причины их возникновения (нарушение работы гена или генов), отсутствия эффективной терапии, негативного влияния на качество жизни как самого пациента, так и его окружения.

Цель работы – анализ направлений и проблем разработки, проведения доклинических и клинических исследований препаратов генной терапии для лечения нейродегенеративных заболеваний, а также изучение зарубежного опыта экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma®, получившего условную государственную регистрацию. Анализ проводимых исследований продуктов генной терапии в области НДЗ показал, что основными проблемами являются: в исследованиях на животных – выбор модели заболевания, способа введения, подбор мишени для эффективной генной терапии при заболеваниях, затрагивающих работу нескольких генов; на этапе клинических исследований (КИ) – выбор группы сравнения, разработка критериев отбора пациентов для участия в КИ с учетом наличия генетической мутации, которая является показанием к проведению генной терапии, исключения из КИ пациентов при наличии у них антител к продукту генной терапии, выбор и обоснование безопасной терапевтической дозы вследствие единственного шанса у пациента на введение препарата генной терапии, сложность оценки клинической пользы по экспрессии трансгена в организме у человека вследствие недоступности тканей мозга для анализа. Прорывом последних лет является вывод на мировой фармацевтический рынок препарата генной терапии Zolgensma® (Novartis) для лечения детей со спинальной мышечной атрофией 1 типа. В статье проанализирован опыт экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma®, который может быть использован разработчиками в ходе вывода на рынок Евразийского экономического союза лекарственных препаратов по механизму условной регистрации, подразумевающей, что польза от немедленного доступа пациентов к препаратам будет превышать риски, связанные с неполными данными об их характеристиках.

Ключевые слова: генная терапия; нейродегенеративные заболевания; спинальная мышечная атрофия; аденоассоциированный вирус; Zolgensma®; качество; доклинические исследования; клинические исследования

Для цитирования: Мельникова Е.В., Меркулов В.А., Меркулова О.В. Генная терапия нейродегенеративных заболеваний: достижения, разработки, проблемы внедрения в клиническую практику. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):127–147. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-433>

Gene therapy of neurodegenerative diseases: achievements, developments, and clinical implementation challenges

E.V. Melnikova^{1,✉}, V.A. Merkulov^{1,2}, O.V. Merkulova¹

¹ *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

² *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation*

✉ Ekaterina V. Melnikova; melnikovaev@expmed.ru

Abstract

Neurodegenerative diseases (NDDs) are promising objects for the development of gene therapy products, primarily, due to the possible cause of these diseases (disruption of a gene or several genes), lack of effective therapy, and negative impact on the quality of life of both patients and their families and friends.

The aim of the study was to identify trends and challenges in the development and preclinical and clinical studies of gene therapy products for NDDs and to analyse the international experience of expert assessment of the dossier for Zolgensma[®], which received a conditional marketing authorisation.

According to the analysis of the ongoing studies of gene therapy products for NDDs, the following major challenges arise at preclinical and clinical stages. For animal studies, a particular challenge is to select a disease model, a route of administration, and a target for effective gene therapy for polygenic disorders. For clinical trials, problematic aspects are the selection of a control group, the development of inclusion criteria for patients with a genetic variant that is an indication for a gene therapy product and exclusion criteria for patients with antibodies to this gene therapy product, the selection and justification of a safe therapeutic dose since a gene therapy product can be administered to a patient only once, and the complexity of assessing clinical benefits of transgene expression in the human body due to the inaccessibility of brain tissue for analysis. Recent years have witnessed a breakthrough in gene therapy with the introduction of Zolgensma[®] (Novartis) to the world pharmaceutical market to treat children with spinal muscular atrophy type 1. The article analyses the experience of expert assessment of the marketing authorisation dossier for Zolgensma[®], which can be used by drug developers bringing new medicines to the market of the Eurasian Economic Union under conditional marketing authorisation, which implies that the benefits of immediate patient access to these medicines will exceed the risks associated with incomplete data on their characteristics.

Key words: gene therapy; neurodegenerative diseases; spinal muscular atrophy; adeno-associated viruses; Zolgensma[®]; quality; preclinical studies; clinical studies

For citation: Melnikova E.V., Merkulov V.A., Merkulova O.V. Gene therapy of neurodegenerative diseases: achievements, developments, and clinical implementation challenges. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):127–147. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-433>

Введение

Современный уровень развития генетических технологий, а также изученные механизмы возникновения, патогенеза и течения многих тяжелых жизнеугрожающих заболеваний, для лечения которых отсутствуют лекарственные препараты (ЛП) или методы лечения, в настоящее время позволяют вести разработку и создание инновационных препаратов генной терапии (ГТ) [1, 2].

Кроме того, в последнее время генетические технологии находятся под пристальным вниманием со стороны Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), органов государственной власти и экспертных организаций многих стран мира, в том числе и в России. Так, в соответствии с указом Президента Российской Федерации от 28.11.2018 № 680 «О развитии генетических технологий в Российской Федерации»¹ в апреле 2019 г. Правительством Российской Федерации была утверждена Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на период 2019–2027 гг., в соответствии с которой к 2027 г. планируется создать и изучить в доклинических исследованиях 20 генотерапевтических ЛП².

Одним из направлений создания препаратов ГТ, позволяющих проводить коррекцию экспрессии генов, ответственных за развитие заболеваний, являются нейродегенеративные заболевания (НДЗ), включающие врожденные генетические и возраст-зависимые заболевания, для которых характерна медленно прогрессирующая гибель определенных групп нервных клеток, приводящая к дегенерации структуры и функций центральной или периферической нервной системы [3, 4]. НДЗ характеризуются процессом необратимой гибели нейронов в определенных структурах центральной (ЦНС) или периферической нервной системы и сопровождаются прогрессирующими неврологическими нарушениями, включая двигательные (например, при спинальной мышечной атрофии (СМА), латеральном амиотрофическом склерозе (ЛАС), болезни Хантингтона (БХ), болезни Паркинсона (БП), рассеянном склерозе (РС) и спиноцеребеллярной атаксии), а также когнитивными расстройствами вплоть до развития деменции (болезнь Альцгеймера (БА), со-

судистая деменция, лобно-височная деменция, деменция с телами Леви и др.) [5].

За последние несколько десятилетий достаточно широко изучались патогенетические механизмы НДЗ, включая идентификацию новых терапевтических мишеней. НДЗ затрагивают различные структуры ЦНС и разные типы нервных клеток. Необратимой дегенерации подвергаются холинергические нейроны спинного мозга и ствола головного мозга при ЛАС и СМА, дофаминергические нейроны черного вещества (*substantia nigra*) при БП, ГАМК-ергические нейроны базальных ганглиев при БХ, гиппокампальные нейроны головного мозга при БА. Сохранение функций нейронов, вовлеченных в патологический процесс, и восстановление утраченных межклеточных связей в нервной ткани могут существенно повысить качество и продолжительность жизни пациентов [1].

Локализация поражений при НДЗ (преимущественно ЦНС и спинной мозг) создает сложность для действия большинства традиционных терапевтических агентов, которые не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер, что подтверждает актуальность разработки генотерапевтических ЛП для терапии НДЗ на основе вирусных векторов, способных доставить в места поражения трансгены, экспрессирующие терапевтические белки, антитела, последовательности для редактирования генов, микроРНК и малые интерферирующие РНК (siRNA) [6–8].

В настоящее время только один препарат ГТ НДЗ разрешен к применению в мире – Zolgensma® (*onasemnogene apearvovec*), производства компании Novartis, который предназначен для лечения СМА 1 типа у детей в возрасте младше двух лет с биаллельной мутацией гена выживаемости моторных нейронов 1 (*SMN1*) путем однократного внутривенного введения функциональной копии гена *SMN* человека, что обеспечивает устойчивый синтез белка *SMN* и последующую остановку прогрессирования заболевания.

Препарат Zolgensma® имеет государственную регистрацию в США (2019, в рамках ускоренной процедуры оценки)³, условную регистрацию в Европейском союзе (2020, в рамках ускоренной процедуры оценки механизма приоритетной медицины PRIME (PRiority MEDicines))⁴,

¹ Указ Президента Российской Федерации от 28.11.2018 № 680 «О развитии генетических технологий в Российской Федерации».

² Постановление Правительства Российской Федерации от 22.04.2019 № 479 «Об утверждении научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы».

³ Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>

⁴ Zolgensma. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zolgensma>

Японии (2020, в рамках ускоренной процедуры оценки механизма SAKIGAKE) и России (2021)⁵.

Цель работы – анализ направлений и проблем разработки, проведения доклинических и клинических исследований препаратов ГТ для лечения НДЗ, а также изучение зарубежного опыта экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma®, получившего условную государственную регистрацию.

Механизм условной регистрации ЛП является новым для Российской Федерации, он стал доступен с марта 2022 г. в рамках нормативно-правовой базы ЕАЭС⁶.

Вирусные векторы для генной терапии нейродегенеративных заболеваний

Перспективность разрабатываемых препаратов ГТ основана на двух факторах: способности воздействовать на этиологию заболевания и степени достижения постоянного эффекта. Однократное введение препарата с продолжительным эффектом особенно привлекательно при заболеваниях, поражающих ЦНС, потому что, в отличие от других органов, где эффективные терапевтические концентрации препарата могут быть достигнуты при многократном введении, большинство периферически вводимых агентов не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер или, преодолев его, обладают слабым эффектом [9].

Безопасная, эффективная и селективная доставка препаратов ГТ в ЦНС остается проблемой. Хотя стратегии невирусной доставки, основанные на применении наночастиц и рибонуклеопротеиновых комплексов, изучаются до сих пор, их применимость к доставке терапевтических агентов в ЦНС остается неопределенной ввиду возможной цитотоксичности, неспецифического связывания и быстрой элиминации из организма [10].

Использование в качестве вирусного вектора для доставки целевых генов в ЦНС лентивируса сопряжено с повышенным риском инсерционного мутагенеза и генотоксичностью; аденовирусные векторы для ГТ НДЗ реже используются в связи с недостаточно продолжительной экспрессией трансгена для сохранения терапевтического

эффекта, повышенной вероятностью возникновения иммунного ответа у человека, необходимостью наличия специфических клеточных рецепторов и в большинстве случаев требуемого повторного введения препарата ГТ [6, 10].

