

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc340771>

Оценка функциональной активности *in vitro* препарата ANB4 для лечения спинальной мышечной атрофии

Е.М. Роденков^{1, 2}, Н.В. Кожемякина^{1, 2}, Ю.А. Зонис², П.М. Гершович^{1, 3}, Б.Ю. Лалаев¹¹ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация;² Отдел биологических исследований BIOCAD, Санкт-Петербург, Российская Федерация;³ Департамент разработки генотерапевтических препаратов BIOCAD, Санкт-Петербург, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение. Спинальная мышечная атрофия (СМА) — это моногенное наследственное нейродегенеративное заболевание, которое возникает в результате недостатка функционального белка SMN (survival motor neuron protein), вызванного мутациями в гене *SMN1*. Компания BIOCAD разрабатывает отечественный препарат для лечения СМА ANB4 на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 9-го серотипа (rAAV9), несущего ген *SMN1*. Определение *in vitro* функциональной активности ANB4 позволит более полно охарактеризовать лекарственный препарат.

Цель исследования — разработка точного и воспроизводимого функционального теста *in vitro*, который отражает клинический механизм действия препарата ANB4.

Материалы и методы. Для моделирования СМА проводили нокдаун гена *SMN1* посредством трансфекции малой интерферирующей РНК. Уровень белка SMN оценивали методом иммуноферментного анализа. Функциональную активность препарата определяли по уровню продукции белка Gemin2 методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Разработанная методика оценки функциональной активности препарата ANB4 для лечения СМА 1-го типа (rAAV9, несущий ген *SMN1*) позволила получить точные и воспроизводимые результаты. Уровень Gemin2 после нокдауна *SMN1* и внесения препарата восстанавливался до контрольных значений соизмеримо восстановлению уровня белка SMN.

Заключение. Методика отражает клинический механизм действия препарата ANB4 для лечения СМА. При оценке функциональной активности *in vitro* получали точные и воспроизводимые результаты в соответствии с предъявляемыми стандартами, включая принципы 3R.

Ключевые слова: СМА; *SMN1*; *SMN2*; snRNP; Gemin2; AAV9; генная терапия.

Как цитировать:

Роденков Е.М., Кожемякина Н.В., Зонис Ю.А., Гершович П.М., Лалаев Б.Ю. Оценка функциональной активности *in vitro* препарата ANB4 для лечения спинальной мышечной атрофии // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 2. С. 133–143. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc340771>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc340771>

Evaluation of *in vitro* functional activity of ANB4 drug for the treatment of spinal muscular atrophy

Evgeny M. Rodenkov^{1, 2}, Natalya V. Kozhemyakina^{1, 2}, Yulia A. Zonis², Pavel M. Gershovich^{1, 3}, Boris Y. Lalaev¹

¹ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russian Federation;

² Bioassay Division "BIOCAD", Saint Petersburg, Russian Federation;

³ Gene Therapy Development Department "BIOCAD", Saint Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Spinal muscular atrophy (SMA) is a monogenic neurodegenerative disease. SMA is caused by a deficiency of the functional survival motor neuron protein (SMN) as a result of a mutation in the *SMN1* gene. BIOCAD is developing a domestic gene therapy drug for the treatment of SMA based on recombinant adeno-associated virus serotype 9 (rAAV9) carrying the *SMN1* gene (ANB4). *In vitro* evaluation of the functional activity of ANB4 will allow a more complete characterization of the drug.

AIM: Development of an accurate and reproducible *in vitro* functional test that reflects the clinical mechanism of action of ANB4.

METHODS: To model SMA, the *SMN1* gene was knocked down by transfection with small interfering RNA. Amount of the SMN protein was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The functional activity of the drug was evaluated by analysis of Gemin2 protein level using the western blot analysis.

RESULTS: Analytical method has been developed to assess the functional activity of the ANB4 drug for the treatment of SMA type 1 (rAAV9 carrying the *SMN1* gene). The developed technique made it possible to obtain accurate and reproducible results. Production of Gemin2 after knockdown of *SMN1* and the introduction of exogenous *SMN1* gene was restored to control values, comparable with the restoration of the level of the SMN protein.

CONCLUSION: The developed technique closely reflects the clinical mechanism of action of the ANB4 drug for the treatment of SMA. By evaluating the functional activity *in vitro*, accurate and reproducible results were obtained in accordance with the required standards, including the principles of 3R.

Keywords: SMA; *SMN1*; *SMN2*; snRNP; Gemin2; AAV9; gene therapy.

To cite this article:

Rodenkov EM, Kozhemyakina NV, Zonis YA, Gershovich PM, Lalaev BY. Evaluation of *in vitro* functional activity of ANB4 drug for the treatment of spinal muscular atrophy. *Genes & cells*. 2023;18(2):133–143. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc340771>

ВВЕДЕНИЕ

Технология производства генотерапевтических лекарственных препаратов является относительно новой, отличается сложностью, и для разработки и производства безопасных, эффективных и качественных препаратов необходимо исследовать характеристики продукта на протяжении всего процесса. Одним из важнейших показателей качества генотерапевтических лекарственных препаратов является биологическая активность [1] — способность препарата оказывать определённый биологический эффект. Количественная мера биологической активности — специфическая активность. Показатель специфической активности используется в анализах сопоставимости при изменении в производственном процессе, для оценки качества производственных серий (в том числе клинических), подлинности, стабильности, характеристики продукта [1–4].

По возможности в анализ биологической активности входит измерение функциональной активности нуклеотидной последовательности или продукта её экспрессии. Все анализы желательно проводить *in vitro* в соответствии с принципом 3R (Replacement, Reduction, Refinement) [1, 5]:

- Replacement — замена или отказ от использования животных;
- Reduction — уменьшение количества животных до необходимого и достаточного уровня;
- Refinement — улучшение условий проведения экспериментов при использовании животных.

