

Особенности проведения доклинических исследований препаратов клеточной терапии

*Е. В. МЕЛЬНИКОВА, М. Д. ХОРОЛЬСКИЙ, О. А. РАЧИНСКАЯ, В. А. МЕРКУЛОВ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ, Москва

Features of Preclinical Studies of Cell Therapy Products

*E. V. MELNIKOVA, M. D. KHOROLSKY, O. A. RACHINSKAYA, V. A. MERKULOV

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Доклинические исследования являются одним из важнейших этапов разработки препаратов для медицинского применения, в том числе препаратов клеточной терапии (в соответствии с законодательством Российской Федерации — биомедицинских клеточных продуктов), на основании результатов изучения специфической активности и безопасности которых регуляторные органы принимают решение о возможности проведения клинических исследований с целью вывода их на рынок. Национальные требования к проведению доклинических исследований препаратов клеточной терапии в целом соответствуют зарубежным, основным отличием является необходимость расширенной программы их проведения. В статье проанализированы аспекты доклинических исследований (объём, обоснование сокращённой программы, дизайн, используемые модели животных) некоторых препаратов клеточной терапии, разрешённых к применению в медицинской практике в США, Европейском союзе, Японии, Южной Корее.

Ключевые слова: клеточная терапия, биомедицинский клеточный продукт, доклинические исследования, фармакологические исследования, биораспределение, исследования токсичности, туморогенность.

Preclinical studies are one of the most important stages in the development of drugs for medical use, including cell therapy products (in accordance with the legislation of the Russian Federation — biomedical cell products). Regulatory authorities decide on the possibility of conducting clinical trials in order to bring the medications to the market on the basis of the results of the study of their specific activity and safety. Russian requirements for preclinical studies of cell therapy products generally correspond to foreign ones, the main difference is the need for an expanded program of their conduct. The article analyzes the aspects of preclinical studies (scope, justification of the reduced program, design, animal models used) of some cell therapy products approved for use in medical practice in the United States, the European Union, Japan, and South Korea.

Keywords: cell therapy, biomedical cell product, preclinical studies, pharmacological studies, biodistribution, toxicity studies, tumorigenicity.

Введение

В настоящее время развитие клеточных и генетических технологий является одним из приоритетных направлений развития медицины в мире и объектом для внимания со стороны государства, регуляторных органов и международных организаций. Вывод на рынок препаратов клеточной терапии (в том числе на основе генетически модифицированных клеток) предполагает поэтапную их разработку и обязательную оценку эффективности и безопасности в доклинических и клинических исследованиях. В России, в отличие от стран Европейского союза (ЕС), США, Японии, Южной Кореи, на сегодняшний день отсутствуют препараты клеточной терапии (в соответствии с национальным законодательством — биомедицинские клеточные продукты,

БМКП [1]), разрешённые к применению в медицинской практике, а также опыт по рассмотрению результатов их доклинических исследований (ДКИ). Требования к проведению ДКИ БМКП регламентированы Правилами надлежащей практики по работе с БМКП, утверждёнными приказом Минздрава России № 512н от 8 августа 2018 г. (далее Правила) [2]. Что касается других стран, необходимо отметить, что в открытых источниках информации доступны требования к проведению ДКИ препаратов клеточной терапии только регуляторных органов ЕС и США (ЕМА и FDA, соответственно).

Требования регуляторных органов к проведению доклинических исследований: Европейский союз и США

До недавнего времени основными Руководствами, регламентирующими требования к ДКИ препаратов на основе клеток и тканей человека в

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: e-mail: MelnikovaEV@expmed.ru

странах Евросоюза и США, были Руководство по лекарственным препаратам на основе клеток (Guideline on human cell-based medicinal products) [3] и Руководство для отрасли «Доклиническая оценка экспериментальных препаратов для клеточной и генной терапии» (Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Product) [4], в соответствии с которыми этапы проведения ДКИ включают предварительные исследования (исследования *in vitro*, пилотные исследования *in vivo*, фармакологические исследования по подтверждению концепции) и итоговые (фармакодинамика, фармакокинетика/биораспределение, токсикологические исследования).

Однако в последнее время со стороны ЕМА и FDA наблюдается тенденция уточнения общих требований к проведению ДКИ с учётом накопленного опыта разработки и регистрации таких препаратов. Так, например, в 2019 г. в ЕМА активно обсуждались «Руководство по качеству, доклиническим и клиническим данным, требующимся для проведения клинических исследований препаратов передовой терапии» (Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials) и «Руководство по качеству, доклиническим и клиническим аспектам лекарственных препаратов, содержащих генетически модифицированные клетки» (Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells) [5, 6], которые включают следующие аспекты проведения ДКИ, отсутствующие в российской нормативной базе по БМКП:

1. Для определения достаточного объёма и продолжительности ДКИ должен применяться риск-ориентированный подход, включающий риски, связанные с самим препаратом, накопленными научными знаниями и клиническим опытом применения аналогичных типов продуктов. В случае, когда риски, связанные с клиническим использованием продукта, хорошо понятны и известны из предыдущего клинического опыта работы с соответствующими продуктами, программа ДКИ может быть адаптирована соответственно при условии, что риски являются управляемыми.

2. Степень и продолжительность воздействия препарата на организм существенно влияют на ожидаемые риски, связанные с его клиническим использованием. Например, если продукт предназначен для местного использования, то потребность в оценке системных эффектов довольно низка. Аналогично, если продукт сохраняется в организме короткое время, и не будет вызывать долгосрочных эффектов, продолжительность ДКИ безопасности может быть сокращена.

3. Потребность в исследованиях биораспределения зависит от пути введения и места дейст-

вия препарата. При системном введении данные о биораспределении необходимы. Потенциал распределения клеток считается ограниченным, если клетки структурно или физически содержатся, то есть производятся, на матрице или скаффолдах или применяются в ограниченном пространстве, закрытом, например, мембраной для предотвращения распределения клеток. В таких случаях данные о биологическом распределении могут не потребоваться. Структурная целостность «конструкции» препарата в месте его введения должна быть продемонстрирована для подтверждения отсутствия нецелевого попадания клеток [3, 5].

4. В ходе подтверждения безопасности препаратов клеточной терапии в ДКИ стандартные исследования канцерогенности на грызунах в течение их жизни, как правило, не требуется. Требование по определению риска возникновения опухолей подразумевает определение туморогенного потенциала клеточной линии, входящей в состав препарата, причём необходимо обратить внимание, что такие исследования чаще всего ограничиваются определением кариотипа, генетической стабильности и пролиферативного потенциала.

5. Данные ДКИ, которые могут быть предоставлены на более поздних стадиях разработки препаратов клеточной терапии в соответствии с Руководством [5]:

— долгосрочные данные по безопасности могут быть предоставлены для поддержки проведения последующих фаз КИ для препаратов, которые, как ожидается, сохраняются в организме в течение длительного периода времени, промежуточные или краткосрочные данные безопасности могут быть использованы для разрешения на первое применение в КИ;

— данные по токсичности повторных доз: клиническое исследование с многократным введением препарата может быть начато без ДКИ токсичности повторных доз при условии, что такие данные будут доступны прежде, чем человеку будет введена вторая доза (когда интервал дозирования очень велик или когда доказано выведение препарата из организма до следующего введения);

— окончательные данные по миграции или распределению по целевым и нецелевым органам, и долгосрочной персистенции могут быть представлены до применения препарата у большого числа пациентов;

— в некоторых случаях долгосрочные данные по туморогенности могут быть предоставлены перед использованием препарата у большого числа пациентов;

— оценка иммуногенности, если она не получена из предыдущих исследований подтверждения концепции или безопасности, может быть предоставлена на более поздних этапах;

— исследование репродуктивной токсичности, если ожидается воздействие на репродуктивную функцию и/или развитие, может быть представлено перед использованием препарата у большого числа пациентов.