В нейробиологии одними из наиболее перспективных векторов для доставки целевых генов являются рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (ААВ) благодаря своим непатогенным свойствам, низкой иммуногенности, тропности к большинству клеток и тканей, высокой эффективности трансдукции и продолжительной экспрессии [11]. Основной их недостаток – небольшая емкость вектора (до 5 тыс. пар оснований). В отличие от митотически активных клеток, в которых введенные ААВ постепенно элиминируются, так как не могут эффективно интегрироваться в геном клеток хозяина, экспрессия ААВ может сохраняться в течение десятилетий в постмитотических клетках, таких как нейроны [12].

Для повышения тропности ААВ к различным тканям и клеткам ЦНС, включая олигодендроциты, астроциты и нейроны, в целях изучения в доклинических исследованиях (ДКИ) на различных видах животных препаратов ГТ, разрабатываются различные ААВ-капсиды. Оптимизированные ААВ демонстрируют повышение экспрессии трансгена и терапевтической безопасности при изучении на экспериментальных моделях таких НДЗ, как БА, БХ, БП [13–20].

Для лечения СМА в настоящее время используется, например, вектор ААВ-9, обладающий тропизмом к клеткам печени, легких, скелетных мышц, ЦНС, сердца и поджелудочной железы. Данная терапия в настоящее время считается относительно безопасной⁷.

Разработка и контроль качества препаратов для генной терапии нейродегенеративных заболеваний

Общие принципы контроля качества для производства, тестирования и выпуска продуктов ГТ для лечения НДЗ, а также проведения доклинических и клинических исследований преимущественно такие же, как и для других продуктов

⁵ Государственный реестр лекарственных средств. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=57a4c3e1-4577-4435-b3b0-5dfbfc3ff2ec&t=

⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 17.03.2022 № 36 «О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01431480/err_18032022_36

⁷ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf
Summary Basis for Regulatory Action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

ГТ⁸. Что касается качества, то особое внимание должно быть уделено критическим показателям (главным образом, активности, подлинности, чистоте, количественному содержанию), критериям их приемлемости, варибельности характеристик получаемых партий препаратов, сопоставимости качества получаемых продуктов при внесении изменений в производственный процесс.

Кроме того, в настоящее время некоторыми регуляторными органами в мире предпринимаются попытки разработать отдельные требования для препаратов ГТ, предназначенных для лечения НДЗ. В частности, с начала 2021 г. на официальном сайте FDA представлен проект руководства по генной терапии НДЗ человека⁹. Согласно этому проекту руководства некоторые аспекты разработки препаратов ГТ НДЗ, такие как проблемы, связанные со способом введения и объемом вводимого продукта, устройством для доставки и размером исследуемой популяции пациентов, могут потребовать дополнительных исследований, а также корректировки программы контроля качества.

Как правило, критические показатели качества (КПК) исследуемого ЛП оцениваются на каждом этапе фармацевтической разработки, а данные о характеристиках нескольких партий ЛП сопоставляются с результатами клинического применения. Результаты ранних стадий клинических исследований (КИ) НДЗ на небольшом объеме исследуемой популяции, в дополнение к оценке безопасности, могут также служить предварительными доказательствами эффективности. Таким образом, КПК продукта и критические параметры производственного процесса (КПП) должны быть оценены и сопоставлены с результатами ранних стадий КИ. При разработке препаратов ГТ для лечения НДЗ также необходимо учитывать применение нерутинных способов введения (в некоторых случаях, в головной и спинной мозг) и небольшие объемы

вводимого препарата, что требует особого внимания к составу (рецептуре) готового препарата.

Стратегия определения активности ЛП ГТ для лечения НДЗ может основываться на матрице оценки нескольких характеристик препарата, учитывающих различные механизмы его действия¹⁰.

Доклинические исследования препаратов для генной терапии

Дизайн доклинических исследований. ДКИ, адаптированные к препарату ГТ, и КИ ранних стадий должны позволить спрогнозировать характеристику профиля отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения препарата для предполагаемой популяции пациентов. Общие цели программы ДКИ препарата ГТ включают¹¹:

- определение диапазона биологически активных доз;
- рекомендации по начальной клинической дозе, графику эскалации дозы и режиму дозирования;
- выбор пути/режима введения и установление его безопасности;
- установление критериев включения пациентов;
- определение потенциальной токсичности и физиологических параметров для мониторинга эффективности и безопасности конкретного исследуемого препарата в КИ.

Программа ДКИ препаратов ГТ для лечения НДЗ включает стандартные подходы и исследования препаратов ГТ на основе вирусных векторов с оценкой биораспределения, выведения вектора и экспрессируемого продукта, эффективности трансдукции и экспрессии целевого гена, токсикологические и другие исследования.

Модели для доклинических исследований нейродегенеративных заболеваний. В качестве модельных животных с НДЗ и для подтверждения концепции часто используются крысы

⁸ Cellular and Gene Therapy Guidances. FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/biologics-guidances/cellular-gene-therapy-guidances>

Human regulatory. Multidisciplinary: gene therapy. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/multidisciplinary/multidisciplinary-gene-therapy>

⁹ Human Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. Guidance for Industry. FDA; 2021. <https://www.fda.gov/media/144886/download>

¹⁰ Там же.

¹¹ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf

Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (EMA/CHMP/GTWP/125459/2006). EMA; 2008. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-studies-required-first-clinical-use-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf

Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. Guidance for Industry. FDA; 2013. <https://www.fda.gov/media/87564/download>

или мыши (например, трансгенные или нокаутные модели). Однако из-за значимых анатомических различий в центральной и периферической нервной системах между грызунами и человеком применение животных с более крупным мозгом или позвоночником, таких как минипиги или нечеловекообразные приматы, может предоставить дополнительную информацию о безопасности и помочь в экстраполяции дозы для применения человеку. Включение более крупных животных позволяет также оценить способ введения, если используются хирургические процедуры и/или медицинские изделия.

Функциональные конечные точки для исследований, подтверждающих концепцию, на моделях НДЗ животных часто требуют нейрорепродуктивного тестирования для демонстрации их активности после введения исследуемого препарата ГТ, для чего требуется надлежащая подготовка персонала, соответствующие средства контроля и использование четко определенных систем (шкал) оценки.

Ранее для создания модели НДЗ на животных применялись различные химические соединения (стрептозотозин, скополамин, колхицины, тяжелые металлы и другие), однако такие модели не предполагали постепенного прогрессирования патологии после однократного введения [21]. Совершенствование молекулярно-биологических методов привело к созданию трансгенных животных с НДЗ: ряд линий трансгенных мышей (PDAPP, Tg2576, App23, JNLP3, ApoE и др.) был разработан специально для изучения БА – у них наблюдаются такие гистологические проявления, как появление сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубочков. Также существуют трансгенные модели БП и БХ на животных. Однако такие модели не идеальны: они дороги и не позволяют наблюдать постепенное развитие заболевания [22, 23].

Модели БА на мышах для исследования ГТ НДЗ основаны на экспрессии одного из дефектных генов человека, например генов предшественников β -амилоидного белка и пресенилина [24, 25]. У трансгенных мышей отложение аберрантного белка сопровождается дегенерацией нервных клеток головного мозга и нарушениями памяти, как у человека.

При БП у гомозиготных мышей, экспрессирующих дефектный ген α -синуклеина человека (A53T, аланин замещен на треонин в позиции 53), развиваются двигательные расстройства, приводящие к параличу скелетных мышц и, как следствие, к смертельному исходу [26].

При моделировании бокового амиотрофического склероза (БАС) чаще всего используются

трансгенные мыши G93A-SOD1, экспрессирующие мутантный ген белка супероксиддисмутазы 1 – SOD1 (G93A, глицин замещен на аланин в позиции 93), которые характеризуются прогрессирующей дегенерацией мотонейронов. Причины гибели нейронов при наиболее частой (спорадической) форме заболевания неизвестны, но часть случаев семейной формы заболевания обусловлена доминантными мутациями гена SOD1 (21q22.1-q22.2), кодирующего Cu/Zn-супероксиддисмутазу. Гомозиготные G93A-SOD1 мыши на фоне прогрессирования паралича скелетных мышц умирают в возрасте 4–5 месяцев. Линия мышей G93A-SOD1 широко используется в экспериментах по исследованию генотерапевтических конструкций для лечения БАС на основе AAB с системой редактирования генома CRISPR-Cas. Так, было показано, что при введении мышам G93A-SOD1 генотерапевтических конструкций на основе AAB с системой редактирования генома CRISPR-Cas, выключающих работу мутантного гена SOD1, увеличивается выживаемость двигательных нейронов спинного мозга и улучшается двигательная функция и продолжительность жизни мышей; замедляется прогрессирование заболевания у животных; наблюдается снижение скорости мышечной атрофии и снижение мышечной денервации, улучшение нервно-мышечной функции и уменьшение иммунореактивных включений SOD1 у мышей на терминальной стадии заболевания [27–29].

При БХ мутантный ген (HTT) белка хантингтина содержит увеличенное число повторов CAG-кодонов, и при экспрессии этого гена синтезируется белок, полиглутаминовый трек которого содержит более 40 остатков глутамина при нормальной длине в 20–25 остатков. В качестве модели заболевания используется линия трансгенных мышей R6/2, у которых мутированный ген HTT содержит более 150 повторов CAG кодонов и кодирует аберрантный белок с увеличенным полиглутаминовым треком [30]. В работе F.K. Ekmep с соавт. [31] показано, что введение трансгенным мышам HDR6/2 генотерапевтических конструкций на основе AAB-1 с системой редактирования генома CRISPR-Cas, выключающих работу гена HTT, приводит к снижению количества белка mHTT, увеличению продолжительности жизни животных и защите нейронов от гибели.

При СМА трансгенные мыши, экспрессирующие дефектный ген SMN1 и ген дикого типа SMN2, после рождения погибают через 4–6 сут. При этом у мышей нарушена двигательная активность и сосательный рефлекс, затруднено дыхание. Клинические и гистологические характеристики заболевания соответствуют СМА человека

3 типа. У мышей, экспрессирующих только дефектный ген *SMN1* (без трансгена *SMN2*), смерть наступает во внутриутробном периоде [32]. В ходе ДКИ показано, что интратекальная инъекция вектора AAV-9, кодирующего SMN, трансгенным мышам *SMN^{-/-}*, *hSMN2^{+/+}*, *SMNdelta7^{+/+}*, минипигам и нечеловекообразным приматам приводит к трансдукции 25–75% мотонейронов спинного мозга [33]. Билатеральная инъекция вектора AAV-9, кодирующего SMN, трансгенным мышам *SMNdelta7* в икроножную мышцу опосредует высокий уровень экспрессии гена и повышает выживаемость двигательных нейронов как в ЦНС, так и на периферии и увеличивает медианную продолжительность жизни [34].