Разработка *in vitro* тестов по определению биологической или функциональной активности связана с рядом специфических для генотерапевтических лекарственных препаратов особенностей [2]:

1) получение вариabельных данных из-за использования биологических систем (например, клеточных линий) [6, 7];

2) выбор релевантной клеточной модели. Для оценки активности генотерапевтических лекарственных препаратов необходимо, чтобы клеточная линия была перmissive и компетентной для экспрессии трансгена. Так, при определении биологической активности могут быть использованы модельные клеточные линии, эффективность трансдукции которых иногда значительно отличается от эффективности трансдукции целевых клеток [2];

3) ограниченное количество наработанного препарата для разработки и проведения тестов по определению функциональной активности, особенно на ранних этапах разработки [2].

Определение функциональной активности *in vitro* производственных серий позволяет получать исчерпывающую информацию об активности лекарственного средства [2].

В настоящем исследовании рассматривается функциональный тест для оценки генотерапевтического лекарственного препарата для лечения спинальной мышечной

атрофии (СМА) на основе рекомбинантного аденоассоциированного вектора 9-го серотипа, несущего ген *SMN1*.

Спинальная мышечная атрофия — это моногенное наследственное нейродегенеративное заболевание, которое возникает в результате недостатка функционального белка SMN (*survival motor neuron protein*), вызванного мутациями в гене *SMN1*. Необходимо отметить, что существует гомологичный ген *SMN2*, который кодирует белок SMNΔ7. Наиболее значимое отличие гена *SMN2* от *SMN1* заключается в точечной замене цитозина на тимин в экзоне 7, что приводит к вырезанию данного экзона во время сплайсинга [8, 9]. В то время как полно-размерный белок стабилен, белок SMNΔ7 быстро разрушается. По-видимому, пропуск экзона 7 приводит к более раннему распознаванию мотива из четырёх аминокислот EMLA (Glu-Met-Leu-Ala), кодируемого экзоном 8. EMLA служит сигналом деградации, что объясняет пониженную стабильность SMNΔ7 [10].

Как следствие, *SMN2* производит только около 10–15% белка по сравнению с *SMN1*. Ген *SMN2* не может полностью компенсировать *SMN1*, так как SMN представляет собой многофункциональный белок, который локализуется в ядре, цитоплазме, аксонах и нервно-мышечном соединении [8, 9]. Тяжесть заболевания обратно пропорциональна количеству копий гена *SMN2*.

Спинальная мышечная атрофия делится на пять различных типов. Наиболее распространённая форма — СМА 1-го типа с симптомами, проявляющимися в течение первых 3 мес после рождения. Эти пациенты не могут самостоятельно сидеть или контролировать положение головы и умирают в течение первых 2–3 лет жизни [9].

Одна из важнейших и хорошо изученных функций белка SMN — участие в сборке малых ядерных рибонуклеопротеиновых комплексов (snRNP) [11, 12]. SMN в комплексе с белком Gemin2, уровень которого напрямую зависит от продукции белка SMN [13], участвует в специфичной сборке (рис. 1) гептамерного кольца белков Sm на целевых малых ядерных РНК (snRNA) [11, 12].

Белок Gemin2 стягивает пентамерное кольцо Sm D1(met)/D2/F/E/G, что мешает взаимодействию с нецелевыми snRNA [14]. Только взаимодействие комплекса SMN со специфичной вторичной структурой snRNA и связывание пентамера Sm D1(met)/D2/F/E/G с PuAUUUNUGPu (специфичный сайт связывания Sm белков с snRNA) приводит к уменьшению стягивания пентамера Sm D1(met)/D2/F/E/G и присоединению SmD3(met)/B(met) для завершения сборки комплекса snRNP [12–19]. В результате снижения уровня белка SMN уменьшается общее количество комплексов snRNP и, как следствие, это приводит к нарушению сплайсинга.

Белок SMN также участвует в репарации двуцепочечных разрывов и влияет на уровень ROCK-белков [20–23]. Утрата более одной функции белка SMN способствует дегенерации моторных нейронов [9].

