

## Возможности новых технологий геномного редактирования в лечении X-сцепленной аденолейкодистрофии

В.Ю. Воинова, М.А. Школьникова, Е.А. Николаева

ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева»  
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

## New genome editing technologies in the treatment of X-linked adrenoleukodystrophy

V.Yu. Voinova, M.A. Shkolnikova, E.A. Nikolaeva

Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

X-сцепленная аденолейкодистрофия – тяжелое прогрессирующее неврологическое заболевание, которое преимущественно встречается у пациентов мужского пола и вызывается мутациями X-сцепленного гена *ABCD1*, кодирующего пероксисомный транспортный белок. Заболевание клинически характеризуется двумя основными фенотипами: детская церебральная форма (наиболее тяжелая) и аденомиелоневропатия. В лечении болезни применяются аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток от здорового донора, что позволяет остановить прогрессирование, и генотерапия с использованием самоактивирующегося лентивирусного вектора, несущего функциональный ген *ABCD1*. Каждый из перечисленных методов имеет свои ограничения. Мы предлагаем и теоретически обосновываем альтернативный подход к лечению аденолейкодистрофии, при котором предлагается провести модификацию аутологических клеток CD34+, полученных от самого пациента, с помощью геномного редактирования, что позволит заменить мутантную последовательность ДНК гена *ABCD1* на последовательность дикого типа, при этом мутантный белок в отредактированных клетках будет заменен. Способами введения отредактированных аутологических клеток CD34+ могут быть их трансплантация в костный мозг или серия повторных внутривенных инфузий. Данный способ терапии позволит избежать как поиска донора, так и реакции «трансплантат против хозяина».

**Ключевые слова:** дети, X-сцепленная аденолейкодистрофия, ген *ABCD1*, лечение, геномное редактирование, CRISPR/Cas9, клетки CD34+.

**Для цитирования:** Воинова В.Ю., Школьникова М.А., Николаева Е.А. Возможности новых технологий геномного редактирования в лечении X-сцепленной аденолейкодистрофии. Рос вестн перинатол и педиатр 2020; 65:(2): 104–107. DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-2-104-107

X-linked adrenoleukodystrophy is a severe progressive neurological disease that is predominantly found in male patients and caused by mutations in the X-linked *ABCD1* gene encoding peroxisome transport protein. The disease is clinically characterized by two main phenotypes: the most severe infant cerebral form and adrenomyeloneuropathy. The disease is treated by allogeneic transplantation of hematopoietic cells from a healthy donor to stop progression, and gene therapy with a self-activating lentiviral vector, the carrier of the functional gene *ABCD1*. Each method has its own limitations.

The authors present and theoretically substantiate an alternative approach to the treatment of adrenoleukodystrophy; they propose to modify the autologous CD34+ cells from the patient using genomic editing, in order to replace the mutant DNA sequence of *ABCD1* gene with a wild-type sequence, while replacing the mutant protein in the edited cells.

The edited autologous CD34+ cells can be introduced by their transplantation into the bone marrow or by a series of repeated intravenous infusions. This method will allow avoiding both the search for a donor and the graft-versus-host reaction.

**Key word:** children, X-linked adrenoleukodystrophy, *ABCD1* gene, treatment, genome editing technology, CRISPR/Cas9, CD34+ cells.

**For citation:** Voinova V.Yu., Shkolnikova M.A., Nikolaeva E.A. New genome editing technologies in the treatment of X-linked adrenoleukodystrophy. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2020; 65:(2): 104–107 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-2-104-107

X-сцепленная аденолейкодистрофия – тяжелое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся сочетанным пораже-

нием периферической, центральной нервной систем и надпочечников.

Заболевание относится к редким (орфанным; OMIM: 300100) и вызывается мутациями в гене *ABCD1*, который кодирует пероксисомный белок – АТФ-связывающий кассетный транспортер (*ABCD1*). Белок *ABCD1* участвует в транспорте CoA-активированных жирных кислот с очень длинной цепью (VLCFA) в пероксисомы, где они подвергаются распаду. Накопление активированных жирных кислот в случае нарушения их транспорта вследствие мутаций гена *ABCD1* ведет к демиелинизации в головном мозге и аксональной дисфункции в спинном мозге и как следствие – к спастической параплегии, а также к недостаточности надпочечников и в некоторых случаях дисфункции гонад.

© Коллектив авторов, 2020

**Адрес для корреспонденции:** Воинова Виктория Юрьевна – д.м.н., гл. науч. сотр. отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева,  
ORCID: 0000-0001-8491-0228  
e-mail: vivoinova@yandex.ru

Школьникова Мария Александровна – д.м.н., проф., засл. деятель науки РФ, научный руководитель Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева,  
ORCID: 0000-0001-7115-0186

Николаева Екатерина Александровна – д.м.н., рук. отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0001-7146-7220  
125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