Представленные данные свидетельствуют о том, что создание трансгенных животных (мышей), моделирующих НДЗ человека, не всегда позволяет провести полноценную доклиническую оценку препаратов ГТ из-за введенных в геном животных летальных мутаций.

Выбор способа введения препарата для генной терапии. Одним из важных моментов, который должен быть определен в ходе ДКИ препаратов ГТ, — это выбор способа введения, который обеспечивал бы достаточную концентрацию трансгена в органе-мишени (ЦНС, спинной мозг). Для ГТ НДЗ преимущественно рассматриваются следующие способы введения: прямые инъекции в пораженный участок, внутрочерепные, интратекальные, внутримышечные, внутривенные инъекции [33, 35–37]. Способность некоторых серотипов AAV транспортироваться в область, удаленную от мест инъекций, также может увеличить терапевтический эффект.

Локальная доставка терапевтических векторов для ГТ может осуществляться в определенные области паренхимы головного мозга посредством нейрохирургических стереотаксических инъекций низких доз препарата. Это особенно применимо к заболеваниям, затрагивающим определенные области мозга (например, БП и БХ), или к лизосомным болезням накопления, при которых терапевтический белок секретируется и может повторно захватываться другими клетками (перекрестная коррекция), что обеспечивает его диффузное распространение [38, 39]. Известны протоколы ДКИ *in vivo* с использованием интратекального введения, которые продемонстрировали эффективность и в последующем применены в КИ, например в случае препарата AAV9-CLN6 для лечения болезни Баттена¹².

Системная инъекция, теоретически самый простой и безопасный способ введения препаратов для ГТ, ограничивается неспособностью векторов на основе AAV проникать через ГЭБ, возможными проблемами, связанными с возникновением иммунного ответа, нецелесообразной экспрессией и техническими ограничениями (необходимо значительное количество вектора для введения) [40]. Поэтому большое внимание уделяется созданию векторов, обладающих способностью переносить гены в ЦНС после системной инъекции [41, 42]. Так, была продемонстрирована способность модифицированного AAV-9 преодолевать ГЭБ и трансдуцировать нейроны в ЦНС. Инъекция препарата новорожденным мышам приводила к высокому уровню трансдукции нейронов, тогда как инъекция взрослым мышам вызывала в основном трансдукцию астроцитов [42, 43].

Одним из способов улучшения доставки ЛП в мозг является подход, основанный на усилении конвекции при имплантации катетеров малого диаметра в мозг, что широко используется для точечной доставки ЛП к опухоли головного мозга с использованием небольших градиентов давления во время инъекции. Этот метод использовался у собак и приматов в ДКИ в основном при лечении опухолей головного мозга, но также и при БП; данный способ введения препарата ГТ потенциально может увеличить диффузию вектора после доставки [44, 45].

Доставка через цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) является безопасной альтернативой введению в паренхиму головного мозга; несколько исследований на нечеловекообразных приматах показали, что доставка AAV через ЦСЖ обеспечивает эффективную трансдукцию тканей в ЦНС [46].

Клинические исследования препаратов для генной терапии

Дизайн клинических исследований. При составлении программы КИ могут применяться разные подходы с учетом гетерогенности группы НДЗ: одни заболевания этой группы являются моногенными расстройствами с относительно хорошо охарактеризованным патогенезом и патофизиологией (например, СМА), а другие НДЗ имеют плохо изученную этиологию и/или изменчивую патофизиологию (например, спорадические БАС или БА)¹³. В первом случае для ускорения получения

¹² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02725580>

¹³ Human Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. Draft Guidance for Industry; 2021. <https://www.fda.gov/media/144886/download>

результатов КИ могут применяться инновационные схемы, во втором случае – рандомизированные плацебо-контролируемые КИ, включая, при необходимости, перекрестные схемы, которые могут быть наиболее эффективным средством получения убедительных доказательств эффективности.

Для любого НДЗ, независимо от этиологии, патофизиологии и истории развития заболевания, разработчикам рекомендуется рассмотреть вопрос, могут ли являться информативными инновационные программы КИ (например, адаптивные, исследования с контролируемой дозой, с включением исторического контроля или другие). Например, целесообразно применить стратегию рандомизации в КИ для получения пациентами дополнительного препарата ГТ или плацебо среди пациентов, которые уже получают лечение препаратом с доказанной эффективностью при НДЗ, поскольку ни одному пациенту с НДЗ не должно быть отказано в эффективной терапии.

Испытания с использованием внешнего, исторического контроля для сравнения (а не параллельной группы сравнения) могут проводиться с использованием препарата ГТ, предназначенного для лечения редкого и серьезного НДЗ, для которого:

- существует неудовлетворенная медицинская потребность;
- включение параллельного контроля не является практичным или этичным;
- течение заболевания хорошо документировано, предсказуемо и может быть объективно измерено и проверено, например высокая и предсказуемая во времени смертность;
- исследуемая популяция и исторические контрольные показатели сопоставимы;
- ожидаемый эффект лечения препаратом ГТ очевиден и тесно связан во времени с традиционным лечением.

Однако даже при этих обстоятельствах исторический контроль может быть неадекватным (например, если важные прогностические ковариаты либо неизвестны, либо не были зарегистрированы в исторических записях).

Критерии включения пациентов. При разработке критериев включения пациентов в КИ препаратов ГТ, в том числе для лечения НДЗ, необходимо учитывать следующие аспекты.

- Подтверждение наличия генетической мутации, которая является показанием к проведению ГТ. Если генетический диагностический тест недоступен, может потребоваться разработка сопутствующей диагностики для надлежащего выбора субъектов для КИ.

– Исключение потенциальных участников КИ при наличии антител к препарату ГТ, что также может потребовать разработки средств диагностики для их обнаружения.

- Если возможно, первое исследование на людях должно быть начато на взрослой популяции пациентов, которые способны понимать риски и давать информированное согласие. При отсутствии предварительных данных о безопасности или эффективности для человека, производители, планирующие проведение исследований на детях, должны предоставить обоснование того, почему исследования для взрослых либо неэтичны, либо неосуществимы.

Выбор дозы и режима дозирования. Для КИ большинства препаратов ГТ на ранней стадии рекомендуется проводить исследования в диапазоне доз, однако в некоторых случаях исследуется одна доза, выбранная на основе данных ДКИ и данных литературы. Это допускается регуляторными органами, учитывая также, что препараты ГТ предназначены для лечения жизнеугрожающих редких заболеваний с ограниченным количеством пациентов, соответствующих критериям включения при проведении КИ. Выбор и обоснование безопасной терапевтической дозы препарата для ГТ имеют важное значение, поскольку у субъектов может быть только один шанс получить препарат ГТ, который, как правило, применяется однократно из-за риска возникновения иммунного ответа. Для мониторинга системных иммунных реакций исследователи должны проводить диагностику клеточных и гуморальных иммунных реакций как на вектор, так и на белок, кодируемый трансгеном, а чтобы свести к минимуму иммунные реакции до и после введения продукта, могут применяться иммунодепрессанты, такие как кортикостероиды.

Выбор начальной дозы и режима дозирования должен быть подкреплен данными ДКИ и/или имеющимися результатами клинического применения с указанием того, что начальная доза не только достаточно безопасна, но и обладает терапевтическим потенциалом, особенно если процедура введения препарата сопряжена со значительными рисками или если препарат будет вводиться детям.

Конечные точки клинических исследований. Конечные точки КИ должны позволять оценить потенциальную клиническую пользу; биомаркеры, в том числе и потенциальные суррогатные конечные точки, могут указывать на активность препарата ГТ. Что касается НДЗ, то необходимо отметить, что способность обнаруживать экспрессию трансгена у пациентов, участвующих в КИ, ограничена часто из-за отсутствия био-

маркеров и трудностей, связанных с доступностью тканей головного мозга.

Поскольку многие НДЗ являются редкими и сложными с ограниченным пониманием их патогенеза, идентификация и характеристика суррогатной или промежуточной конечной точки часто затруднительна. Использование суррогатной конечной точки может быть уместным, если препарат ГТ непосредственно нацелен на основное, хорошо понятное и документированное изменение в организме, например при моногенном НДЗ, связанном с дефектом/недостатком/отсутствием определенного гена, который доставляется в организм препаратом ГТ. Терапия таким препаратом может улучшать клиническое течение или излечивать заболевание. Кроме того, данные о ранее полученном опыте применения препарата у отдельных пациентов во время разработки препарата ГТ (не в рамках основных КИ) могут служить дополнительным подтверждением его клинической пользы.

В настоящее время в реестре КИ содержатся данные о проведенных КИ препаратов ГТ для лечения НДЗ только на основе ААВ различных серотипов¹⁴ [6]. В основном это КИ, показывающие безопасность применения препарата ГТ на основе ААВ при соответствующих способах введения на небольшом количестве пациентов, например с болезнью Паркинсона [47], Помпе [48], Альцгеймера [49], Баттена [50], мукополисахаридозом [51].

Аспекты разработки и регистрации препарата Zolgensma® в Европейском союзе и США

Первым и пока единственным препаратом ГТ для лечения НДЗ, разрешенным к применению в мире, первоначально в США, затем в ЕС (условное разрешение на продажу) и Японии, а с 2021 г. и в России, является Zolgensma® производства Novartis. Препарат Zolgensma® представляет собой ААВ вектор с делетированными генами *gfp* и *cap*, ответственными за репликацию вируса, и содержащий последовательность гена выживаемости моторных нейронов *SMN1*.

СМА – это аутосомно-рецессивное генетическое заболевание с частотой около 1 на 10 000 новорожденных, из которых примерно 45–60% случаев приходится на СМА 1 типа. У пациентов с СМА отсутствует ген *SMN1*, что приводит к прогрессирующей потере мотор-

ных нейронов и вызывает мышечную слабость и смерть из-за дыхательной недостаточности. Тяжесть заболевания отрицательно коррелирует с количеством копий гена *SMN2*, при этом у большинства пациентов с СМА 1 типа имеется 2 копии гена. У пациентов с 3 копиями гена *SMN2* СМА 1 типа (никогда не сможет сидеть самостоятельно) развивается примерно в 15% случаев, а СМА 2 типа (никогда не сможет ходить) – у 55% пациентов, у 30% пациентов – СМА типа 3а (медленное прогрессирование мышечной слабости). СМА 1 типа является смертельным заболеванием, и без респираторной поддержки и искусственного питания большинство пациентов не достигают двухлетнего возраста. Таким образом, лечение направлено на продление выживаемости и улучшение двигательной функции.