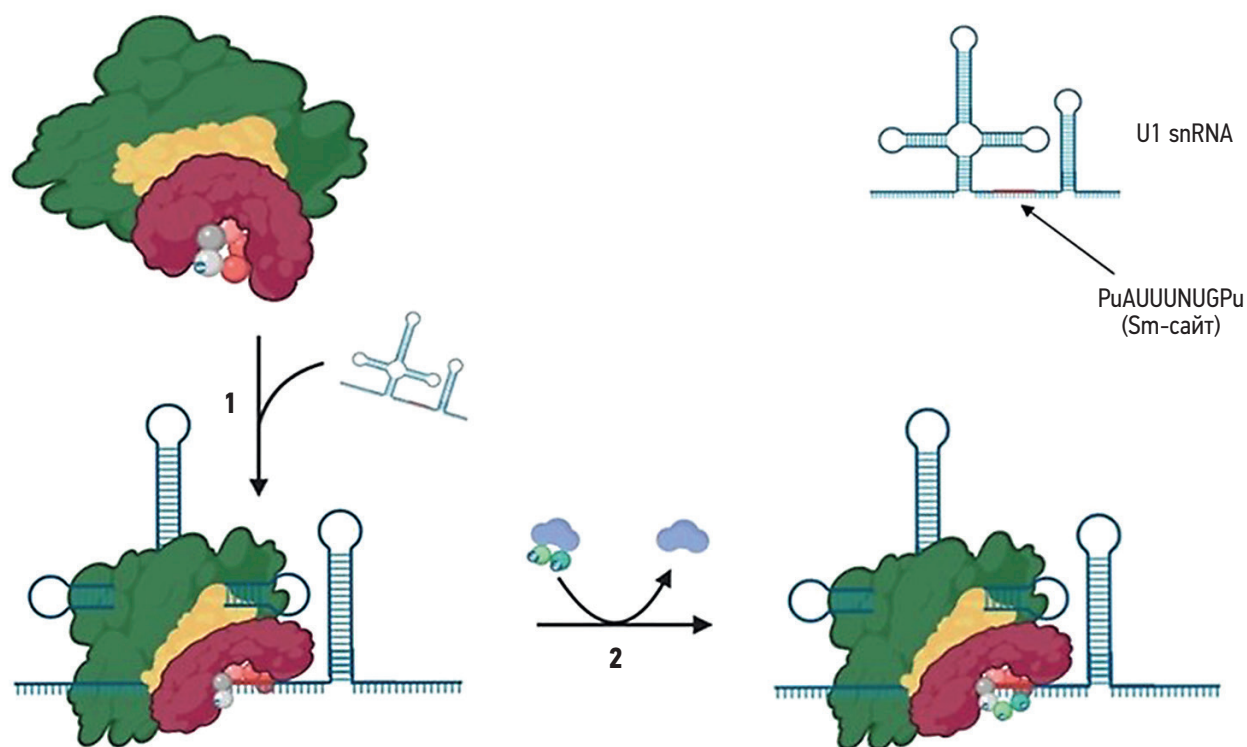


Рис. 1. Сборка комплексов snRNP на целевой snRNA: 1 — присоединение целевой РНК и раскрытие пентамерного Sm-кольца; 2 — завершение сборки комплекса snRNP после присоединения SmD3(met)/B(met). Иллюстрация сделана в программе BioRender. PuAUUUNUGPu — специфичный сайт связывания белков Sm с snRNA.

Fig. 1. Assembly of snRNP complexes on the target snRNA: 1 — binding of the target RNA and opening of the pentameric Sm-ring; 2 — completion of assembly of the snRNP complex after binding of SmD3(met)/B(met). The illustration is made in the BioRender program. PuAUUUNUGPu — specific binding site for Sm proteins to snRNA.

На сегодняшний день одобрено 3 препарата для лечения СМА: Нусинерсен (Спинраза) производства компании «Биоген Нидерландз Б.В.» (Нидерланды); Рисдиплам («Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария) и Онасемноген абепаровек (Золгенсма; Novartis International AG, Швейцария), все они зарегистрированы в России [24]. Механизм действия Нусинерсена и Рисдиплама основан на модификации сплайсинга гена *SMN2*. Механизм действия Онасемногена абепаровек заключается в вирусной доставке гена *SMN1*, кодирующего полноразмерный белок SMN. Компания BIOCAD разрабатывает отечественный препарат для лечения СМА на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса 9-го серотипа, несущего ген *SMN1*, — ANB4.

Цель исследования — разработка точного и воспроизводимого функционального теста *in vitro*, который отражает клинический механизм действия препарата ANB4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование

Субкультивирование клеточной линии HeLa осуществляли на среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей глутамин («ПанЭко», Россия) и инактивированную сыворотку FBS (Gibco, Великобритания). Флакон с клеточной

культурой инкубировали в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия).

Трансфекция

Трансфекцию проводили с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), среды Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США), реагента siNeg (Thermo Fisher Scientific, США), реагента siSMN1 (Thermo Fisher Scientific, США). Использовали 6-луночный (Corning, США) и 24-луночный (Eppendorf, Германия) форматы планшета.

Трансдукция

Трансдукцию проводили в 24-луночном планшете. Вносили препарат ANB4. Содержимое планшета перемешивали на шейкере (Biosan, Латвия), после чего инкубировали планшеты в CO₂-инкубаторе. В 6-луночном планшете смотрели только нокдаун гена *SMN1* без реинтродукции белка SMN.

Определение концентрации общего белка

Для проведения иммуноферментного анализа и вестерн-блоттинга предварительно в исследуемых клеточных лизатах измеряли концентрацию общего белка с помощью коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Лизис клеток

осуществляли после трипсинизации. Открепившиеся клетки лизировали экстрагирующим буфером (Abcam, США), содержащим ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария). В 96-луночный планшет (Corning, США) вносили разведённые исследуемые клеточные лизаты в двух повторях и разведённые образцы калибровочной кривой, содержащие бычий сывороточный альбумин определённой концентрации (BSA) (Thermo Fisher Scientific, США). Для количественного определения общего белка добавляли рабочий раствор, приготовленный из реагентов А и В набора для определения белка (Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность растворов измеряли в диапазоне длин волн зелёного спектра излучения, по калибровочной кривой определяли концентрацию общего белка в исследуемых клеточных лизатах.

Иммуноферментный анализ

Концентрацию белка SMN в клеточных лизатах HeLa определяли посредством иммуноферментного анализа, где на используемом планшете (Abcam, США) были иммобилизованы моноклональные антитела к белку SMN. После взаимодействия иммобилизованных антител и клеточного лизата последовательно добавляли поликлональные кроличьи антитела к SMN (Abcam, США), а затем раствор антивидовых антител, конъюгированных с HRP (Abcam, США). Вносили раствор субстратной смеси с хромогенным субстратом тетраметилбензидином (Abcam, США). Реакцию тетраметилбензидина с HRP останавливали добавлением стоп-раствора (Abcam, США) и измеряли оптическую плотность растворов в лунках на микропланшетном спектофотометре M Plex (Tecan, Швейцария). Концентрацию белка SMN в образце определяли по калибровочному графику, построенному с использованием данных оптической плотности стандартных растворов с помощью ПО Magellan Tracker (Tecan, Швейцария).

Вестерн-блоттинг

Для проведения вестерн-блоттинга осуществляли разделение белков в 10% полиакриламидных гелях. Клеточные лизаты вносили после проведения термической денатурации. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях при постоянном напряжении 90 В до достижения цветовым индикатором нижней границы геля. По завершении осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану при постоянной силе тока 200 мА. Для блокировки неспецифической сорбции нитроцеллюлозной мембраны использовали раствор BSA. Затем мембрану инкубировали с моноклональными кроличьими антителами против винкулина (Abcam, США) и поликлональными кроличьими антителами против Gemin2 (LsBio, США). Для детекции использовали раствор конъюгированных со щелочной фосфатазой поликлональных козьих антител (Abcam, США).