Что касается проведения ДКИ препаратов клеточной терапии (БМКП) в соответствии с российским законодательством, то общие принципы проведения ДКИ соответствуют требованиям зарубежных руководств. Однако необходимо обратить внимание, что значительными отличиями национальных требований являются:

— отсутствие возможности замены ДКИ результатами клинического опыта с этим или аналогичным препаратом;

— невозможность поэтапного представления тех или иных данных ДКИ (в частности, исследования онкогенности исключают проведение краткосрочных тестов и должны быть предоставлены до проведения клинических исследований);

— сокращение программы ДКИ предусмотрено только в отдельных случаях для определённых типов БМКП (например, исследования онкогенности БМКП не проводятся только для препаратов, предназначенных для терапии местнораспространённых и метастатических злокачественных опухолей), в остальных случаях должен быть проведён предусмотренный Правилами объём ДКИ [2].

Опыт проведения доклинических исследований препаратов клеточной терапии, разрешённых к применению в разных странах мира

При проведении анализа ДКИ препаратов клеточной терапии, разрешённых к применению в разных странах мира, была использована нормативная документация на разрешённые к медицинскому применению препараты, находящаяся на официальных сайтах регуляторных органов стран США, ЕС, Японии. Особое внимание было уделено дизайну и объёму проведённых ДКИ, виду моделей животных, обоснованию отсутствия тех или иных исследований, на основе которых препарат получил разрешение на проведение клинических исследований.

Доклинические исследования препаратов клеточной терапии, содержащих генетически модифицированные клетки

1. Препараты на основе Т-лимфоцитов, несущих химерные антигенные рецепторы (*Chimeric Antigen Receptors, CAR*): KYMRIAH (Novartis, ЕС, США) и Yescarta (Kite Pharma, Gilead, ЕС, США)

Препараты KYMRIAH и Yescarta представляют собой генетически модифицированные Т-клетки, в геном которых с помощью вирусных векторов введён ген, кодирующий CAR к CD19 (CD19 CAR

Т-клетки); предназначены для лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ).

Анализ документов на препарат KYMRIAH, находящихся на сайтах регуляторных органов США и ЕС, показал значительные отличия в объёме представленных данных ДКИ в заявках на регистрацию в FDA и ЕМА, в частности в заявке в FDA, представлен лишь перечень проведённых ДКИ с указанием кратких результатов (рис. 1) [7, 8]. В документах на препарат KYMRIAH, представленных на государственную регистрацию в ЕМА [9], помимо развёрнутого перечня и результатов проведённых ДКИ, содержится подробное описание разработки препарата: выбор промотора в конструкции для экспрессии химерного антигенного рецептора, костимулирующего домена, обуславливающего эффективность цитопатического эффекта, изучение профиля секретируемых цитокинов CAR CD4 и CD8 Т-клеток после стимуляции опухолевыми клетками [10]. В целом были представлены следующие результаты ДКИ препарата KYMRIAH, полученные *in vivo* на моделях животных:

1) Исследования по оптимизации дозы: все типы CD19 CAR Т-клеток (с различными исследуемыми костимуляторными доменами) показали высокую противолейкозную активность при дозе 2×10^6 CD19 CAR Т-клеток, которые были введены через две недели после индукции острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у мышей.

2) Фармакокинетические исследования (биораспределение) проводили на иммунодефицитных мышах линии NOG (4 мыши/группа) после индукции ОЛЛ. Через три недели были введены CD19 CAR Т-клетки в дозах 1×10^6 , 5×10^6 или 20×10^6 клеток/кг.

Плановые умерщвления животных проводились на 42-е и 56-е сутки исследования (через 21 и 35 сут после введения Т-клеток). В последующие моменты времени животных выводили из эксперимента при необходимости или на 217-е сутки исследования. Через 21 и 35 сут после введения, CD19 CAR Т-клетки были обнаружены в селезёнке, лёгких и почках у всех животных, которым вводили 20×10^6 клеток/кг, за исключением образца почки у одного животного (35 сут после дозы). В костном мозге CD19 CAR Т-клетки были обнаружены у всех животных на 35-е сутки после введения. При более низких дозах 5×10^6 и 1×10^6 клеток/кг Т-клетки были обнаружены в редких случаях и только в лёгких. На 217-е сутки исследования CD19 CAR Т-клетки были обнаружены в селезёнке, почках и костном мозге одного животного, которому вводили дозу 5×10^6 клеток/кг.

3) Исследования токсичности введения однократной дозы, многократных доз, канцерогенности, репродуктивной токсичности не проводились.

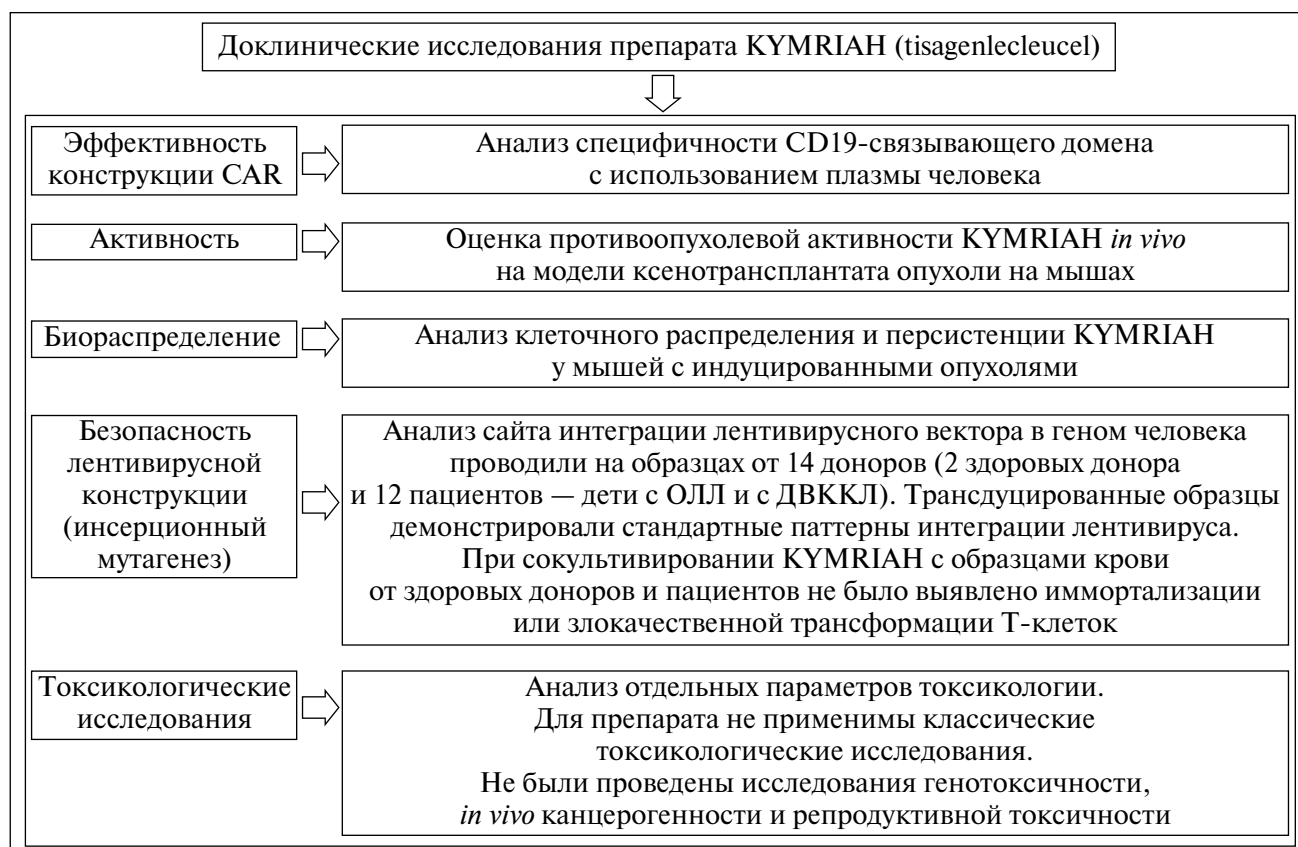


Рис. 1. Дизайн доклинического исследования препарата KYMRIAH [7, 8].