В период процедуры регистрации FDA¹⁵ препарата Zolgensma® научных консультаций (scientific advice) не проводилось; европейским регуляторным органом были проведены 3 научные консультации в рамках помощи по протоколу (две в 2017 г. и одна в 2018 г.). Консультации в 2017 г. были посвящены вопросам КИ, в то время как в 2018 г. заявитель задал вопросы, связанные с качеством и доклинической разработкой¹⁶.

Поддержка в рамках протокола (protocol assistance) при регистрации препарата касалась следующих клинических аспектов:

- приемлемости дизайна контролируемого многоцентрового КИ фазы 3;
- планирования проведения многоцентрового открытого КИ фазы 2–3 при однократном внутривенном введении препарата, использования исторического контроля, выбранной популяции пациентов, размера выборки, первичных и вторичных конечных точек, а также подхода к статистическому анализу и дозе;
- сопоставимости исследуемых серий препаратов в КИ фазы 1 и 3 и возможности учета результатов КИ в заявке на регистрацию.

В 2018 г. вопросы консультаций касались аспектов качества препарата и проведения ДКИ:

- оценки сопоставимости серий препаратов, используемых в КИ фазы 1 и 3, при этом обсуждался перечень необходимых показателей качества и их критериев приемлемости, предлагаемый подход к производству и тестированию, программа исследования стабильности для активного вещества и готового продукта,

¹⁴ <https://www.clinicaltrials.gov/>

¹⁵ Summary Basis for Regulatory Action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

¹⁶ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

- срок годности, количественный анализ эффективности, план проведения квалификации, тестирование готового препарата при выпуске;
- дизайн ДКИ.

Качество

Программа обеспечения качества препарата Zolgensma® включала разработку перечня показателей качества и критериев их приемлемости для активной субстанции при оценке 20 после-

довательных партий. Спецификации на активную субстанцию и готовый препарат были разработаны на основе производственного и клинического опыта, а также стандартов Европейской фармакопеи. Ввиду получения условного разрешения на продажу препарата Zolgensma® (когда польза от быстрого доступа пациентам превышает риск неполных данных о разработке препарата) ЕМА были также установлены определенные обязательства для заявителя, касающиеся качества препарата (рис. 1)¹⁷.

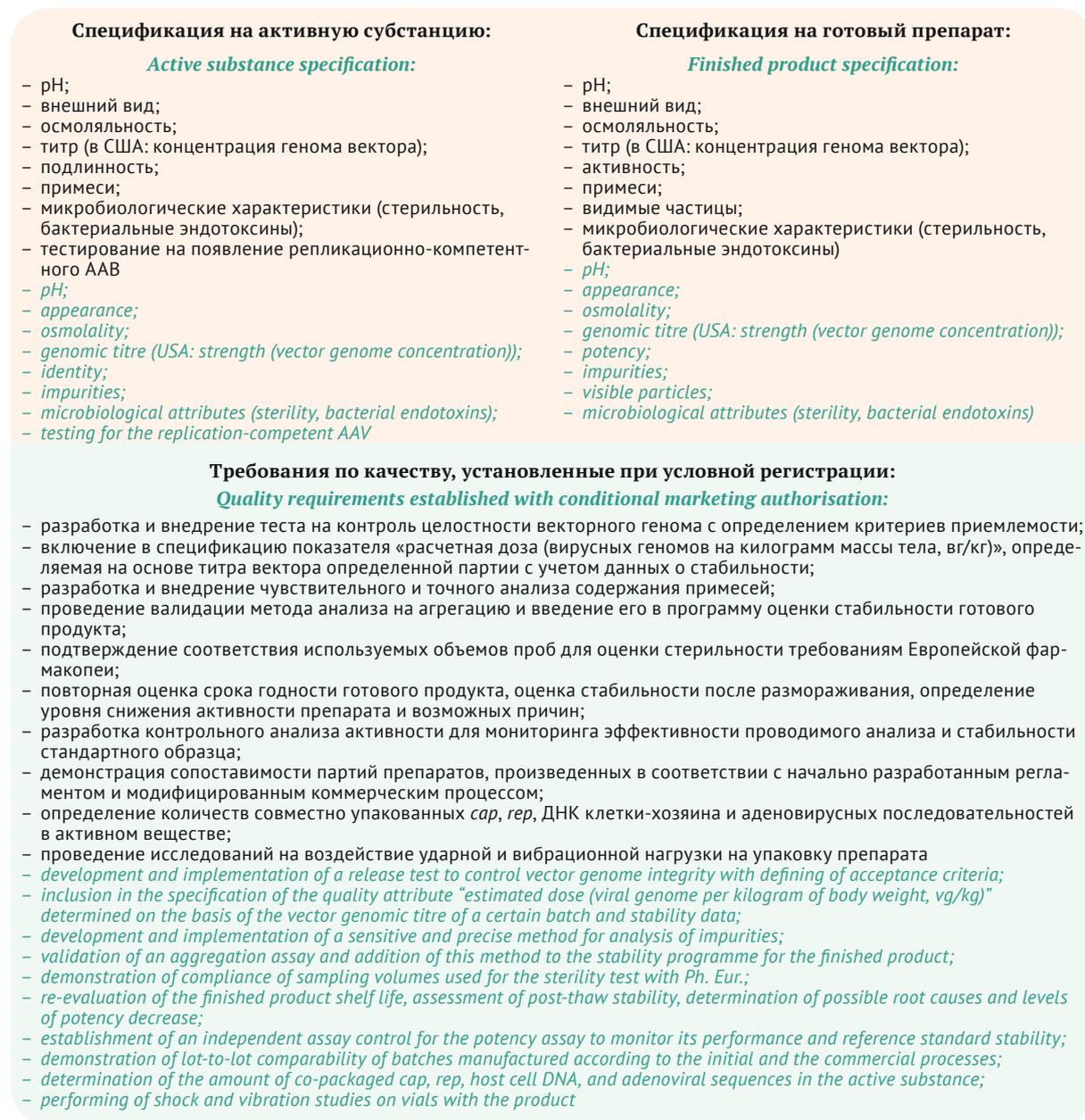


Рис. 1. Стратегия контроля качества препарата Zolgensma®¹⁸.

Fig. 1. Zolgensma® quality control strategy¹⁸.

¹⁷ Assessment report, Zolgensma. EMA/200482/2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹⁸ 5.2.3. Cell substrates for production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia 10th ed; 2020.

Кроме того, при изучении вопроса наличия/отсутствия эндогенных ретровирусов в банках клеток, используемых для производства препарата, в связи с определением положительного сигнала при анализе на активность обратной транскриптазы PERT (product-enhanced reverse transcriptase) в клеточных линиях, регуляторный орган ЕС рекомендовал заявителю уточнить, проводилось ли определение инфицирующей способности в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи¹⁹. В ответ заявитель обосновал схему тестирования на наличие ретровируса и обязался провести анализ на инфицирующую способность для следующего главного банка клеток в случае положительного анализа PERT. По запросу заявитель также предоставил данные тестирования на вирусы клеток из текущих трех рабочих банков клеток (на максимальном уровне удвоения клеточной популяции), используемых для производства препарата.

Доклинические исследования

Заявка на маркетинговую авторизацию препарата Zolgensma® содержала сведения о проведенных ДКИ на мышах, минипигах и обезьянах *Сynomolgus*. В таблице 1 представлены основные результаты ДКИ, содержащиеся в заявке на регистрацию препарата Zolgensma®²⁰.

Результаты ДКИ показали, что фармакологические характеристики (биораспределение, эффективность экспрессии трансгена и др.) препарата Zolgensma® на модели заболевания СМА мышью обеспечивают принципиальное обоснование клинического использования препарата при внутривенном введении в предполагаемой популяции пациентов. Кроме того, фармакологические исследования на мышах и обезьянах *Сynomolgus* показали, что лечение должно быть начато как можно раньше: чем позже начинается лечение, тем больше повреждаются моторных нейронов, трансдукция ААВ Zolgensma® которых является основным показателем, отвечающим за эффективное лечение. Терапевтическая доза Zolgensma® для КИ фазы 1 была установлена $1,1 \times 10^{14}$ вирусных геномов на килограмм массы тела (вг/кг).

Основным нежелательным явлением, выявленным в ходе токсикологических исследований на мышах, является дозозависимый (выше $1,5 \times 10^{14}$ вг/кг) тромбоз предсердий, который приводит к высокой смертности животных. Исследования безопасности были проведены при использовании препарата, который затем применили в КИ фазы 3.

В КИ не наблюдалось сердечно-сосудистой токсичности, связанной с препаратом, изготовленным в соответствии с технологией производства для коммерческих целей, что может указывать на межвидовые различия в способности к трансдукции вектором кардиомиоцитов между мышами и людьми, что подтверждалось представленным заявителем обзором доступных данных о биораспределении препарата в тканях человека и мыши. Также в ходе ДКИ наблюдалась гепатотоксичность при дозе $3,9 \times 10^{14}$ вг/кг²¹.

Клинические исследования

Программа КИ препарата Zolgensma® включала 9 исследований: 7 интервенционных и 2 наблюдательных. В регистрационном досье ЕМА были представлены результаты шести КИ. По состоянию на 31.12.2019 в рамках КИ препарат получили 133 пациента: 101 – внутривенно (98 из них в предложенной терапевтической дозе и 3 в более низкой дозе), и 32 пациентам препарат был введен интратекально²². В первом КИ фазы 1 (CL-101) исследовали препарат, произведенный по ранее разработанному процессу, а в КИ 3 фазы CL-303, CL-302 и CL-304 – препарат, произведенный по технологии производства для коммерческих целей²³.