Проявляли щелочную фосфатазу набором AP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel 2016 (Microsoft, США) и GraphPad Prism 9.5.1. Значимость различий значений в исследуемых группах оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные на гистограммах представлены в виде среднего значения (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD). За пороговый уровень статистической значимости было принято $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки функциональной активности белка SMN проводили моделирование СМА, которое заключалось в снижении уровня исследуемого белка посредством нокдауна гена *SMN1* при помощи малой интерферирующей РНК, специфичной к гену *SMN1* (*siSMN1*), в клеточной линии HeLa. Результаты репрезентативного эксперимента по оценке продукции белка SMN представлены на рис. 2.

В результате проведения нокдауна гена *SMN1* уровень белка SMN снижался более чем в 7 раз по сравнению с контрольными нетрансфицированными клетками. Для демонстрации специфичности *siSMN1* использовали контрольную малую интерферирующую РНК (*siNeg*), не приводящую к РНК-интерференции. Концентрация белка SMN не снижалась в клеточных лизатах с *siNeg* в сравнении с контрольными.

Для исследования функциональной активности SMN проводили оценку уровня белка Gemin2, который необходим для специфичной сборки snRNP на целевых snRNA. Концентрация Gemin2 зависит от продукции SMN, а уровень белка SMN не изменяется при снижении Gemin2 [13, 25]. Результаты оценки Gemin2 представлены на рис. 3.

Уменьшение продукции белка SMN в клеточной линии HeLa приводило к снижению содержания Gemin2, что согласуется с литературными данными [13, 25]. В среднем снижение уровня Gemin2 в двух экспериментах составило 75% по сравнению с контролем ($p=0,0002$) с относительным стандартным отклонением (RSD) 10%.

После подтверждения зависимости Gemin2 от продукции белка SMN проводили оценку функциональной активности терапевтического продукта ANB4, полученного в компании BIOCAD. Для этого выполняли трансфекцию *siSMN1* клеточной линии HeLa и вносили препарат ANB4.

После инкубации с препаратом готовили клеточные лизаты и оценивали уровень белка SMN. Результаты репрезентативного эксперимента по оценке концентрации изучаемого белка после нокдауна *SMN1* и трансдукции ANB4 представлены на рис. 4.

Трансдукция ANB4 клеток HeLa с нокадауном *SMN1* приводила к восстановлению белка SMN по сравнению с образцами, где осуществляли только нокадаун *SMN1*. В клеточных лизатах с нокадауном *SMN1* и трансдукцией

ANB4 оценивали уровень Gemin2. Результаты представлены на рис. 5.

Уровень Gemin2 после нокадауна *SMN1* составил менее 40% от контрольных значений. Трансдукция препаратом

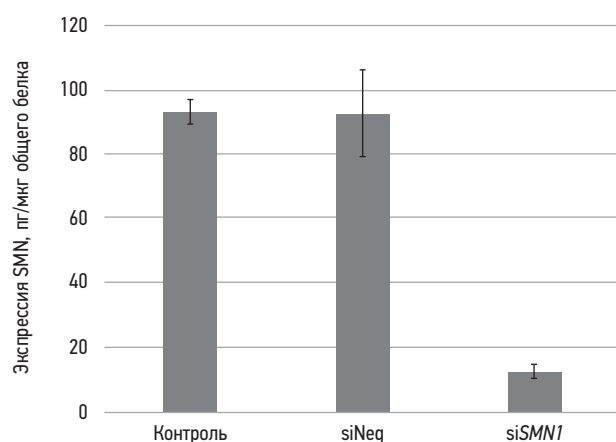


Рис. 2. Концентрация белка SMN в клеточных лизатах после нокадауна *SMN1*. Представлены средние значения со стандартными отклонениями.

Fig. 2. SMN protein concentration in cell lysates after *SMN1* knockdown. Mean values with standard deviations are presented.

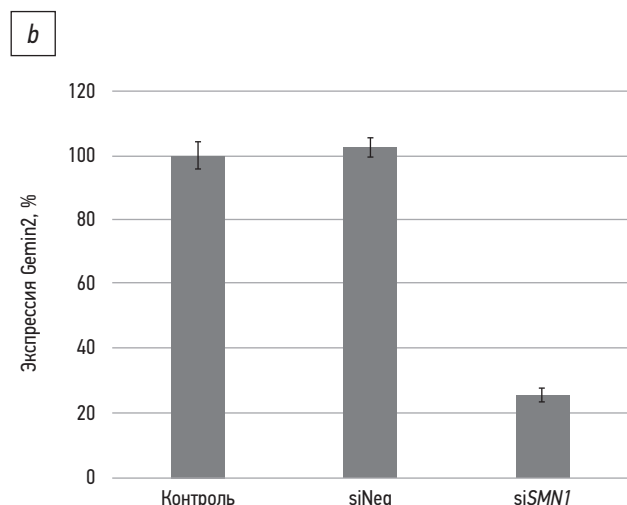


Рис. 3. Результаты оценки уровня белка Gemin2: *a* — контрастное изображение мембраны с проявленными белками Gemin2 и винкулин (Vinculin) после нокадауна *SMN1*; *b* — уровень Gemin2 после нокадауна *SMN1* (гистограмма построена на основе данных, полученных после обработки блота в программе Image Studio Digits).

Fig. 3. Results of evaluation of Gemin2 protein level: *a* — contrast image of the membrane with Gemin2 and Vinculin proteins after *SMN1* knockdown; *b* — Gemin2 level after *SMN1* knockdown (the histogram is made on the basis of data obtained after processing the blot in the Image Studio Digits program).