Отсутствие исследований токсичности однократной дозы считается приемлемым, так как препарат является персонализированным (аутологичным) продуктом. Отсутствие исследований токсичности повторной дозы считается допустимым на основе того факта, что препарат будет вводиться в виде одной инфузии.

Стандартные исследования генотоксичности и канцерогенности на грызунах не подходят для оценки риска инсерционного мутагенеза для генетически модифицированных продуктов клеточной терапии. Альтернативных адекватных моделей животных не существует. Потенциальный риск инсерционного мутагенеза, приводящий к возможности развития вторичных злокачественных новообразований, оценивали путём анализа сайта интеграции лентивируса на образцах препарата KYMRIAH от 6 детей больных ОЛЛ (КИ CCTL019B2202), 6 пациентов с ДВККЛ (КИ CCTL019C2201) и 2 здоровых добровольцев. В целом, наблюдалась интеграция в привычные для лентивируса сайты [11, 12].

В лабораторных исследованиях сокультивирование CD19 CAR Т-клеток с клетками от здоровых доноров и пациентов показало отсутствие преобразования и/или иммортализации Т-клеток. Исследования *in vivo* у иммунодефицитных мышей продемонстрировали отсутствие признаков аномального роста клеток или возник-

новения клональности клеток в течение периода до 7 месяцев, что представляет собой самый длинный значимый период наблюдения для иммунокомпрометированных моделей мыши.

4) Отсутствие клинических эффектов, связанных с перекрёстной реактивностью на цели, отличные от CD19, было показано при проведении иммуногистохимии, гибридизации *in situ* и ОТ-ПЦР на тканях ЦНС человека и обезьян *Cynomolgus* (исследования компании Novartis 1420055 и 1420059).

При рассмотрении отчёта о ДКИ экспертами ЕМА было признано приемлемым отсутствие соответствия токсикологических исследований правилам GLP ввиду того, что стандартные исследования токсичности однократной или повторных доз не могут быть выполнены из-за отсутствия релевантной модели животных. Кроме того, необходимо обратить внимание, что доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* препарата KYMRIAH проводились с использованием опухолевых клеток от пациентов с ОЛЛ, но не с ДВККЛ. Отсутствие доклинических фармакологических исследований с клетками от пациентов с ДВККЛ считается приемлемым, исходя из клинического опыта с этим показанием.

Второй препарат на основе химерных антигенных рецепторов, разрешённый к применению в медицинской практике в США и ЕС — Yescarta

(Kite) по эффективности трансдукции и производственным характеристикам (скорость роста клеток, жизнеспособность, профиль секретируемых факторов) соответствует продукту KTE-C19, разработанному ранее в Национальном институте рака (NCI), США [13]. В ходе научных консультаций с FDA и EMA было решено, что доклинические исследования, проведённые с помощью CD19 CAR T-клеток, изготовленных в NCI, не должны повторяться компанией Kite при условии доказательства сопоставимости продуктов и процессов производства.

Заявитель представил *in vitro* и *in vivo* данные доклинической фармакологии для KTE-C19. Для *in vitro* оценки специфической активности против CD19 клеток-мишеней заявитель использовал CD19 CAR T-клетки от пациентов, которые были зарегистрированы в КИ, проведённых NCI. Специфичность и активность CD19 CAR T-клеток оценивали методом ELISA по их способности продуцировать IFN- γ при сокультивировании с CD19-положительными или CD19-негативными клетками-мишенями. Характеристику, специфичность и цитотоксическое действие T-клеток, трансдуцированных конструкцией с CAR, оценивали на клетках хронического миелоидного лейкоза K562. Исследования по характеристике CD19 CAR T-клеток включали анализ трансдукции и фенотипа, специфичности и биологической активности аутологичных CD19 CAR T-клеток, полученных от 15 пациентов с неходжкинскими лимфомами в NCI. CD19 CAR T-клетки продуцировали IFN- γ при сокультивировании с клеточной линией CD19-K562, экспрессирующей CD19 [14], а также 17 цитокинов (IL-2, IL-6, IL-13, фактор некроза опухоли- α (TNF- α), гранулоцитарный макрофагально-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , растворимый CD137, макрофагальные белки воспаления (MIP)-1 α и MIP-1 β , гранзим А, гранзим В, растворимый Fas-лиганд (sFASL), растворимый FAS (рецептор для sFASL) и перфорин), что свидетельствует о том, что CD19 CAR T-клетки от всех доноров показывают CD19-зависимую активацию и секрецию разнообразных биологических факторов в ответ на стимуляцию химерными антигенными рецепторами.

Доклинические исследования KTE-C19 были проведены при использовании гомологичного препарата мыши (в конструкции CAR человека домен scFv был заменён на домен из 1D3 mAb мыши, узнающий мышиный CD19) на иммунокомпетентных мышях. Мышиные CD19 CAR T-клетки были введены сингенным мышам с индуцированной лимфомой для исследования их противоопухолевого эффекта. Кроме того, гомологичная модель препарата была исследована *in vitro* на активацию секреции цитокинов при со-

культивировании с клетками, секретирующими и не секретирующими CD19.

Специфическую активность определяли по способности CD19 CAR T-клеток как предотвращать, так и элиминировать развитие лимфомы (в том числе метастазирование): введение сингенным мышам гомологичного препарата как с профилактической, так и с терапевтической целью приводило к длительному выживанию мышей по сравнению с контролем, где животные быстро погибали от развития лимфомы.

В ходе фармакокинетических исследований изучение абсорбции не проводилось. Биораспределение изучали с использованием гомологичного препарата у сингенных мышей с лимфомой методом проточной цитометрии. Мышиные CD19 CAR T-клетки обнаруживались в селезёнке через 8 сут, но не позднее 63 сут после применения препарата [15]. Таким образом, персистентность CD19 CAR T-клеток может быть продемонстрирована только в течение короткого промежутка времени, несмотря на продолжительный противоопухолевый эффект и гибель В-клеток до 209 сут (последний исследованный момент времени). Наличие CD19 CAR T-клеток мыши в селезёнке подтверждено в течение 8–63 сут после инфузии. Других доклинических фармакокинетических исследований не проводилось.

Токсикологические исследования при однократном введении заявителем не проводились из-за отсутствия соответствующей модели животного. Исследования влияния на здоровые В-клетки гомологичного препарата были совмещены с фармакологическими исследованиями на сингенных мышах, в результате которых наблюдалось длительное истощение нормальных В-клеток. Обнаружение токсических эффектов как при использовании гомологичного препарата, так и человеческого препарата затруднено из-за следующих ограничений: препараты могут демонстрировать различное нецелевое (off-target) распознавание других антигенов из-за различных доменов scFvs; использование человеческого препарата на иммунодефицитных мышах ограничено из-за потенциальных различий в перекрёстном распознавании несвязанных антигенов, различий в паттернах экспрессии антигенов и различий в выживании *in vivo*.

Исследования генотоксичности, канцерогенности, репродуктивной токсичности и других видов токсичности не проводились. Данные литературы свидетельствуют о низкой вероятности инсерционного мутагенеза ретровирусных векторов, используемых в препарате. Исследования репродуктивной токсичности не проводились из-за отсутствия моделей животных, однако риск признан минимальным в соответствии с Ру-

ководством по доклинической оценке возможности случайной передачи зародышевой линии векторов переноса генов [16].