Никаких специальных исследований фармакокинетики и фармакодинамики для Zolgensma® не проводилось. Это признано регуляторным органом ЕС приемлемым для продукта генной терапии. Биораспределение у людей в значительной степени основано на данных, полученных при изучении биораспределения у нечеловекообразных приматов и после изучения тканей умерших пациентов. Выделение вируса происходит главным образом с калом, и большая часть дозы выводится в течение 30 сут после введения. Ни у одного пациента исходные титры антител

¹⁹ 5.2.3. Cell substrates for production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia 10th ed; 2020.

²⁰ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

Summary basis for regulatory action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

²¹ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

²² Там же.

²³ Там же.

Таблица 1. Перечень основных результатов разработок доклинических исследований препаратов Zolgensma®
Table 1. List of the main results of Zolgensma® preclinical development

Показатель Attribute	Способ введения / препарат Method of administration / gene therapy product	Модель Model	Краткие результаты Brief results
Фармакологические исследования Pharmacology			
Биораспределение Biodistribution	Внутривенно / AAV9.CB.GFP Intravenously / AAV9.CB.GFP	Мыши дикого типа линии C57BL/6 Wild-type C57BL/6 mice	Экспрессия GFP через 10 и 21 сут после инъекции была выявлена в сердце и скелетных мышцах, в ганглиях дорсальных корешков и нижних двигательных нейронах в спинном мозге. Экспрессия GFP сохранялась в течение 7 недель после введения исследуемого препарата, в головном мозге — до 21 сут GFP expression was detected in the heart and skeletal muscles, the ganglia of dorsal roots, and lower motor neurons in the spinal cord in 10 and 21 days after injection. GFP expression persisted for 7 weeks after investigational product administration, and up to day 21 in the brain
	Внутривенно / целевой препарат Intravenously / target product	Новорожденные мыши линии FVB Newborn FVB mice	При введении препарата в дозах $1,5 \times 10^{14}$, $2,4 \times 10^{14}$ или $3,0 \times 10^{14}$ в/кг экспрессию транскрипта транскрипта детектировали через 3, 6 и 12 недель после введения, в том числе в головном и спинном мозге, что указывало на способность вектора преодолевать гематоэнцефалический барьер при системном введении. Самые высокие уровни экспрессии транскрипта были обнаружены в сердце, печени, легких и скелетных мышцах Transgene expression was detected in 3, 6, and 12 weeks after administration at doses of 1.5×10^{14} , 2.4×10^{14} , or 3.0×10^{14} vg/kg, including in the brain and spinal cord, which indicated the ability of the vector to cross the blood-brain barrier after systemic administration. The highest levels of transgene expression were found in the heart, liver, lungs, and skeletal muscles
	Интрастекально; интрацестернально / AAV9.CB.GFP Intrathecaly; intracisternally / AAV9.CB.GFP	Здоровые минипиги Healthy minipigs	Через 21–24 сут после инъекции препарата в дозе $5,2 \times 10^{12}$ в/кг экспрессия GFP была выявлена в ганглиях дорсальных корешков, сером и белом веществе спинного мозга животных. Наблюдалась значительная трансдукция двигательных нейронов, а также больших нейронов вентрального рога. В головном мозге высокие уровни экспрессии были обнаружены в клетках Пуркинье мозжечка, нервных волокнах продолговатого мозга, а также в отдельных ядрах. Отсутствие экспрессии GFP в периферических тканях подтверждало селективность трансдукции клеток ЦНС и возможность интрацестернального введения GFP expression was detected in the ganglia of dorsal roots and grey and white matter of the spinal cord of animals in 21–24 days after injection at a dose of 5.2×10^{12} vg/kg. There was a significant transduction of motor neurons, as well as large neurons of the ventral horn. In the brain, high levels of expression were found in the Purkinje cells of the cerebellum, nerve fibers of the medulla oblongata, as well as in individual nuclei. The absence of GFP expression in peripheral tissues confirmed the selectivity of CNS cell transduction and the possibility of intracisternal administration
	Внутривенно; в желудочки головного мозга / AAV9.CB.GFP Intravenously; intraventrically / AAV9.CB.GFP	Нечеловеко- образные приматы (Сynomolgus) Non-human primates (Synomolgus)	Внутривенная инъекция приводила к экспрессии транскрипта в скелетных мышцах и органах, включая семенники, сердце, селезенку и тонкий кишечник. Экспрессия транскрипта в тканях сердца была значительно ниже, чем у мышей. Инъекции исследуемым препаратом осуществляли в первый день, на 30 сут (соответствует возрасту 3 месяца человека) и на 90 сут (соответствует возрасту 1 года человека) после рождения. Было показано, что введение препарата даже на 30 или 90 сут все еще приводит к высокому уровню трансдукции двигательных нейронов, предсказывающей клиническую эффективность, что считается важным результатом, поскольку лечение препаратом детей может проводиться в возрасте до 1,5 лет в зависимости от массы тела пациентов Intravenous injection resulted in transgene expression in skeletal muscles and organs, including the testes, heart, spleen, and small intestine. The expression of the transgene in the heart tissues of primates was significantly lower than that in mice. Injections were carried out on days 1, 30 (corresponding to the human age of 3 months), and 90 (corresponding to the human age of 1 year) after birth. Even when administered on day 30 or 90, the product still led to a high level of motor neuron transduction predicting clinical efficacy. It is an important result, since the product can be used to treat children up to 1.5 years old, depending on their body weight

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Показатель Attribute	Способ введения / препарат Method of administration / gene therapy product	Модель Model	Краткие результаты Brief results
Специфическая активность Potency	Инtrateкально / целевой препарат Intrathecaly / target product	Минипиги с моделью СМА Minipigs with SMA	Животным на 6 сут после рождения (предсимптомно) либо на 33–36 сут после рождения (симптоматически) вводили препарат Zolgensma®. Методами иммуногистохимии клеток спинного мозга выявлен тропизм вектора AAV9 к двигательным нейронам, при этом глиальные клетки трансдуцировались в редких случаях. При предсимптомном лечении заболевание СМА было полностью предотвращено (доза 8×10^{12} вг/кг). После симптоматического лечения наблюдалось частичное улучшение состояния (доза $2-3,8 \times 10^{13}$ вг/кг). Данное исследование показывает, что раннее применение препарата имеет решающее значение для оптимальной эффективности <i>Animals were injected with Zolgensma® on day 6 after birth (pre-symptomatic treatment) or on days 33–36 after birth (symptomatic treatment). Immunohistochemical analysis of spinal cord cells revealed AAV9 tropism for motor neurons, while glial cell transduction was rare. Pre-symptomatic SMA treatment (8×10^{12} vg/kg) completely prevented the disease, and symptomatic SMA treatment ($2-3,8 \times 10^{13}$ vg/kg) partially improved the condition. This study shows that early use of the product is crucial for optimal efficacy</i>
Внутривенно / целевой препарат Intravenously / target product	Нокаутные мыши SMNdelta7 SMNdelta7 knock-out mice	Нокаутные мыши SMNdelta7 SMNdelta7 knock-out mice	Введение препарата в дозе $6,7 \times 10^{13}$ вг/кг (исследовательские серии для KI I фазы) увеличивало время выживания мышей с СМА с 15 до 35 сут, в то время как введение препарата в дозе $3,3 \times 10^{14}$ вг/кг увеличало выживаемость более чем до 250 сут (по сравнению со средней выживаемостью 15,5 сут у контрольных животных). Эффективность коммерческой серии препарата Zolgensma® была определена относительно данных KI I фазы (исследовательская серия препарата), которые показали сопоставимое время выживания в зависимости от введенной дозы: доза $1,2 \times 10^{13}$ вг/кг Zolgensma® привела к увеличению времени выживания мышей с СМА с ~2 недель (14–17 сут) до ~3 недель (20–25 сут), введение препарата в дозе $7,4 \times 10^{13}$ вг/кг увеличало время выживания до ~4 недель (28–34 сут). Была продемонстрирована эффективность исследовательской (для KI I фазы) и коммерческой серий препарата (для KI 3 фазы) <i>Doses of $6,7 \times 10^{13}$ vg/kg (clinical batches for phase I Cts) increased the survival time of SMA mice from 15 to 35 days, while doses of $3,3 \times 10^{14}$ vg/kg increased it to more than 250 days (compared with an average survival of 15.5 days in control animals). The efficacy of the commercial batch of Zolgensma® was determined relative to the phase 1 CT data (clinical batch), which showed comparable survival times depending on the administered dose: a dose of $1,2 \times 10^{13}$ vg/kg of Zolgensma® increased the survival time of SMA mice from ~2 weeks (14–17 days) to ~3 weeks (20–25 days), while a dose of $7,4 \times 10^{13}$ vg/kg increased the survival time to ~4 weeks (28–34 days). The efficacy of the clinical (CT phase I) and commercial (CT phase III) batches was demonstrated</i>
Доза Dose	Внутривенно; в желудочки головного мозга / целевой препарат Intravenously; intraventrically / target product	Нокаутные мыши SMNdelta7 SMNdelta7 knock-out mice	Однократное введение целевого препарата в дозах от $1,2 \times 10^{13}$ до $1,1 \times 10^{14}$ вг/кг у новорожденных мышей приводило к дозозависимому увеличению выживаемости, улучшению двигательной функции и передачи нервно-мышечного импульса, увеличению массы тела и улучшению сердечной функции. Увеличение выживаемости и массы тела было характерно для мышей, получавших дозу на 1 или 2 сут после рождения <i>A single administration of the target product to newborn mice in a dose ranging from $1,2 \times 10^{13}$ to $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg led to a dose-dependent increase in survival and body weight and improvement in cardiac and motor functions and neuromuscular transmission. The increase in survival and body weight was characteristic of mice receiving their dose on day 1 or 2 after birth</i>
Инtrateкально/ целевой препарат Intrathecaly / target product	Минипиги с СМА Minipigs with SMA	Минипиги с СМА Minipigs with SMA	В модели СМА у минипигов использовали только одну дозу Zolgensma® (предсимптомно — доза 8×10^{12} вг/кг, при симптоматическом лечении — доза $2-3,8 \times 10^{13}$ вг/кг), поэтому в данной модели не было установлено никакой зависимости доза–ответ <i>Only one dose of Zolgensma® was used in the minipig SMA model (pre-symptomatic treatment with a dose of 8×10^{12} vg/kg and symptomatic treatment with a dose of $2-3,8 \times 10^{13}$ vg/kg); therefore, no dose-response relationship was established in this model</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Показатель Attribute	Способ введения / препарат Method of administration / gene therapy product	Модель Model	Краткие результаты Brief results
Эффективность трансдукции, эффективность экспрессии трансгена Efficiency of transduction, efficiency of transgene expression	Внутривенно / AAV9.CB.GFP Intravenously / AAV9.CB.GFP	Нокаутные мыши SMNdelta7 и нечеловекообразные приматы (Synomolgus) с SMA1 SMNdelta7 knock-out mice and non-human primates (Synomolgus) with SMA1	Обезьянам Synomolgus вводили исследуемый препарат в дозе 1×10^{13} вг/кг (что соответствует 2×10^{13} вг/обезьяна) в позу Тренделенбурга либо в обычном положении. Максимальная эффективность трансдукции достигалась, когда животных удерживали в позу Тренделенбурга в течение 10 мин после инъекции. Уровень экспрессии GFP составил 55, 62 и 80% в шейном, грудном и поясничном отделах спинного мозга соответственно. У мышей при введении дозы $3,3 \times 10^{13}$ вг/кг экспрессия GFP составила 46, 47 и 72% в шейном, грудном и поясничном отделах спинного мозга соответственно. Результаты исследований показали, что при более низкой дозе у обезьян Synomolgus достигается бо́льшая эффективность трансдукции по сравнению с мышами Synomolgus monkeys were injected with the investigational product at a dose of 1×10^{13} vg/kg (corresponding to 2×10^{13} vg/monkey) in the Trendelenburg position or in the usual position. The maximum transduction efficiency was achieved when the animals were held in the Trendelenburg position for 10 minutes after injection. GFP expression was 55, 62, and 80% in the cervical, thoracic, and lumbar regions, respectively. In mice, a dose of $3,3 \times 10^{13}$ vg/kg resulted in GFP expression of 46, 47 and 72% in the cervical, thoracic and lumbar regions, respectively. The results of the studies showed that at a lower dose, Synomolgus monkeys achieved higher transduction efficiency compared to that in mice
Токсикологические исследования Toxicology			
Токсичность при однократном введении Single-dose toxicity	Внутривенно / целевой препарат Intravenously / target product	Новорожденные мыши FVB Newborn FVB mice	Дегенерация миокарда наблюдалась при введённой дозе препарата $7,9 \times 10^{13}$ вг/кг и выше. При дозе $1,5 \times 10^{14}$ вг/кг и выше наблюдалось дозозависимое увеличение частоты и тяжести неблагоприятных сердечных проявлений различной степени (тромбоз предсердий, увеличение предсердий, фиброплазия, дегенерация миокарда и воспаление). Изменения в печени включали дегенерацию/некроз гепатоцитов в минимальной или умеренной степени, незначительную гепатоцеллюлярную гипертрофию, перинуклеарную вакуолизацию и увеличение клеток Купфера. Кроме того, при уровнях дозы $2,4 \times 10^{14}$ вг/кг и выше в легких наблюдалось незначительное периваскулярное и хроническое воспаление. Смертность, связанная с введением препарата, выявлена при уровнях дозы $2,4 \times 10^{14}$ вг/кг и выше, что ассоциировалось с наблюдаемой кардио- и гепатотоксичностью. Причиной смерти чаще всего был тромбоз предсердий Myocardial degeneration was observed at doses of 7.9×10^{13} vg/kg and higher. At doses of 1.5×10^{14} vg/kg and higher, the study showed a dose-dependent increase in the frequency and severity of cardiac adverse events of various degrees (atrial thrombosis, atrial dilation, fibroplasia, myocardial degeneration, and inflammation). Changes in the liver included minimal to moderate degeneration/necrosis of hepatocytes, minor hepatocellular hypertrophy, perinuclear vacuolation, and increased Kupffer cells. In addition, at doses of 2.4×10^{14} vg/kg and higher, minor perivascular and chronic inflammation was observed in the lungs. At doses of 2.4×10^{14} vg/kg and higher, the study showed preparation-related mortality, which was associated with the observed cardiac and hepatic toxicity. The most frequent cause of death was atrial thrombosis