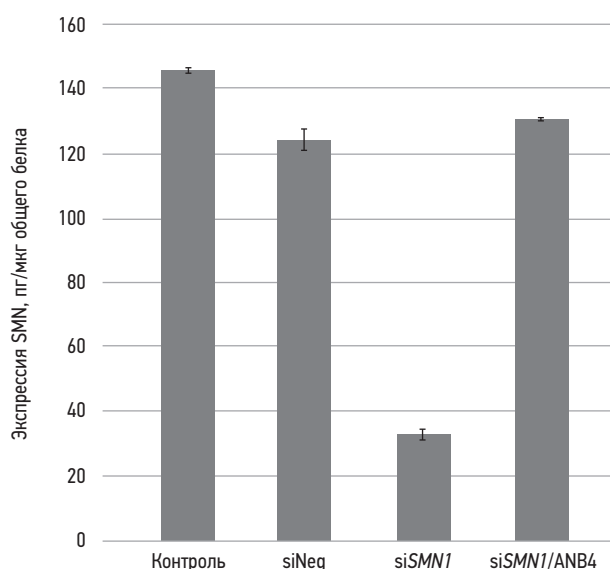


Рис. 4. Концентрация белка SMN в клеточных лизатах HeLa после нокадауна *SMN1* и трансдукции ANB4.

Fig. 4. SMN protein concentration in HeLa cell lysates after *SMN1* knockdown and ANB4 transduction.

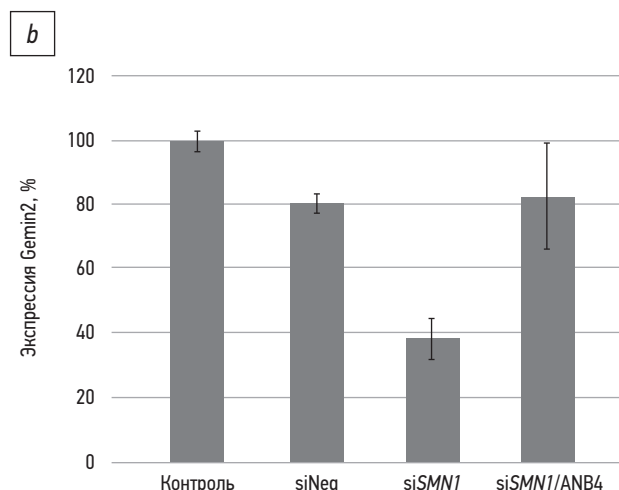
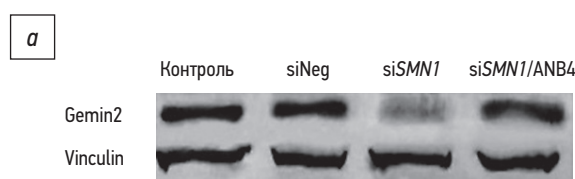


Рис. 5. Результат оценки функциональной активности ANB4: *a* — контрастное изображение мембраны с проявленными белками Gemin2, винкулин (Vinculin); *b* — гистограмма уровня белка Gemin2 клеточных лизатов HeLa после нокадауна *SMN1* и трансдукции ANB4.

Fig. 5. The result of evaluation of the functional activity of ANB4: *a* — contrast image of the membrane with the proteins Gemin2, Vinculin; *b* — histogram of Gemin2 level in HeLa cell lysates after *SMN1* knockdown and ANB4 transduction.

ANB4 после нокдауна гена *SMN1* приводила к восстановлению продукции белка SMN, а также уровня Gemin2 в среднем до 80% от контрольных значений. Продукция Gemin2 после трансфекции siNeg и внесения препарата ANB4 значимо не отличалась от контрольных значений (результаты не показаны). На рис. 5, *b* представлены относительные значения Gemin2 после нокдауна *SMN1* и трансдукции препаратом (статистически значимо отличаются, $p=0,0286$), полученные после обработки блотов в программе Image Studio Digits. RSD восстановления уровня Gemin2 между двумя экспериментами составляло 2,97%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Один из возможных методов измерения функциональной активности SMN — оценка эффективности сборки snRNP комплексов *in vitro*. Методика количественной оценки комплексов snRNP имеет несколько форматов проведения: иммуоферментный анализ и ко-иммунопреципитация комплексов snRNP при использовании магнитных частиц [26, 27]. Было принято решение адаптировать метод для количественной оценки активности препарата ANB4, однако нам не удалось получить воспроизводимые результаты, а именно статистически значимые различия между исследуемыми группами (результаты не показаны): группа контроля — нетрансфицированные и нетрансдуцированные клетки; группа siNeg — клетки, трансфицированные siNeg; группа siSMN1 — клетки, трансфицированные siSMN1; группа siSMN1/ANB4 — клетки, трансфицированные siSMN1 и трансдуцированные препаратом ANB4. Таким образом, перед нами стояла задача разработки метода оценки функциональной активности препарата.

По литературным данным, активность белка SMN может быть оценена по количеству фосфорилированного гистона H2AX — маркера двуцепочечных разрывов ДНК [20, 21], по уровню фосфорилирования белков сигнальных путей mTOR [28, 29] и ROCK [22, 23], а также по уровню Gemin2 [13, 25]. При апробации вышеперечисленных методов воспроизводимые данные получены при измерении уровня Gemin2 после моделирования СМА (см. рис. 2–5). Gemin2 после нокдауна *SMN1* и внесения препарата ANB4 восстанавливался до контрольных значений соизмеримо восстановлению продукции белка SMN.

Для оценки функциональной активности препарата Онасемноген абепаровек измеряют количество телец Gems (Gemini) [30]. Коилин-независимые тельца Gems (или «близнецы» телец Кахаля) содержат белки, которые входят в комплекс SMN, однако роль телец Gems неизвестна [31, 32]. Оценка количества телец Gemini показывает фенотипическое изменение (увеличение количества телец после трансдукции препарата), что лишь косвенно характеризует механизм действия препарата Онасемноген абепаровек *in vitro*.