Исследование побочных эффектов, связанных с неконтролируемой пролиферацией Т-клеток, синдромом лизиса опухолевых клеток, синдромом высвобождения цитокинов и синдромом активации макрофагов не может быть проведено в ДКИ, так как такая ожидаемая токсичность в значительной степени будет зависеть от индивидуальных особенностей пациента, например, от степени опухолевой нагрузки.

Таким образом, в результате анализа ДКИ препаратов на основе химерных антигенных рецепторов, разрешённых к применению в мире, можно сделать следующие выводы:

1) В качестве препарата при оценке специфической активности и биораспределения может быть использован как целевой препарат (предназначенный для применения пациентам, например, KYMRIH) на иммунодефицитных мышах, так и гомологичная модель препарата (в случае с препаратом Yescarta) на иммунокомпетентных животных. Преимуществами использования в ДКИ гомологичного препарата является отсутствие неспецифических ксеногенных иммунных реакций на клетки человека у мышей или отсутствие сложных взаимодействий CD19 CAR Т-клеток с другими компонентами иммунной системы животного. Недостатками гомологичной модели препарата на основе химерных антигенных рецепторов являются отличия от препарата человека аффинность домена scFv, получение трансдуцированных клеток, состав популяций Т-клеток, различия в паттернах экспрессии антигенов и различия в выживании *in vivo*.

2) ДКИ препаратов включали исследования *in vitro*: анализ специфичности CD19-связывающего домена с использованием плазмы человека; изучение профиля секретируемых цитокинов CAR-Т клеток после стимуляции опухолевыми клетками.

3) ДКИ препаратов включали исследования *in vivo* (на мышах):

- исследования по оптимизации дозы;
- специфическая (противоопухолевая) активность (по способности анти-CD19 CAR-Т клеток как предотвращать, так и элиминировать развитие лимфомы (в том числе метастазирование));
- фармакокинетические исследования (биораспределение);
- стандартные исследования токсичности однократной или многократных доз не были выполнены вследствие аутологичного однократного применения препаратов.

4) Потенциальный риск инсерционного мутагенеза оценивали при сокультивировании

CAR+ Т-клеток с клетками от здоровых доноров и пациентов. Риск трансформации и/или иммортизации Т-клеток выявлен не был.

2. Препараты на основе генетически модифицированных гематопозитических стволовых клеток, трансдуцированных вирусным вектором с целевым геном: Strimvelis (GSK, EC) и Zynteglo (bluebird bio, EC)

В ходе ДКИ препарата Strimvelis на основе генетически модифицированных клеток (CD34+ клетки, трансдуцированные ретровирусным вектором GSK3336223, несущим ген фермента адеинозиндезаминазы, ADA) для лечения тяжёлого комбинированного иммунодефицита, связанного с недостатком фермента ADA, были проведены фармакологические исследования *in vitro* по оценке уровня экспрессии целевого гена и активности фермента ADA. Культуральную среду с вектором GSK3336223 тестировали на способность трансфицировать ген ADA в прогениторные клетки ADA-негативных мышей, в результате чего была подтверждена активность фермента ADA в трансдуцированных клетках через неделю после трансдукции (15–36% от нормального уровня ADA в клетках костного мозга) [17].

Исследования специфической активности *in vivo* были проведены на моделях с использованием новорождённых иммунодефицитных мышей, характеризующихся отсутствием В-, Т- и NK-клеток. Мышам вводились CD34+ клетки из костного мозга (КМ) пациентов с недостатком ADA, трансдуцированные вектором, несущим ген фермента. Показано, что трансдуцированные клетки проникали в КМ животных и дифференцировались в Т- (CD4+ и CD8+) или В- (CD19+) лимфоциты в органах иммунной системы (тимусе, КМ, селезёнке), а также циркулировали в периферической крови. Вторичные фармакодинамические исследования не проводились из-за невозможности установления корреляционной связи результатов исследований на животных моделях с ожидаемыми результатами от введения препарата человеку. Исследования токсичности однократной и многократных доз, а также генотоксичности не проводились. Общая токсичность была оценена в исследовании биораспределения на мышах. В ходе рассмотрения отчёта о ДКИ ЕМА был признан риск инсерционного мутагенеза, однако отсутствие моделей животных для длительного приживания трансдуцированных клеток (более 6 мес.) затрудняет его оценку. В качестве доказательства безопасности препарата были учтены результаты клинического опыта его применения: ни у одного из 18 пациентов (срок наблюдения от 6 до 13 лет), получавших препарат, не наблюдалось появления злокачественных новообразований [17].

Препарат Zynteglo представляет собой CD34+ клетки, генетически модифицированные

лентивирусным вектором, экспрессирующим ген β A-T87Q-глобина, и предназначен для лечения β -талассемии. В ходе ДКИ *in vivo* Zynteglo были использованы следующие модели [18]:

- гомологичный препарат на основе клеток КМ мышей с заболеванием (β -талассемией), трансдуцированных лентивирусным вектором BB305 (используется при производстве препарата) на иммунокомпетентных мышках с β -талассемией;
- препарат на основе клеток КМ здоровых доноров, трансдуцированных лентивирусным вектором BB305 на иммунодефицитных мышках SCID NOD (NSG).

ДКИ препарата Zynteglo включали: *in vitro* исследования по доказательству концепции (эффективность трансдукции), туморогенности и генотоксичности, *in vivo* фармакологические исследования и биораспределение. Исследования токсичности однократной дозы и местной токсичности были совмещены с фармакологическими исследованиями, никаких токсических эффектов в исследованных дозах (11×10^6 , 240×10^6 клеток/кг для гомологичного препарата и 42×10^6 , 50×10^6 клеток/кг для препарата на основе клеток человека) и реакций в месте введения не наблюдалось.

В ходе ДКИ препарата не проводились:

- исследования вторичной фармакодинамики, что считается приемлемым, поскольку вторичные фармакодинамические эффекты препарата (нормализация содержания β -глобина, уровня общего гемоглобина и гематологических параметров, коррекция фенотипа) оценивали в основных фармакологических исследованиях на модели заболевания у мышей;
- исследования фармакологической безопасности, что считается приемлемым, поскольку ни в одном исследовании *in vivo* не было выявлено неблагоприятных воздействий на кровеносную, дыхательную, нервную или пищеварительную системы;
- долгосрочные исследования канцерогенности, поскольку препарат относится к препаратам передовой терапии, для которых данные исследования перед первым применением у человека не требуются;
- исследования репродуктивной токсичности из-за наличия противопоказания применения препарата беременным женщинам;
- исследования токсичности многократных доз в связи с однократным применением препарата;
- исследования иммунотоксичности и иммуногенности. Иммуногенность β A-T87Q-глобина отсутствует, пациенты во время лечения получают иммуносупрессивные препараты (кондиционирование бусульфаном), а применение препарата предполагает однократное введение.

При использовании гомологичного препарата

для определения специфической активности было выявлено, что у 92% животных, которым был применён препарат при внутривенном введении, приживление донорских клеток составило более 80%. При исследовании биораспределения как гомологичного препарата, так и препарата на основе клеток человека, было показано наличие генетически модифицированных клеток в КМ и периферической крови и их отсутствие в селезёнке, тимусе и лимфатических узлах.

Мутагенный и туморогенный потенциал, а также генотоксичность препарата Zynteglo были исследованы *in vitro*. Последовательности лентивируса были обнаружены внутри или рядом с шестью генами, которые не связаны с индукцией злокачественных новообразований. В качестве дополнительных сведений об отсутствии туморогенного потенциала, были представлены сведения о 10 пациентах, пролеченных препаратом, у которых отсутствовали до настоящего времени клональные перестройки в хромосомах и злокачественные новообразования.