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Показатель Attribute	Способ введения / препарат Method of administration / gene therapy product	Модель Model	Краткие результаты Brief results
Токсичность при однократном введении Single-dose toxicity	Внутривенно; в желудочки головного мозга / целевой препарат intravenously; intraventrically / target product	Нечеловеко- образные прима- ты (Non-human primates (Symptolagus))	Токсичности, связанной с введением препарата в дозе 6.7×10^{13} вг/кг, не наблюдалось, но часть данных оценки не была представлена заявителем (например, данные вскрытия), что затрудняло надлежащую оценку результатов. Полученные результаты не соответствовали представленным ранее данным о системном воспалении, токсичности для печени и дегенерации нейронов у ювенильных макак-резусов и минипигов после введения аналогичного вектора [52], что, вероятно, связано с использованием более низкой дозы препарата. Поскольку в настоящее время имеются данные KI, эти данные являются предпочтительными для определения профиля безопасности и эффективности препарата No toxicity associated with the product was observed at a dose of 6.7×10^{13} vg/kg, but the Applicant did not provide part of the evaluated data (for example, necropsy), which made it difficult to properly evaluate the results. The submitted results did not correspond with the previously reported data on systemic inflammation, liver toxicity, and neuron degeneration in juvenile rhesus monkeys and minipigs after administration of a similar vector [52], which is probably due to the use of a lower dose. Since CT data are currently available, CT data are preferred for determining the product safety profile and effectiveness
Генотоксичность, канцероген- ность / онко- генность (риск инсерционного мутатенеза) Genotoxicity, carcinogenicity / oncogenicity (risk of insertion mutagenesis)	Исследования не проводились: отсутствие исследований по интеграции AAV в геном объясняется тем, что риск считается ограниченным, так как лишь небольшая часть AAV интегрируется в геном (случайным образом в области хроматина/ДНК без преимущественной интеграции в критические сайты), большая же часть остается в эписомальной форме. Кроме того, в настоящее время не было зарегистрировано ни одного случая инсерционного мутатенеза для AAV No studies have been conducted: the lack of studies on AAV integration into the genome is explained by the fact that the risk is considered limited, since only a small part of the AAV integrates into the genome (randomly into the regions of chromatin/DNA, without preferential integration into critical sites), while most of it remains in the episomal form. In addition, no cases of insertion mutagenesis have been reported for the AAV		

Примечание. AAV — аденоассоциированный вирус; KI — клиническое исследование; вг/кг — вирусных геномов на килограмм мышечной массы тела; SMA — спинальная мышечная атрофия; GFP — зеленый флуоресцирующий белок; AAV9.SV.GFP — аденоассоциированный вирусный вектор со вставкой гена зеленого флуоресцирующего белка вместо вставки исследуемого гена SMN для изучения биораспределения.
Notes. AAV, adeno-associated virus; CT, clinical trial; vg/kg, viral genomes per kilogram of body weight; SMA, spinal muscular atrophy; GFP, green fluorescence peptide; AAV9.SV.GFP, adeno-associated viral vector with the insertion of the green fluorescence peptide gene instead of the target SMN gene to study biodistribution.

к белку SMN не превышали уровень 1:50; иммунного ответа после введения препарата не было зарегистрировано. Как и ожидалось, был установлен иммунный ответ против капсида AAV-9, который корректировался предварительной обработкой преднизолоном.

Оценка эффективности препарата Zolgensma® европейским регуляторным органом была проведена по результатам исследования внутривенного применения препарата у 98 пациентов. Специальных КИ по определению дозы для препарата Zolgensma® не проводилось, предлагаемая терапевтическая доза 1×10^{14} вг/кг была определена в ДКИ; в рамках КИ 1 фазы CL-101 применялись две дозы (от $4,3 \times 10^{13}$ до $4,6 \times 10^{13}$ вг/кг и от $1,1 \times 10^{14}$ до $1,4 \times 10^{14}$ вг/кг)²⁴. Во всех КИ был использован исторический контроль. Основным КИ, проведенным на территории ЕС, результаты которого рассматривались ЕМА в рамках оценки регистрационного досье, было КИ 3 фазы CL-303 (однорупное) с участием 22 пациентов со SMA 1 типа (без функционального гена *SMN1*, а также одной или двумя копиями гена *SMN2*), у которых уже проявлялись симптомы заболевания либо не проявлялись на момент включения в КИ; возраст пациентов на момент лечения составлял менее 6 месяцев (<180 сут). Первичными конечными точками были определены: выживаемость в возрасте 14 месяцев и доля пациентов, достигших функционального сидения без поддержки в течение не менее 30 с при контрольном посещении врача в возрасте 18 месяцев.

Во время КИ у всех пациентов наблюдалось увеличение показателя двигательных функций при нейромышечных заболеваниях у новорожденных по шкале CHOP-INTEND (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders [53]) по сравнению с исходным уровнем. Анализ общей и мелкой моторики с помощью шкалы Бейли (Bayley Scales of Infant Development) для оценки раннего развития детей также указывает на постоянное улучшение у большинства пациентов мелкой моторики.

Из пациентов, включенных в исследование CL-303, 19 пациентов завершили исследование; один пациент скончался, а два пациента отозвали свое согласие. Сравнение с историческим контролем показало увеличение выживаемости пациентов, получивших лечение препаратом Zolgensma®. При этом 14 из 22 пациентов достигли навыка самостоятельно сидения в течение ≥ 30 с. Один пациент смог

ходить самостоятельно. У 3 из 22 пациентов не было зарегистрировано никаких улучшений, это были 3 пациента, не завершившие исследование из-за смерти и выхода из исследования. Исследования показали, что 18 из 22 пациентов (81,8%) были независимы от ИВЛ в возрасте 18 месяцев (сопутствующая конечная точка, $p < 0,0001$). В общей сложности 15 из 22 пациентов (68,1%) не нуждались в ИВЛ ни на одном этапе исследования, а также не получали поддержки в виде парентерального питания. Девять из 22 пациентов (40,9%) соответствовали критериям развития для возраста ребенка 18 месяцев. Это существенно отличается от естественного анамнеза (исторического контроля) и считается клинически значимым [54, 55].

Помимо данных КИ CL-303, заявка на маркетинговую авторизацию содержала следующие результаты эффективности применения препарата.