Gemin2 является ключевым белком в биогенезе snRNP, захватывая пять из семи Sm-белков, предотвращает неспецифическое взаимодействие с нецелевыми РНК по принципу отрицательной обратной связи [14]. Ранее было показано, что делеция гена *Gemin2* у мышей вызывает эмбриональную летальность на более ранней стадии, чем делеция гена *SMN1*, а восстановление уровня Gemin2 может купировать симптомы СМА у мышей [33]. Следует отметить, что содержание белка SMN напрямую влияет на уровень Gemin2, что также показано на клетках пациентов со СМА [34].

При СМА и моделировании заболевания происходит потеря стабилизирующей функции белка SMN в комплексе SMN, что особенно критично для взаимодействия SMN–Gemin2 [25, 35]. В отсутствие белка SMN изменяется конформация аминокислотного участка 95–280 Gemin2, что приводит к снижению стабильности Gemin2 [19]. В результате нарушения продукции SMN снижается уровень клеточного Gemin2 [19]. Не исключают также возможность участия SMN в регуляции, транскрипции *Gemin2*, процессинге РНК *Gemin2*, нарушение которых может также приводить к снижению уровня Gemin2 [35].

Таким образом, измерение уровня белка Gemin2 лучше отражает клинический механизм действия и больше подходит при оценке функциональной активности препарата для лечения СМА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная в исследовании методика отражает клинический механизм действия препарата ANB4 для терапии спинальной мышечной атрофии. При оценке функциональной активности *in vitro* получали точные и воспроизводимые результаты в соответствии с предъявляемыми стандартами, включая принципы 3R.

При использовании разработанной методики была показана высокая функциональная активность отечественного препарата ANB4, что подтверждается данными доклинических исследований. В дальнейшем разработанная методика анализа будет использоваться для контроля качества клинических серий препарата.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Исследование проводилось на базе исследовательских лабораторий компании BIOCAD (Россия).

Конфликт интересов. Авторы исследования Е.М. Роденков, Н.В. Кожемякина, Ю.А. Зонис, П.М. Гершович являются сотрудниками компании BIOCAD.

Вклад авторов. Е.М. Роденков — дизайн исследования, проведение экспериментальных процедур, анализ полученных результатов, обзор литературы, сбор и анализ

литературных источников, подготовка и написание текста статьи; Н.В. Кожемякина — дизайн исследования, обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, подготовка, написание текста и редактирование статьи; Ю.А. Зонис — концепция и дизайн исследования, анализ полученных результатов, обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, подготовка, написание текста и редактирование статьи; П.М. Гершович — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, подготовка, написание текста и редактирование статьи; Б.Ю. Лалаев — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, подготовка и написание текста статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was conducted based on research laboratories of the BIOCAD company (Russia).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://www.ema.europa.eu/> [Internet]. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. In: European medical agency. Scientific guideline [дата обращения: 18.12.2022]. Доступ по ссылке: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-preclinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products-scientific-guideline>
2. <https://www.fda.gov/> [Internet]. Potency tests for cellular and gene therapy products. In: U.S. Food and Drug Administration. Final guidance for industry: January 2011 [дата обращения: 18.12.2022]. Доступ по ссылке: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/potency-tests-cellular-and-gene-therapy-products>
3. <https://www.fda.gov/> [Internet]. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). In: U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: January 2020 [дата обращения: 18.12.2022]. Доступ по ссылке: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug>
4. <https://www.fda.gov/> [Internet]. Human gene therapy for rare diseases. In: U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry: January 2020 [дата обращения: 18.12.2022]. Доступ по ссылке: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/human-gene-therapy-rare-diseases>
5. Burden N., Clift M.J.D., Jenkins G.J.S., et al. Opportunities and challenges for integrating new in vitro methodologies in hazard testing and risk assessment // *Small*. 2021. Vol. 17, N 15. P. 2006298. doi: 10.1002/smll.202006298
6. Hartung T., Daston G. Are in vitro tests suitable for regulatory use? // *Toxicol Sci*. 2009. Vol. 111, N 2. P. 233–237. doi: 10.1093/toxsci/kfp149
7. Hartung T. Perspectives on in vitro to in vivo extrapolations // *Appl In Vitro Toxicol*. 2018. Vol. 4, N 4. P. 305–316. doi: 10.1089/aivt.2016.0026
8. Talbot K., Tizzano E.F. The clinical landscape for SMA in a new therapeutic era // *Gene Ther*. 2017. Vol. 24, N 9. P. 529–533. doi: 10.1038/gt.2017.52
9. Al-Zaidy S.A., Mendell J.R. From clinical trials to clinical practice: practical considerations for gene replacement therapy in SMA type 1 // *Pediatr Neurol*. 2019. Vol. 100. P. 3–11. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.06.007
10. Cho S., Dreyfuss G.A. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity // *Genes Dev*. 2010. Vol. 24, N 5. P. 438–442. doi: 10.1101/gad.1884910
11. Zhang R., So B.R., Li P., et al. Structure of a key intermediate of the SMN complex reveals Gemin2's crucial function in snRNP assembly // *Cell*. 2011. Vol. 146, N 3. P. 384–395. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.043
12. Raker V.A., Plessel G., Lührmann R. The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro // *EMBO J*. 1996. Vol. 15, N 9. P. 2256–2269. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00579.x
13. Helmken C., Hofmann Y., Schoenen F., et al. Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1 // *Hum Genet*. 2003. Vol. 114, N 1. P. 11–21. doi: 10.1007/s00439-003-1025-2