В ходе исследований генотоксичности гомологичного препарата *in vivo* на мышках через 4 и 6 мес. после введения препарата не было выявлено также признаков клональности или наличия опухолевого роста [18].

Таким образом, в результате анализа ДКИ препаратов для лечения генетических заболеваний Strimvelis и Zynteglo можно сделать следующие выводы:

1) ДКИ препаратов на основе генетически модифицированных гематопоетических стволовых клеток, трансдуцированных вирусным вектором с целевым геном, содержат широкий перечень исследований. Для этой группы препаратов являются актуальными доказательства эффективности трансдукции вирусным вектором и исследования генотоксичности (проведено для Zynteglo).

2) Исследования осуществлялись с использованием как гомологичных препаратов на иммунокомпромиссных животных, так и целевого клинического продукта на иммунодефицитных грызунах. При этом большое значение имели *in vitro* модели, особенно в случае доказательства специфической активности препарата.

3) В связи с тем, что подобные препараты предназначены для лечения заболеваний, отнесенных к «необеспеченной медицинской потребности», ряд ДКИ был заменен данными КИ.

Доклинические исследования препаратов клеточной терапии, содержащих дифференцированные клетки

1. Препараты клеточной терапии на основе хондроцитов для лечения дефектов хряща коленного сустава: MACI (Vericel Corporation, США) и Spherex (Co.don AG, EC)

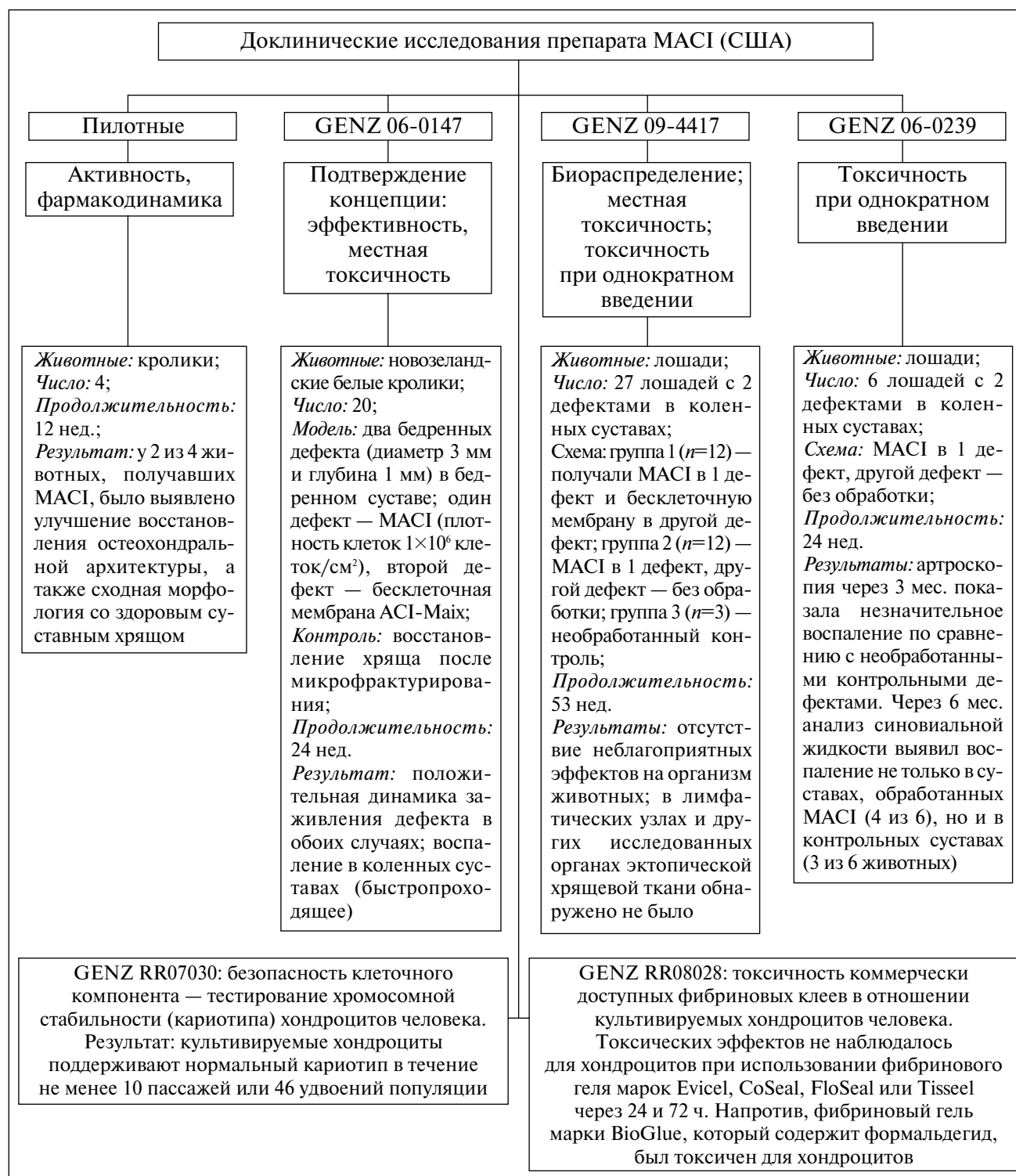


Рис. 2. Дизайн доклинических исследований препарата MACI (США)

Препарат MACI представляет собой аутологичные хондроциты на свиной коллагеновой мембране с плотностью от 5×10^5 до 1×10^6 клеток на см²/мембраны, которая в ходе имплантации фиксируется с помощью фибринового клея. Форма и размер импланта может корректироваться в ходе процедуры применения.

В ходе ДКИ MACI использовались гомологичные препараты на основе хондроцитов, полу-

ченных от животных [19]. Дизайн ДКИ представлен на рис. 2.

При проведении ДКИ препарата MACI были проведены не только исследования конечного продукта (клетки на коллагеновой мембране), но и исследовались возможные токсические эффекты самого носителя (мембраны) и средства фиксации (фибринового геля разных марок) на хондроциты [19].

В виду локальности действия МАСІ классические фармакокинетические исследования не проводились. МАСІ предназначен для однократной имплантации в колено. Таким образом, в соответствии с руководством по продуктам на основе клеток человека исследования токсичности при повторных дозах считаются нецелесообразными [3]. Исследования генотоксичности не проводились, поскольку клетки в составе МАСІ не взаимодействуют непосредственно с геномом клеток реципиента.

Препарат Spherox представляет собой трёхмерные сфероиды хондроцитов [20]. Сравнительный анализ хондроцитов от разных видов животных показал, что только клетки ограниченного числа животных, включая карликовых свиней и овец, были способны производить стабильные сфероиды, что и обусловило их использование в качестве моделей в ДКИ.

Биораспределение оценивали в соответствии с документами ЕМА [3, 21] с использованием иммунодефицитных мышей линии NSG и препарата, предназначенного для человека, имплантированного подкожно в спину в течение четырёх недель. Кроме того, при долгосрочном наблюдении не было выявлено никаких признаков системного распределения клеток, образования опухоли или эктопической ткани через 6 мес. в печени, лимфатических узлах, лёгких, селезёнке и почках. При оценке биораспределения на овцах (3 животных) имплантацию флуоресцентно меченых сфероидов проводили в один коленный сустав, а для оценки адгезии клеток в контрлатеральный сустав осуществляли инъекцию немеченых сфероидов. Это исследование показало, что сфероиды сохраняются в суставе. Однако в исследовании было задействовано небольшое количество животных и применялись аллогенные клетки, иммунный ответ на которые может ограничивать потенциал биораспределения клеток сфероидов.

Исследования фармакологического действия и вторичной фармакодинамики не проводили, учитывая, что продукт состоит из аутологичных хондроцитов, которые имплантируются локально — в их естественную среду, также клетки не выделяют никаких веществ, которые могли бы повлиять на жизненно важные функции органов.