- Данные КИ 1 фазы CL-101: 14 из 15 пациентов, получавших лечение препаратом Zolgensma®, были живы в возрасте 13,6 и 20 месяцев. В конце исследования (через 24 месяца после введения дозы) 11 (из 12) пациентов из когорты 2 (доза от $1,1 \times 10^{14}$ до $1,4 \times 10^{14}$ вг/кг) смогли держать голову прямо без поддержки в течение ≥ 3 с и сидеть с поддержкой, 9 пациентов смогли сидеть без поддержки в течение ≥ 30 с, а 2 пациента смогли ходить самостоятельно; в конце КИ все пациенты находились на пероральном питании.
- Данные КИ LT-001 (наблюдательное КИ по оценке долгосрочной эффективности).
- Данные КИ 3 фазы CL-302 (аналог исследования CL-303 в ЕС): препарат получили 33 пациента, один пациент скончался, остальные 32 пациента живут без инвазивной вентиляции легких и продолжают участвовать в исследовании, один пациент не включен в оценку данных, поскольку проходил лечение в возрасте 181 сут (возраст исследуемой популяции – до 180 сут). Пациенты в исследовании CL-302 были старше на момент лечения по сравнению с пациентами в исследовании CL-303. По состоянию на 31.12.2019 6 пациентов соответствовали критериям ВОЗ – сидение без поддержки более 10 с, а 8 пациентов могли сидеть без поддержки не менее 30 с;
- Данные КИ 3 фазы CL-304 (когорты 1 – 14 пациентов с двумя копиями гена *SMN2*; когорты 2 – 15 пациентов с тремя копиями гена *SMN2*; первичной конечной точкой эффективности для когорты 2 являлась доля пациентов, до-

²⁴ Summary basis for regulatory action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

стигших способности стоять без поддержки не менее 3 с при любом посещении врача в возрасте до 24 месяцев). Пациентам не понадобилось применение инвазивной вентиляции легких. Четверо из 14 пациентов когорты 1 научились ходить с поддержкой, а затем самостоятельно, и 1 продолжает ходить с посторонней помощью. Пациенты во 2 когорте демонстрируют двигательные этапы развития, которые в значительной степени находятся в пределах нормального развития. Трое из 15 пациентов научились ходить с поддержкой, а затем самостоятельно, а четверо ходили с посторонней помощью.

Таким образом, достигнутые в ходе КИ показатели выживаемости и двигательной активности в значительной степени превосходят естественную историю течения СМА типа 1.

Не было представлено никаких данных, подтверждающих пользу у пациентов с одной копией гена *SMN2*. Данные, подтверждающие пользу у пациентов с тремя копиями гена *SMN2*, ограничены и не позволяют сделать вывод о пользе лечения из-за неоднородности естественного анамнеза у пациентов. Считается, что эффективность для пациентов с двумя копиями гена *SMN2* может быть экстраполирована на пациентов с одной или тремя копиями гена *SMN2*.

База данных по безопасности препарата Zolgensma® при рассмотрении европейским регуляторным органом на дату отсечения данных 31.12.2019 включала данные о 101 пациенте, получившем внутривенную инъекцию Zolgensma® в КИ, из которых 98 пациентов получили терапевтическую дозу препарата – $1,1 \times 10^{14}$ вг/кг. Двенадцать из этих 98 пациентов, были пролечены препаратом Zolgensma®, произведенным по ранее разработанному процессу. Таким образом, 86 пациентов получили препарат, изготовленный по коммерческой технологии, внутривенно в предлагаемой терапевтической дозе.

Дизайн КИ с одной группой лечения затрудняет определение того, связано ли неблагоприятное событие с лечением препаратом и сопутствующим применением кортикостероидов, с симптомами заболевания СМА 1 типа, его осложнениями или с естественными фоновыми детскими заболеваниями.

Были зарегистрированы следующие основные нежелательные явления (НЯ): общие реакции – повышение температуры тела; со стороны иммунной системы – иммунный ответ на капсид ААВ9; со стороны крови – тромбоцитопения; со стороны желудочно-кишечного тракта – рвота; со стороны печени – преимущественно в те-

чение двух недель после введения препарата повышение уровня трансаминаз, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, тропонина-I, в связи с чем необходимо проводить лечение на фоне приема преднизолона, используемого в КИ в дозе 1 мг/кг/сут [54].

В целом, база данных по безопасности ограничена и существует неопределенность в отношении потенциальной кардиотоксичности и токсичности для дорсальных корневых ганглиев (DRG), наблюдаемой в ДКИ. Оценка НЯ со стороны сердца затруднена в связи с тем, что СМА 1 типа сама по себе связана с сопутствующими заболеваниями сердца. Обнаружение воспаления DRG в ДКИ на приматах не подтверждено у людей. Кроме того, существует неопределенность в отношении безопасности препарата при долгосрочных КИ вследствие потенциальной канцерогенности, хотя риск считается низким, поскольку векторы ААВ в основном не интегрируются в геном хозяина. Для подтверждения этого необходимы данные долгосрочного наблюдения в течение 15 лет.

В КИ было зарегистрировано два случая смерти. Один пациент умер из-за дыхательной недостаточности, вероятно, связанной с проявлением СМА 1 типа, а не с введением препарата Zolgensma®. Причиной смерти второго пациента, скорее всего, было гипоксическое/ишемическое повреждение головного мозга из-за инфекции дыхательных путей, возникшей вследствие ИВЛ.

Выводы регуляторных органов по результатам экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения препарата Zolgensma® основывались на существующей неудовлетворенной медицинской потребности для лечения данного заболевания, преимуществе для пациентов при однократном введении препарата по сравнению с необходимостью повторного лечения нусинерсеном, а также на том, что с клинической точки зрения польза от немедленной доступности препарата для общественного здравоохранения перевешивает риски, связанные с тем фактом, что по-прежнему требуются дополнительные данные. Однако регуляторным органом ЕС было поставлено условие проведения заявителем оценки корреляции показателей качества готового препарата с клиническими данными и рассмотрение вопроса о том, насколько эффективен препарат в начале и конце срока годности, а также включение в перечень показателей контроля качества при выпуске показателя «расчетной дозы», вводимой пациенту (вг/кг, определенной на основе титра

вирусного вектора партии продукта на момент дозирования с учетом данных о стабильности)²⁵.

Заключение

Проведен анализ направлений и проблем разработки, проведения доклинических и клинических исследований препаратов генной терапии для лечения НДЗ, в результате которого показано, что к составлению программ ДКИ и КИ препаратов ГТ для НДЗ, как правило, применяется индивидуальный подход, учитывая разнообразие их проявлений, разную степень изученности и изменчивую патофизиологию.

Наиболее важными аспектами в ходе разработки дизайна ДКИ препаратов ГТ для НДЗ являются: выбор моделей животных с соответствующими НДЗ; включение в ДКИ более крупных животных (минипиги, приматы) наряду с грызунами, что позволяет представить дополнительные данные для экстраполяции дозы препарата для применения у человека и о его безопасности, а также оценить способ введения препаратов ГТ при использовании хирургических процедур и устройств доставки; особое внимание в ходе ДКИ препаратов ГТ для НДЗ уделяется выбору и применению нерутинных способов введения (в головной и спинной мозг) и обеспечению достаточной концентрации трансгена в органе-мишени при небольших объемах вводимого препарата.

На этапе КИ препаратов ГТ для НДЗ часто обоснованным является применение исторического контроля для сравнения (в случае сопоставимости популяций пациентов и контрольных показателей), особенно в случае редкого, серьезного НДЗ, отнесенного к заболеваниям с неудовлетворенной медицинской потребностью, для которого включение параллельного контроля не является практичным или этичным, а ожидаемый эффект лечения препаратом ГТ очевиден и сопоставим во времени с традиционным лечением. Исследование в КИ одной дозы препарата, определенной на этапе ДКИ и на основе данных литературы, допускается регуляторными органами, учитывая, что препараты ГТ предназначены преимущественно

для лечения жизнеугрожающих редких заболеваний с ограниченным количеством пациентов и, как правило, применяются однократно из-за возможного возникновения иммунного ответа. Важным аспектом в дизайне КИ таких препаратов при НДЗ является и выбор промежуточных, конечных точек эффективности и биомаркеров, в большинстве случаев для этого используются суррогатные конечные точки.

На примере препарата Zolgensma® (Novartis) для лечения детей со СМА 1 типа, получившего условное разрешение на продажу со стороны ЕМА, выделены установленные обязательства для заявителя относительно качества: разработка и внедрение дополнительных методов оценки качества, в частности, целостности векторного генома, содержания примесей, активности препарата, стабильности, оценки наличия/отсутствия эндогенных ретровирусов в банках клеток, используемых в производстве, и некоторые другие. В качестве особенностей представленных результатов ДКИ следует отметить, что выполнение исследований происходило при использовании разных серий препаратов, произведенных как по ранее разработанному процессу, так и по технологии производства для коммерческих целей. Требованием регуляторных органов при регистрации было продолжение изучения сопоставимости данных препаратов по эффективности в ДКИ и КИ. Что касается данных КИ, то заявителю необходимо завершить все КИ, которые не были закончены на момент рассмотрения регуляторными органами ЕС, и представить их результаты, в том числе и по долгосрочному наблюдению за пациентами.

Для Российской Федерации механизм условной регистрации лекарственных препаратов является новым, он стал доступен с марта 2022 г. в рамках нормативно-правовой базы ЕАЭС. Результат изучения зарубежного опыта экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma® (Novartis) в аспекте его условной регистрации может быть использован разработчиками в ходе вывода на рынок ЕАЭС лекарственных препаратов по процедуре условной регистрации.

Литература/References

1. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*. 2018;359(6372):eaan4672. <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
2. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Горенков ДВ, Хантимирова ЛМ, Гусева СГ, Меркулов ВА. Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов. *БИОпрепараты*.