14. Yi H., Mu L., Shen C., et al. Negative cooperativity between Gemin2 and RNA provides insights into RNA selection and the SMN complex's release in snRNP assembly // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, N 2. P. 895–911. doi: 10.1093/nar/gkz1135
15. Friesen W.J., Paushkin S., Wyce A., et al. The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins // *Mol Cell Biol.* 2001. Vol. 21, N 24. P. 8289–8300. doi: 10.1128/MCB.21.24.8289-8300.2001
16. Friesen W.J., Wyce A., Paushkin S., et al. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins // *J Biol Chem.* 2002. Vol. 277, N 10. P. 8243–8247. doi: 10.1074/jbc.M109984200
17. Chari A., Golas M.M., Klingenhäger M., et al. An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs // *Cell.* 2008. Vol. 135, N 3. P. 497–509. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.020
18. Grimm C., Chari A., Pelz J.P., et al. Structural basis of assembly chaperone-mediated snRNP formation // *Mol Cell.* 2013. Vol. 49, N 4. P. 692–703. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.009
19. Sarachan K.L., Valentine K.G., Gupta K., et al. Solution structure of the core SMN-Gemin2 complex // *Biochem J.* 2012. Vol. 445, N 3. P. 361–370. doi: 10.1042/BJ20120241
20. Kannan A., Bhatia K., Branzel D., Gangwani L. Combined deficiency of Senataxin and DNA-PKcs causes DNA damage accumulation and neurodegeneration in spinal muscular atrophy // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, N 16. P. 8326–8346. doi: 10.1093/nar/gky641
21. Sharma A., Singh K., Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage // *Methods Mol Biol.* 2012. Vol. 920. P. 613–626. doi: 10.1007/978-1-61779-998-3_40
22. Caraballo-Miralles V., Cardona-Rossinyol A., Garcera A., et al. SMN deficiency attenuates migration of U87MG astrogloma cells through the activation of RhoA // *Mol Cell Neurosci.* 2012. Vol. 49, N 3. P. 282–289. doi: 10.1016/j.mcn.2011.12.003
23. Coque E., Raoul C., Bowerman M. ROCK inhibition as a therapy for spinal muscular atrophy: understanding the repercussions on multiple cellular targets // *Front Neurosci.* 2014. Vol. 8. P. 271. doi: 10.3389/fnins.2014.00271
24. Messina S., Sframeli M. New treatments in spinal muscular atrophy: positive results and new challenges // *J Clin Med.* 2020. Vol. 9, N 7. P. 2222. doi: 10.3390/jcm9072222
25. Shpargel K.B., Matera A.G. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. Vol. 102, N 48. P. 17372–17377. doi: 10.1073/pnas.0508947102
26. Wan L., Battle D.J., Yong J., et al. The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy // *Mol Cell Biol.* 2005. Vol. 25, N 13. P. 5543–5551. doi: 10.1128/MCB.25.13.5543-5551.2005
27. Wan L., Ottinger E., Cho S., Dreyfuss G. Inactivation of the SMN complex by oxidative stress // *Mol Cell.* 2008. Vol. 31, N 2. P. 244–254. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.004
28. Kye M.J., Niederst E.D., Wertz M.H., et al. SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway // *Hum Mol Genet.* 2014. Vol. 23, N 23. P. 6318–6331. doi: 10.1093/hmg/ddu350
29. Querfurth H., Lee H.K. Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration // *Mol Neurodegener.* 2021. Vol. 16. P. 44. doi: 10.1186/s13024-021-00428-5
30. Feschenko M., Bergelson S., Leyme A.C., inventors. Potency assays for viral vector production. United States patent US 2022/0267798A1. 2022.
31. Staněk D., Fox A.H. Nuclear bodies: new insights into structure and function // *Curr Opin Cell Biol.* 2017. Vol. 46. P. 94–101. doi: 10.1016/j.ccb.2017.05.001
32. Morimoto M., Boerkoel C.F. The role of nuclear bodies in gene expression and disease // *Biology (Basel).* 2013. Vol. 2, N 3. P. 976–1033. doi: 10.3390/biology2030976
33. Jablonka S., Holtmann B., Meister G., et al. Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002. Vol. 99, N 15. P. 10126–10131. doi: 10.1073/pnas.152318699
34. Helmken C., Hofmann Y., Schoenen F., et al. Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1 // *Hum Genet.* 2003. Vol. 114. P. 11–21. doi: 10.1007/s00439-003-1025-2
35. Wang J., Dreyfuss G. A cell system with targeted disruption of the SMN gene: functional conservation of the SMN protein and dependence of Gemin2 on SMN // *J Biol Chem.* 2001. Vol. 276, N 13. P. 9599–9605. doi: 10.1074/jbc.M009162200

REFERENCES

1. <https://www.ema.europa.eu/> [Internet]. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. In: European medical agency. *Scientific guideline* [cited: 18.12.2022]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-preclinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products-scientific-guideline>
2. Potency tests for cellular and gene therapy products. In: U.S. Food and Drug Administration. *Final guidance for industry: January 2011* [cited: 18.12.2022]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/potency-tests-cellular-and-gene-therapy-products>
3. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). In: U.S. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: January 2020* [cited: 18.12.2022]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug>
4. Human gene therapy for rare diseases. In: U.S. Food and Drug Administration. *Guidance for industry: January 2020* [cited: 18.12.2022]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/human-gene-therapy-rare-diseases>
5. Burden N, Clift MJD, Jenkins GJS, et al. Opportunities and challenges for integrating new in vitro methodologies in hazard testing and risk assessment. *Small.* 2021;17(15):2006298. doi: 10.1002/smll.202006298