Традиционные токсикологические исследования препарата не проводились, учитывая то, что продукт является аутологичным, а его производство происходит без использования факторов роста или других внешних стимулов, которые требуют проверки безопасности.

2. *Препараты клеточной терапии на основе кератиноцитов: Gintuit (Organogenesis Incorporated, США) и JACE (Japan Tissue Engineering Co., Ltd. (J-TEC), Япония)*

Препарат Gintuit (Allogeneic Cultured Keratinocytes and Fibroblasts in Bovine Collagen)

(Organogenesis), представляющий собой пластинку округлой формы, содержащую 4×10^6 аллогенных кератиноцитов и фибробластов, белков внеклеточного матрикса и бычьего коллагена. Gintuit применяется в стоматологии для восстановления дефектов слизистой оболочки десны за счёт продуцирования кератиноцитами и фибробластами различных факторов роста, цитокинов и белков внеклеточного матрикса [22]. Разрешён к применению в 2010 г., является аналогом препарата Apligraf, предназначенным для лечения диабетических язв стопы и применяющимся в клинической практике с 1998 г. [23]. Поэтому фармакокинетические исследования, исследования острой и хронической токсичности, генотоксичности, канцерогенности, репродуктивной токсичности и иммунотоксичности не проводились в связи с природой Gintuit и обширным клиническим опытом Apligraf. Однако, учитывая разные показания к применению препаратов, в отчёте о ДКИ Gintuit представлены данные проведённых исследований совместимости клеточного компонента с материалами, используемыми в стоматологии (например, Barricaid и Сое-РакТМ, раствором для полоскания — 0,12% раствор хлоргексидина).

Тестирование на биосовместимость клеточного и неклеточного компонентов препарата включало: тесты на общую безопасность, цитотоксичность, сенсибилизацию, реактивность/раздражение при внутривенном введении, системную токсичность (острая и подострая), субхроническую токсичность и гемосовместимость. Тестирование биосовместимости не выявило каких-либо значительных проблем безопасности [23].

ДКИ препарата JACE (аутотрансплантат на основе кератиноцитов, полученный по методике Грина) включали преимущественно *in vitro* тесты и ограниченные исследования *in vivo*:

- кариологический анализ образцов кератиноцитов на 1 и 5 пассажах хромосомных нарушений не выявил, в одном случае была выявлена хромосомная аномалия (транслокация) у клеток на 5 пассаже;

- тест колониеобразования в жидком агаре не выявил злокачественной трансформации клеток;

- пролиферативная активность была оценена на разных этапах процесса производства препарата для двух пациентов КИ;

- оценка туморогенности *in vivo*: при инокуляции иммунодефицитных мышей тремя образцами кератиноцитов образования опухолей не наблюдалось [24].

3. *Доклинические исследования препарата на основе миобластов — Heartsheet (Terumo Corporation, Япония)*

Препарат Heartsheet предназначен для лечения острой сердечной недостаточности. В ДКИ на модели карликовых свиней было показано,

что клеточный слой скелетных миобластов улучшает систолическую функцию левого желудочка. ДКИ включали: исследование системной токсичности и туморогенности на мышах линии NOG, анализ кариотипа и анализ колоний в жидком агаре [25]. В исследовании эффективности на модели сердечной недостаточности у карликовых свиней оценивали риск желудочковой аритмии после применения препарата. Миобласты ($1,2 \times 10^6$ клеток/животное, 6×10^7 клеток/кг) трансплантировали в количестве, в 10 раз превышающем клиническую дозу (6×10^6 клеток/кг), на поверхность сердца самцов и самок мышей линии NOG. В качестве контроля использовали группу ложнооперированных животных и группу без лечения.

Исследования туморогенности проводили на 6 самцах мышей линии NOG при подкожном введении ($3,0 \times 10^7$ клеток/животное, $1,5 \times 10^9$ клеток/кг). Через 3 мес. после трансплантации гистологическое исследование не выявило опухолевых образований в месте трансплантации, лёгких, печени, почках или селезёнке. Также был проведён анализ кариотипов культивируемых линий для выявления признаков генетической нестабильности.

Таким образом, в результате анализа ДКИ препаратов, основанных на использовании дифференцированных клеток, разрешённых к применению в мире, можно сделать следующие выводы:

1) Для проведения ДКИ препаратов, содержащих дифференцированные клетки, использовались как *in vitro*, так и *in vivo* модели, включавшие иммунокомпетентных животных для исследования целевого клинического продукта и иммунокомпромиссных животных для исследования гомологичного продукта. Исследования препаратов Spherex и Heartsheet проводились на животных нескольких видов.

2) Для подтверждения безопасности препарата проводились разносторонние исследования как на *in vitro* моделях, так и на животных. Несмотря на достаточно подтверждённую стабильность дифференцированных клеток в культуре и невысокий риск их злокачественной трансформации, для большинства препаратов осуществлялась оценка туморогенности.

3) В связи с тем, что для многих препаратов из этой группы свойственно применение внеклеточных компонентов (матриц, подложек и др.) отдельно проводились исследования по подтверждению их безопасности, а также биосовместимости с клеточным компонентом.

4) Часто исследования биораспределения, вторичной фармакологии, репродуктивной токсичности и иммунотоксичности не проводились из-за преобладающего локального действия этих препаратов, исследования генотоксичности — из-за от-

сутствия способности клеточных продуктов оказывать воздействие на геном клеток реципиента.

5) Сокращение ДКИ, в том числе токсикологических исследований, объяснялось аутологичной природой клеточного материала, производством без использования дополнительных веществ, а также наличием обширного клинического опыта применения непосредственно исследуемого препарата или его аналогов.

Доклинические исследования препаратов на основе стволовых клеток

1. *Препарат на основе стволовых клеток из лимба роговицы — Holoclar (Holostem Therapie Avanzate S.R.L, EC)*

Отчет о ДКИ препарата Holoclar при подаче заявки на регистрацию включал оценку опубликованных данных в научной литературе в сочетании с программой тестирования препарата и конечного продукта на производстве. Кроме того, обоснование сокращённой программы ДКИ (отсутствие исследований первичной и вторичной фармакологии, фармакодинамики, токсикологических исследований) включало ссылку на опыт, полученный при клиническом использовании стволовых клеток из лимба роговицы в течение более 30 лет, и в частности препарата Holoclar, который использовался в клинической практике с 1998 г., а также отсутствие адекватных моделей животных из-за различий в структуре глаза большинства млекопитающих [26].

Литературные данные доказательства механизма действия включали результаты исследования на крысах, которые показали, что стволовые клетки на фибриновой подложке служат основой для замены и регенерации эпителия роговицы [27].

Фармакокинетические исследования: классические исследования по абсорбции, распределению, метаболизму и элиминации не проводились в соответствии с Руководством [3]. Некоторые подтверждающие доказательства отсутствия клеточной миграции были доступны из опубликованных данных [27, 28]. Помимо этого, миграция из области приживления считалась маловероятной из-за адгезионной зависимости нормальных эпителиальных клеток.

Кроме того, предлагаемое лечение препаратом представляет собой однократную местную заместительную терапию без системного эффекта. Трансплантированные клетки локализуются только на поверхности глаза. Для подтверждения отсутствия инвазии культивируемых клеток в базальные глазные структуры в отчёте ДКИ были предоставлены данные гистологического анализа срезов роговицы от пациентов, получавших препарат и перенёсших перфорационную кератопластику. Эти данные входили в оценку клинической безопасности. В дополнение были представлены данные литературы о сохранении целостно-

сти трансплантируемого препарата, полученные на бестимусных мышцах [27, 28].

Характеристику канцерогенного потенциала клеток, входящих в состав препарата Holoclar, оценивали методами кариотипирования и анализом роста колоний в жидком агаре. Этим же исследованиям подвергалась и фидерная линия клеток мышей 3T3-J2, использующаяся при производстве препарата.