²⁵ Assessment report, Zolgensma. EMA/200482/2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf
Summary Basis for Regulatory Action. Zolgensma. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

- Профилактика, диагностика, лечение. 2022;22(1):6–22.
Soldatov AA, Avdeeva ZI, Gorenkov DV, Khantimirova 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>
3. Ravi B, Chan-Cortés MH, Sumner CJ. Gene-targeting therapeutics for neurological disease: lessons learned from spinal muscular atrophy. *Annu Rev Med*. 2021;72:1–14.
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-070119-115459>
 4. Ямщикова НГ, Ставровская АВ, Иллариошкин СН. Некоторые аспекты развития нейродегенеративных заболеваний. *Асимметрия*. 2018;12(4):631–45. Yamshchikova NG, Stavrovskaya AV, Illarioshkin SN. Some aspects of the development of neurodegenerative diseases. *Journal of Asymmetry*. 2018;12(4):631–38 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18454/ASY.2018.12.4.030>
 5. Heemels MT. Neurodegenerative diseases. *Nature*. 2016;539(7628):179.
<https://doi.org/10.1038/539179a>
 6. Hudry E, Vandenberghe LH. Therapeutic AAV gene transfer to the nervous system: a clinical reality. *Neuron*. 2019;101(5):839–62.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.017>
 7. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(5):358–78.
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
 8. Lee JH, Wang JH, Chen J, Li F, Edwards TL, Hewitt AW, Liu GS. Gene therapy for visual loss: opportunities and concerns. *Prog Retin Eye Res*. 2019;68:31–53.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.08.003>
 9. Sun J, Roy S. Gene-based therapies for neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):297–311.
<https://doi.org/10.1038/s41593-020-00778-1>
 10. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020;578(7794):229–36.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
 11. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet*. 2000;1(2):91–9.
<https://doi.org/10.1038/35038533>
 12. Leone P, Shera D, McPhee SW, Francis JS, Kolodny EH, Bilaniuk LT, et al. Long-term follow-up after gene therapy for Canavan disease. *Sci Transl Med*. 2012;4(165):165ra163.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003454>
 13. Bedbrook CN, Deverman BE, Gradinaru V. Viral strategies for targeting the central and peripheral nervous systems. *Annu Rev Neurosci*. 2018;41:323–48.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-062048>
 14. Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, Kells AP, Bringas JR, Forsayeth J, Bankiewicz KS. Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*. 2013;24(5):526–32.
<https://doi.org/10.1089/hum.2013.005>
 15. Xiang C, Zhang Y, Guo W, Liang XJ. Biomimetic carbon nanotubes for neurological disease therapeutics as inherent medication. *Acta Pharm Sin B*. 2020;10(2):239–48.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.11.003>
 16. Katz ML, Tecedor L, Chen Y, Williamson BG, Lysenko E, Winingar FA, et al. AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Sci Transl Med*. 2015;7(313):313ra180.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac6191>
 17. Federici T, Taub JS, Baum GR, Gray SJ, Grieger JC, Matthews KA, et al. Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene Ther*. 2012;19(8):852–9.
<https://doi.org/10.1038/gt.2011.130>
 18. Sehara Y, Fujimoto KI, Ikeguchi K, Katakai Y, Ono F, Takino N, et al. Persistent expression of dopamine-synthesizing enzymes 15 years after gene transfer in a primate model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2017;28(2):74–9.
<https://doi.org/10.1089/humc.2017.010>
 19. Saraiva J, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. Gene therapy for the CNS using AAVs: the impact of systemic delivery by AAV9. *J Control Release*. 2016;241:94–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.011>
 20. Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S, Cartier N. Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS diseases. *Hum Gene Ther*. 2016;27(7):478–96.
<https://doi.org/10.1089/hum.2016.087>
 21. Van Dam D, De Deyn PP. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(11):956–70.
<https://doi.org/10.1038/nrd2075>
 22. Pype S, Moechars D, Dillen L, Mercken M. Characterization of amyloid β peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 2003;84(3):602–9.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01556.x>
 23. Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*. 2014;109(2) 73–86.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.05.017>
 24. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet*. 2004;13(2):159–70.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
 25. Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Savonenko AV, Wen JC, Jenkins NA, et al. Persistent amyloidosis following suppression of A β production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med*. 2005;2(12):e355.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020355>
 26. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein. *Neuron*. 2002;34(4):521–33.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00682-7)

27. Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, Byrne LC, Limsirichai P, Schaffer DV. *In vivo* genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci Adv*. 2017;3(12):eaar3952. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar3952>
28. Duan W, Guo M, Yi L, Liu Y, Li Z, Ma Y, et al. The deletion of mutant *SOD1* via CRISPR/Cas9/sgRNA prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Gene Ther*. 2020;27(3-4):157–69. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0116-1>
29. Lim CKW, Gapinske M, Brooks AK, Woods WS, Powell JE, Zeballos CMA, et al. Treatment of a mouse model of ALS by *in vivo* base editing. *Mol Ther*. 2020;28(4):1177–89. <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2020.01.005>
30. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*. 1996;87(3):493–506. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81369-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81369-0)
31. Ekman FK, Ojala DS, Adil MM, Lopez PA, Schaffer DV, Gaj T. CRISPR-Cas9-mediated genome editing increases lifespan and improves motor deficits in a Huntington's disease mouse model. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;17:829–39. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.009>
32. Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn*^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2000;9(3):333–9. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.333>
33. Passini MA, Bu J, Richards AM, Treleaven CM, Sullivan JA, O'Riordan CR, et al. Translational fidelity of intrathecal delivery of self-complementary AAV9-survival motor neuron 1 for spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther*. 2014;25(7):619–30. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.011>
34. Benkhelifa-Ziyyat S, Besse A, Roda M, Duque S, Astord S, Carcenac R, et al. Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice. *Mol Ther*. 2013;21(2):282–90. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.261>
35. Richardson RM, Gimenez F, Salegio EA, Su X, Bringas J, Berger MS, Bankiewicz KS. T2 imaging in monitoring of intraparenchymal real-time convection-enhanced delivery. *Neurosurgery*. 2011;69(1):154–63. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318217217e>
36. Miyanohara A, Kamizato K, Juhas S, Juhasova J, Navarro M, Marsala S, et al. Potent spinal parenchymal AAV9-mediated gene delivery by subpial injection in adult rats and pigs. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16046. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.46>
37. Morabito G, Giannelli SG, Ordazzo G, Bido S, Castoldi V, Indrigo M, et al. AAV-PHP.B-mediated global-scale expression in the mouse nervous system enables GBA1 gene therapy for wide protection from synucleinopathy. *Mol Ther*. 2017;25(12):2727–42. <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2017.08.004>
38. Coune PG, Schneider BL, Aebischer P. Parkinson's disease: gene therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4):a009431. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009431>
39. Bouscicault L, Alves S, Lamazière A, Planques A, Heck N, Moumné L, et al. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain*. 2016;139(Pt3):953–70. <https://doi.org/10.1093/brain/awv384>
40. Challis RC, Kumar SR, Chan KY, Challis C, Beadle K, Jang MJ, et al. Systemic AAV vectors for widespread and targeted gene delivery in rodents. *Nat Protoc*. 2019;14(2):379–414. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0097-3>
41. Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol*. 2016;34(2):204–9. <https://doi.org/10.1038/nbt.3440>
42. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther*. 2009;17(7):1187–96. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.71>
43. Xie C, Gong XM, Luo J, Li BL, Song BL. AAV9-NPC1 significantly ameliorates Purkinje cell death and behavioral abnormalities in mouse NPC disease. *J Lipid Res*. 2017;58(3):512–8. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071274>
44. Vogelbaum MA, Aghi MK. Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2015;17(Suppl_2):ii3–8. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou354>
45. Debinski W, Tatter SB. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*. 2009;9(10):1519–27. <https://doi.org/10.1586/ern.09.99>
46. Piguet F, Alves S, Cartier N. Clinical gene therapy for neurodegenerative diseases: past, present, and future. *Hum Gene Ther*. 2017;28(11):988–1003. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.160>
47. McFarthing K, Prakash N, Simuni T. Clinical trial highlights: 1. Gene therapy for Parkinson's, 2. Phase 3 study in focus – Intec Pharma's Accordion Pill, 3. Clinical trials resources. *J Parkinson's Dis*. 2019;9(2):251–64. <https://doi.org/10.3233/JPD-199001>
48. Smith BK, Collins SW, Conlon TJ, Mah CS, Lawson LA, Martin AD, et al. Phase I/II trial of adeno-associated virus-mediated alpha-glucosidase gene therapy to the diaphragm for chronic respiratory failure in Pompe disease: initial safety and ventilatory outcomes. *Hum Gene Ther*. 2013;24(6):630–40. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.250>
49. Rafii MS, Tuszynski MH, Thomas RG, Barba D, Brewer JB, Rissman RA, et al. Adeno-associated viral vector (serotype 2)-nerve growth factor for patients with Alzheimer disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol*. 2018;75(7):834–41. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0233>

50. Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, et al. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther.* 2008;19(5):463–74. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.022>
51. Fu H, Meadows AS, Pineda RJ, Kunkler KL, Truxal KV, McBride KL, et al. Differential prevalence of antibodies against adeno-associated virus in healthy children and patients with mucopolysaccharidosis III: perspective for AAV-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2017;28(4):187–96. <https://doi.org/10.1089/humc.2017.109>
52. 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>
53. Glanzman AM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJ, et al. The Children's Hospital of Philadelphia infant test of neuromuscular disorders (CHOP INTEND): test development and reliability. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(3):155–61. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.014>
54. Day JW, Mendell JR, Mercuri E, Finkel RS, Strauss KA, Kleyn A, et al. Clinical trial and postmarketing safety of onasemnogene abeparvovec therapy. *Drug Saf.* 2021;44(10):1109–19. <https://doi.org/10.1007/s40264-021-01107-6>
55. Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, Darras BT, et al. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STR1VE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(4):284–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00001-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00001-6)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Мельникова** – идея, концепция и дизайн исследования, анализ и обобщение результатов исследования по направлениям разработки генотерапевтических лекарственных препаратов в мире; **В.А. Меркулов** – интерпретация результатов исследования, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; **О.В. Меркулова** – анализ и обобщение данных о регистрации препарата Zolgensma® в ЕС и США.

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. В.А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Melnikova** elaborated the study idea, concept, and design, analysed and summarised the study results on global trends in the development of gene therapy products. **V.A. Merkulov** interpreted the study results and approved the final version of the manuscript for publication. **O.V. Merkulova** analysed and summarised data on Zolgensma® authorisation in the EU and the USA.

Acknowledgments. 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. V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
melnikovaEV@expmed.ru

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

Меркулова Ольга Владимировна, канд. мед. наук
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>
merkulova@expmed.ru

Поступила 09.06.2022

После доработки 23.01.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Online first 20.04.2023

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
melnikovaEV@expmed.ru

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

Olga V. Merkulova, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>
merkulova@expmed.ru

Received 9 June 2022

Revised 23 January 2023

Accepted 13 March 2023

Online first 20 April 2023