6. Hartung T, Daston G. Are in vitro tests suitable for regulatory use? *Toxicol Sci.* 2009;111(2):233–237. doi: 10.1093/toxsci/kfp149
7. Hartung T. Perspectives on in vitro to in vivo extrapolations. *Appl In Vitro Toxicol.* 2018;4(4):305–316. doi: 10.1089/aivt.2016.0026
8. Talbot K, Tizzano EF. The clinical landscape for SMA in a new therapeutic era. *Gene Ther.* 2017;24(9):529–533. doi: 10.1038/gt.2017.52
9. Al-Zaidy SA, Mendell JR. From clinical trials to clinical practice: practical considerations for gene replacement therapy in SMA type 1. *Pediatr Neurol.* 2019;100:3–11. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.06.007
10. Cho S, Dreyfuss GA. A degtron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev.* 2010;24(5):438–442. doi: 10.1101/gad.1884910
11. Zhang R, So BR, Li P, et al. Structure of a key intermediate of the SMN complex reveals Gemin2's crucial function in snRNP assembly. *Cell.* 2011;146(3):384–395. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.043
12. Raker VA, Plessel G, Lührmann R. The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J.* 1996;15(9):2256–2269. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00579.x
13. Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, et al. Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet.* 2003;114(1):11–21. doi: 10.1007/s00439-003-1025-2
14. Yi H, Mu L, Shen C, et al. Negative cooperativity between Gemin2 and RNA provides insights into RNA selection and the SMN complex's release in snRNP assembly. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(2):895–911. doi: 10.1093/nar/gkz1135
15. Friesen WJ, Paushkin S, Wyce A, et al. The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol.* 2001;21(24):8289–8300. doi: 10.1128/MCB.21.24.8289-8300.2001
16. Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, et al. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem.* 2002;277(10):8243–8247. doi: 10.1074/jbc.M109984200
17. Chari A, Golas MM, Klingenhäger M, et al. An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal snRNPs. *Cell.* 2008;135(3):497–509. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.020
18. Grimm C, Chari A, Pelz JP, et al. Structural basis of assembly chaperone-mediated snRNP formation. *Mol Cell.* 2013;49(4):692–703. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.009
19. Sarachan KL, Valentine KG, Gupta K, et al. Solution structure of the core SMN-Gemin2 complex. *Biochem J.* 2012;445(3):361–370. doi: 10.1042/BJ20120241
20. Kannan A, Bhatia K, Branzei D, Gangwani L. Combined deficiency of Senataxin and DNA-PKcs causes DNA damage accumulation and neurodegeneration in spinal muscular atrophy. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(16):8326–8346. doi: 10.1093/nar/gky641
21. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol.* 2012;920:613–626. doi: 10.1007/978-1-61779-998-3_40
22. Caraballo-Miralles V, Cardona-Rossinyol A, Garcera A, et al. SMN deficiency attenuates migration of U87MG astrogloma cells through the activation of RhoA. *Mol Cell Neurosci.* 2012;49(3):282–289. doi: 10.1016/j.mcn.2011.12.003
23. Coque E, Raoul C, Bowerman M. ROCK inhibition as a therapy for spinal muscular atrophy: understanding the repercussions on multiple cellular targets. *Front Neurosci.* 2014;8:271. doi: 10.3389/fnins.2014.00271
24. Messina S, Sframeli M. New treatments in spinal muscular atrophy: positive results and new challenges. *J Clin Med.* 2020;9(7):2222. doi: 10.3390/jcm9072222
25. Shpargel KB, Matera AG. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(48):17372–17377. doi: 10.1073/pnas.0508947102
26. Wan L, Battle DJ, Yong J, et al. The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. *Mol Cell Biol.* 2005;25(13):5543–5551. doi: 10.1128/MCB.25.13.5543-5551.2005
27. Wan L, Ottinger E, Cho S, Dreyfuss G. Inactivation of the SMN complex by oxidative stress. *Mol Cell.* 2008;31(2):244–254. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.004
28. Kye MJ, Niederst ED, Wertz MH, et al. SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. *Hum Mol Genet.* 2014;23(23):6318–6331. doi: 10.1093/hmg/ddu350
29. Querfurth H, Lee HK. Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2021;16:44. doi: 10.1186/s13024-021-00428-5
30. Feschenko M, Bergelson S, Leyme AC, inventors. *Potency assays for viral vector production.* United States patent US 2022/0267798A1. 2022.
31. Staněk D, Fox AH. Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;46:94–101. doi: 10.1016/j.ceb.2017.05.001
32. Morimoto M, Boerkoel CF. The role of nuclear bodies in gene expression and disease. *Biology (Basel).* 2013;2(3):976–1033. doi: 10.3390/biology2030976
33. Jablonka S, Holtmann B, Meister G, et al. Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(15):10126–10131. doi: 10.1073/pnas.152318699
34. Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, et al. Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet.* 2003;114:11–21. doi: 10.1007/s00439-003-1025-2
35. Wang J, Dreyfuss G. A cell system with targeted disruption of the SMN gene: functional conservation of the SMN protein and dependence of Gemin2 on SMN. *J Biol Chem.* 2001;276(13):9599–9605. doi: 10.1074/jbc.M009162200

ОБ АВТОРАХ

*** Роденков Евгений Михайлович**, аспирант;
адрес: Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, д. 14;
ORCID: 0009-0007-7295-2405;
e-mail: rodenkov.evgenij@pharminnotech.com

Кожемякина Наталья Владимировна, к.б.н.;
ORCID: 0009-0002-5951-4973;
e-mail: Kozhemyakina@biocad.ru

Зонис Юлия Александровна;
ORCID: 0009-0003-6537-3705;
e-mail: zonis@biocad.ru

Гершович Павел Михайлович, к.б.н.;
ORCID: 0000-0002-1202-6721;
e-mail: gershovich@biocad.ru

Лалаев Борис Юрьевич, к.х.н.;
ORCID: 0000-0002-5714-2443;
eLibrary SPIN: 4030-3540;
e-mail: boris.lalaev@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

*** Evgeny M. Rodenkov**, PhD, Student;
address: 14 Professor Popov street, 197376 Saint Petersburg,
Russian Federation;
ORCID: 0009-0007-7295-2405;
e-mail: rodenkov.evgenij@pharminnotech.com

Natalya V. Kozhemyakina, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: 0009-0002-5951-4973;
e-mail: Kozhemyakina@biocad.ru

Yulia A. Zonis;
ORCID: 0009-0003-6537-3705;
e-mail: zonis@biocad.ru

Pavel M. Gershovich, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: 0000-0002-1202-6721;
e-mail: gershovich@biocad.ru

Boris Y. Lalaev, Cand. Sci. (Chem.);
ORCID: 0000-0002-5714-2443;
eLibrary SPIN: 4030-3540;
e-mail: boris.lalaev@pharminnotech.com