2. *Препараты на основе мезенхимальных стволовых клеток: Alofisel (Takeda Pharma A/S, ЕС) и Temcell (Prochymal) (JCR Pharmaceuticals Co., Ltd, Япония)*

Механизм действия препарата Alofisel (МСК жировой ткани (ЖТ)) для лечения параректальных свищей при болезни Крона основан на иммуномодулирующих и противовоспалительных свойствах МСК. С клетками МСК ЖТ, входящими в состав препарата, была проведена обширная программа ДКИ (таблица) [29].

Механизм действия препарата Temcell (ранее был зарегистрирован в Канаде под названием

Prochymal [36]) на основе МСК КМ для лечения «реакции трансплантат против хозяина» (РТПХ) после пересадки костного мозга при онкологических заболеваниях основан на выделении кортикостероидных гормонов, обладающих иммуносупрессивным действием. По некоторым данным, МСК также уменьшают активацию Т-клеток и таким образом подавляют иммунные механизмы [33, 34]. В рамках ДКИ препарата Temcell была изучена активность, биораспределение и токсичность при однократном и многократном введении (таблица) [33–35, 37, 38].

3. *Препарат на основе фибробластов LAVIV (Fibrocell, США)*

Классические ДКИ препарата для применения в косметологии LAVIV для устранения носогубных складок и морщин, точный механизм действия которого не установлен, но предположительно связан с действием секретируемого фибробластами коллагена, не проводились ввиду отсутствия модели животных, имитирующей морщины и носогубные складки [39].

Программа доклинических исследований препаратов на основе мезенхимальных стволовых клеток

Препарат	Alofisel	Temcell
Активность	Животные: мыши с моделируемым заболеванием. Способ введения: при введении внутрибрюшинно 3×10^5 или 1×10^6 . Параметры оценки: уровни воспалительных, противовоспалительных цитокинов, хемокинов и ингибирующего макрофаги белка 2 (MIP-2); роль МСК в индукции клеток Treg <i>in vivo</i> [29]	<i>In vitro</i> : иммуномодулирующий эффект, миграционную способность и иммуногенность КМ. Исследования <i>in vivo</i> не проводились из-за отсутствия подходящей модели животных [30–32]
Биораспределение	Животные: бестимусные иммунодефицитные крысы. Доза, кратность введения: 5×10^6 МСК, дважды с 2-недельным интервалом. Способы введения: комбинация перианального и интра ректального введения (предполагаемый клинический путь введения), внутривенно (системное введение), интравагинально. Параметры оценки: распределение введенных МСК ЖТ контролировали на 1–2-е, 14-е, 90–91-е, 182-е сутки	Животные: иммунодефицитные мыши обоих полов. Способ введения: в хвостовую вену радиоактивно меченные ^{51}Cr -JR-031 МСК КМ в дозе 20×10^6 клеток/кг Параметры оценки: распределение введенных МСК КМ в течение 28 сут [30–32]
Токсичность	Животные: бестимусные иммунодефицитные крысы. Способы введения: внутривенный, подкожный; токсичность при комбинированном и интравагинальном пути введения — в ходе исследований биораспределения. Параметры оценки: исследования токсичности однократного введения в дозах 5×10^6 клеток/крыса и 10×10^6 клеток/крыса; исследования токсичности многократного введения с интервалом в две недели при повторных дозах $2,5 \times 10^6$ клеток/крыса и 5×10^6 клеток/крыса [29]	Животные: крысы линии F344 и иммунодефицитные мыши. Способ введения: внутривенно. Параметры оценки: — исследования токсичности однократного введения (крысы: в дозах 10×10^6 , 40×10^6 , 65×10^6 клеток/кг); — исследования токсичности многократного введения: мыши — (2 раза в неделю) в течение 4 нед. клеток в дозах 2×10^6 клеток/кг, 20×10^6 клеток/кг; крысы — в течение 13 нед. при введении клеток в дозах 2×10^6 , 10×10^6 клеток/кг, 20×10^6 клеток/кг по схеме: 2 раза в неделю (4 нед.), далее 1 неделю без лечения, далее введение 1 раз в неделю на протяжении 4 нед.; — оценка общей токсичности при дозе, превышающей клиническую в 10 раз; — оценка воздействия препарата на нервную и дыхательную системы при однократном введении различных доз препарата
Генотоксичность	Исследования не проводились вследствие отсутствия взаимодействия непосредственно с ДНК и хромосомным материалом	
Туморогенность	<i>In vitro</i> : пролиферативная активность, активность теломеразы и экспрессии гена c-myc, кариотипирование <i>In vivo</i> : образование опухолей при подкожном введении иммунодефицитным мышам [29]	<i>In vitro</i> : анализ кариотипа и анализ колониеобразования в мягком агаре клеток на пассажах, более поздних, чем в клинике. <i>In vivo</i> : в ходе определения общей токсичности (на мышках в течение 4 нед. при многократном введении) [33–35]

При подаче заявки на регистрацию заявителем были приведены статьи [40–44], описывающие использование фибробластов на различных животных моделях: мышах, крысах и кроликах при подкожном введении в дозе $5-8 \times 10^7$ клеток/кг. Активность клеток доказывали при наличии экспрессии коллагена методом проточной цитометрии, безопасность — отсутствием хромосомных аномалий методом кариотипирования.

При оценке биораспределения выявлено, что аутологичные клетки крысы выживали до 8 мес., клетки кролика не менее 5 мес., ксеногенные фибробласты человека не менее 2 мес. На 10-е сутки после введения присутствовали 80–90% клеток, на 9-ой неделе — 25% клеток. Проводили гистологическое исследование места введения клеток. У животных не было обнаружено никаких побочных реакций. Таким образом, обоснованием отсутствия токсичности препарата LAVIV служило отсутствие побочных эффектов у подопытных животных.

Таким образом, в результате анализа ДКИ препаратов, основанных на использовании стволовых клеток, разрешённых к применению в мире, можно сделать следующие выводы:

1) В подавляющем большинстве случаев ДКИ препаратов, содержащих СК, проводились на разнообразных моделях (модели *in vitro*, *in vivo* на иммунокомпетентных и иммунодефицитных животных). При этом использовались животные разных видов.

2) ДКИ, как правило, содержали оценку специфической активности препаратов, биораспределения, токсичности (однократного и при необходимости многократного введения, общую токсичность).

3) Для большинства препаратов осуществлялась оценка туморогенности (канцерогенности) *in vitro* методами, однако для ряда препаратов (Alofisel, Temcell) проводились дополнительные исследования возможности образования опухолей на иммунодефицитных животных.

4) Исследования генотоксичности не проводились для всех препаратов, вследствие отсутствия воздействия клеточных продуктов на геном клеток реципиента.

5) Из общих аспектов проведения ДКИ для СК выделяются ДКИ для препарата Holoclar, что связано с особенностями его использования (показание к применению, местное введение, отсутствие миграции клеток в другие органы), отсутствием адекватных моделей животных/заболева-

ния, большим опытом клинического применения и наличием обширных данных по специфическому действию и безопасности подобных препаратов в научной литературе.

Заключение

Общие принципы проведения ДКИ в странах ЕС и США соответствуют требованиям национального законодательства и должны содержать исследования фармакологии (первичной, вторичной фармакодинамики), кинетики (биораспределения), токсикологии (токсичность однократной дозы, многократных доз, исследования местного раздражающего действия, в ряде случаев генотоксичность и туморогенность). Главным принципом рассмотрения результатов ДКИ препаратов клеточной терапии зарубежными регуляторными органами является персональный подход для каждого препарата.

В большинстве случаев для препаратов клеточной терапии, разрешённых к применению в медицинской практике, была проведена сокращённая программа доклинических исследований, обоснованием для которой служило:

- наличие продолжительного клинического опыта применения препарата или аналогичных клеток, входящих в состав препарата;

- практика учёта результатов ранее проведённых доклинических и клинических исследований препаратов на основе аналогичных клеток;

- отсутствие релевантных моделей животных из-за различий в строении органов и тканей, невозможность воспроизведения заболевания человека на животных, различий в ответе на введение препарата у человека и животных и др.

Кроме того, сокращённая программа проведения кинетических исследований допускается для препаратов для аутологичного применения; препаратов, содержащих клетки без генетической модификации, и для препаратов, в составе которых имеются матрицы, ограничивающие распространение клеток в организме. Однако в случае наличия носителей (скаффолдов, матриц, медицинских устройств) в составе клеточных препаратов проводились исследования совместимости клеточного и неклеточного компонентов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР АААА-А18-118021590045-2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. N 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». / Federal'nyj zakon ot 23 iyunya 2016 g. N 180-FZ «O biomeditsinskikh kletochnykh produktakh». http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_199967/. [in Russian]
2. Приказ Минздрава России от 8 августа 2018 г. N 512н «Об утверждении правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». / Prikaz Minzdrava Rossii ot 8 avgusta 2018 g.

N 512n «Ob utverzhdenii pravil nadležashchej praktiki po rabote s biomeditsinskimi kletochnymi produktami». — URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_310301/. [in Russian]

3. Guideline on human cell-based medicinal products. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003898.pdf.

4. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. Available from: <http://www.fda.gov/down->

- loads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm081670.pdf.
5. Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials (Draft) (EMA/CAT/852602/2018). — European Medicines Agency, 2019. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-non-clinical-clinical-requirements-investigational-advanced-therapy_en.pdf.
6. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (Draft) (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1). — European Medicines Agency, 2018. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically_en.pdf.
7. Summary Basis for Regulatory Action — KYMRIAH. — Food and Drug Administration; 2018. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM606836.pdf>.
8. Summary Basis for Regulatory Action: KYMRIAH, ALL. — Food and Drug Administration, 2017. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM577221.pdf>.
9. Assessment report. Kymriah (EMA/462626/2018). — European Medicines Agency, 2018. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kymriah-epar-public-assessment-report_en.pdf.
10. Milone M.C., Fish J.D., Carpenito C. et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol Ther* 2009; 17 (8): 1453–1464.
11. Berry C.C., Nobles C., Six E. et al. INSPIRED: Quantification and Visualization Tools for Analyzing Integration Site Distributions. *Mol Ther Meth Clin Dev* 2017; 4: 17–26.
12. Afzal S., Wilkening S., von Kalle C. et al. GENE-IS: Time-Efficient and Accurate Analysis of Viral Integration Events in Large-Scale Gene Therapy Data. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017; 6: 133–139.
13. Assessment report. Yescarta (EMA/CHMP/481168/2018). — European Medicines Agency, 2018. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf.
14. Kochenderfer J.N., Feldman S.A., Zhao Y. et al. Construction and Pre-clinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 2009; 32 (7): 689–702.
15. Kochenderfer J.N., Yu Z., Frasher D. et al. Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood* 2010; 116 (19): 3875–3886.
16. Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors (EMA/273974/2005). — European Medicines Agency, 2005. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-testing-inadvertent-germline-transmission-gene-transfer-vectors_en.pdf.
17. Annex I — Summary of Product Characteristics. In: Strimvelis: EPAR — Product Information. — European Medicines Agency. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information_en.pdf.
18. Assessment report. Zynteglo (EMA/CHMP/226273/2019). — European Medicines Agency, 2019. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zynteglo-epar-public-assessment-report_en.pdf.
19. Assessment report. MACI (EMA/25287/2013). — European Medicines Agency, 2013. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/maci-epar-public-assessment-report_en.pdf.
20. Assessment report. Spherox (EMA/349863/2017). — European Medicines Agency, 2017. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spherox-epar-public-assessment-report_en.pdf.
21. Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee (EMA/CAT/CPWP/568181/2009). — European Medicines Agency, 2010. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-vitro-cultured-chondrocyte-containing-products-cartilage-repair-knee_en.pdf.
22. GINTUIT®. Highlights of prescribing information. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM295525.pdf>.
23. Summary Basis for Regulatory Action — GINTUIT. — Food and Drug Administration; 2018. Available from: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/ucm295465.htm>.
24. Review Report. JACE. — 2007. — Available from: <http://www.pmda.go.jp/files/000223079.pdf>.
25. Report on the Deliberation Results. HeartSheet. — 2015. — Available from: <http://www.pmda.go.jp/files/000215222.pdf>.
26. Assessment report. Holoclar (EMA/25273/2015). — European Medicines Agency, 2015. — Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/holoclar-epar-public-assessment-report_en.pdf.
27. Rama P., Matuska S., Paganoni G. et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *New Engl J Med* 2010; 363 (2): 147–155.
28. Di Nunzio F., Maruggi G., Ferrari S. et al. Correction of laminin-5 deficiency in human epidermal stem cells by transcriptionally targeted lentiviral vectors. *Mol Ther* 2008; 16 (12): 1977–1985.
29. Assessment report. Alofisel (EMA/CHMP/64055/2018). — European Medicines Agency, 2018. — Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/alofisel-epar-public-assessment-report_en.pdf.
30. Report on the Deliberation Results. Temcell. — 2015. — Available from: <http://www.pmda.go.jp/files/000215658.pdf>.
31. Successful Phase II Trial Using Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Combination with Steroids for the Primary Treatment of Acute Graft Versus Host Disease (aGVHD). — 2006. — Available from: <http://mesoblast.com/images/pdf/adult-agvhd-ash-2006.pdf>.
32. Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C. et al. Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* 2012; 10 (7): e47559.
33. Bernardo M.E., Fibbe W.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013; 13 (4): 392–402.
34. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013; 91 (1): 19–26.
35. Xiao W., Mohseny A.B., Hogendoorn P.C. et al. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. *Clin Sarcoma Res* 2013; 3 (1): 10.
36. Osiris Therapeutics, Inc. — Available from: <http://www.osiris.com/>.
37. Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C. et al. Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* 2012; 10 (7): e47559.
38. Von Bahr L., Batsis I., Moll G. et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells* 2012; 30 (7): 1575–1578.
39. Summary Basis for Regulatory Action. LAVIV®. — Available from: <http://wayback.archive-it.org/7993/20170723023939/https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM262780.pdf>.
40. Remmler D., Thomas J.R., Mazoujian G. et al. Use of injectable cultured human fibroblasts for percutaneous tissue implantation. An experimental study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 115 (7): 837–844.
41. Keller G., Sebastian J., Lacombe U. et al. Safety of injectable autologous human fibroblasts. *Bull Exp Biol Med* 2000; 130 (8): 786–789.
42. Yoon E., Han S.K., Kim W.K. Advantages of the presence of living dermal fibroblasts within Restylane for soft tissue augmentation. *Ann Plast Surg* 2003; 51 (6): 587–592.
43. Solakoglu S., Tiryaki T., Ciloglu, S.E. The effect of cultured autologous fibroblasts on longevity of cross — linked hyaluronic acid used as a filler. *Aesthetic Surg* 2008; 28 (4): 412–416.
44. Zhao Y., Wang J., Yan X. et al. Preliminary survival studies on autologous cultured skin fibroblasts transplantation by injection. *Cell Transplant* 2008; 17 (7): 775–783.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мельникова Е. В. — к. б. н., начальник лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ИЦЭКЛС ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России

Хорольский М. Д. — инженер-лаборант лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ИЦЭКЛС ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России

Рачинская О. А. — к. б. н., ведущий эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ИЦЭКЛС ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России

Меркулов В. А. — д. м. н., проф., заместитель генерального директора ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России