X-сцепленная аденолейкодистрофия – наиболее распространенное пероксисомное заболевание с частотой 1:20 тыс новорожденных. среди новорожденных [1]. Она преимущественно встречается у пациентов мужского пола и клинически проявляется двумя основными фенотипами: аденомиелоневропатией и церебральной формой. У 50% гетерозиготных женщин имеется манифестация симптомов в более позднем, чем у мужчин, возрасте. Около 2/3 пациентов имеют детскую церебральную форму заболевания, которая является наиболее тяжелой. Для заболевания характерно, что после кажущегося нормальным развития в раннем детстве в возрасте от 4 до 10 лет наступает быстрая неврологическая дегенерация, приводящая в конечном итоге к летальному исходу [2, 3]. По мере прогрессирования аденолейкодистрофии развивается спастический тетрапарез, нарушаются все виды чувствительности и функции тазовых органов, возникают поражение зрения и слуха, эпилепсия. У большинства пациентов имеются психические расстройства и нарушения интеллекта. Наблюдаются гиперактивное или, наоборот, аутистическое поведение, агрессивность, снижение памяти и внимания, депрессивные состояния. Признаки надпочечниковой недостаточности могут предшествовать появлению психоневрологических расстройств. Поражение надпочечников проявляется снижением продукции глюкокортикоидов, а затем и минералокортикоидов, что может вызвать слабость, потерю массы тела, гиперпигментацию кожи, рвоту и коматозные состояния.

В лечении X-сцепленной аденолейкодистрофии с 90-х годов XX века применяется аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток от здорового донора с целью остановки прогрессирования болезни. В случае успешной трансплантации донорские гемопоэтические стволовые клетки приживаются в костном мозге и распределяются по всему организму, включая периферические ткани и центральную нервную систему, они служат постоянным эндогенным источником недостающего белка ABCD1. Тем самым замедляется прогрессирование данного метаболического заболевания [4].

Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток от здорового донора проявила эффективность при ряде метаболических заболеваний за счет «перекрестной коррекции» нарушений обмена веществ. Примером служат лизосомные болезни накопления [5]. В головном мозге донорские клетки микроглии миелоидного происхождения считаются источником недостающего белка после трансплантации, тем самым перекрестно исправляя метаболический дефект в пораженных клетках больного.

Тем не менее данный метод лечения X-сцепленной аденолейкодистрофии имеет ограничения. Так, аллогенная трансплантация наиболее

эффективна на очень ранней стадии заболевания, что ограничивает терапевтические возможности для ювенильной или взрослой форм. Кроме того, аллогенная трансплантация сопряжена с опасностью реакции «трансплантат против хозяина», с токсичностью режима подготовки к трансплантации (миелоабляции) и со сложностью подбора донора.

**Генотерапия X-сцепленной аденолейкодистрофии.** В последние годы получает развитие метод генотерапии аденолейкодистрофии с использованием самоактивирующегося лентивирусного вектора, несущего функциональный ген *ABCD1*, для исправления генетического дефекта путем интрацеребральной инъекции лентивирусного вектора с нормальным геном [6]. Исследование возможностей генной терапии ведется у пациентов, для которых не было найдено подходящих доноров для трансплантации гемопоэтических клеток. Аутологичные клетки CD34+ забирают у пациентов, генетически модифицируют *ex vivo* с помощью лентивирусного вектора, кодирующего *ABCD1* дикого типа, и затем повторно вводят пациентам после того, как они получают миелоабляционное лечение. Результаты показывают, что в течение периода наблюдения 30 мес обнаруживается поликлональное восстановление, при котором до 14% гранулоцитов, моноцитов и Т- и В-лимфоцитов экспрессируют белок ABCD1. Начиная с 14–16 мес после инфузии генетически исправленных клеток прогрессирующая демиелинизация головного мозга у пациентов прекращается, клинический результат сопоставим с таковым, достигнутым при аллогенной трансплантации [7]. Более отдаленные результаты применения лентивирусного вектора еще предстоит оценить.

Однако генотерапия при X-сцепленной аденолейкодистрофии также имеет некоторые ограничения. Так, белок ABCD1 функционирует в форме гомо-и гетеродимера [8]. При этом генотерапия, привнося белок ABCD1 дикого типа, не удаляет из клеток пациента мутантный белок, что может приводить к взаимодействию нормальной и мутантной субъединиц при образовании димера, нарушению функции последнего и, следовательно, недостаточной эффективности данного метода лечения.

**Геномное редактирование соматических клеток пациентов *ex vivo*.** Проанализировав новые возможности лечения, ставшие доступными с появлением геномного редактирования, мы предлагаем альтернативный подход к лечению аденолейкодистрофии, при котором с целью остановки прогрессирования болезни предполагается провести модификацию аутологичных, полученных от самого пациента клеток CD34+ с помощью геномного редактирования с последующей их трансплантацией пациенту. Геномное редактирование позволит заменить мутантную последова-

тельность ДНК гена *ABCD1* на последовательность дикого типа, при этом мутантный белок в редактированных клетках больше не будет образовываться. Способами введения редактированных аутологичных клеток CD34+ могут быть их трансплантация в костный мозг или серия повторных внутривенных инфузий. Данный способ терапии позволит избежать как поиска донора, так и реакции «трансплантат против хозяина».

Основаниями для ожидания положительного результата от предлагаемой терапии послужили в первую очередь успешные попытки использования редактирования генома с лечебной целью при ряде метаболических болезней. В частности, геномное редактирование исследуется и уже применяется при лечении мукополисахаридозов. При этих заболеваниях, так же, как и при X-сцепленной адренолейкодистрофии, наиболее широко применяемые варианты лечения включают трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, которая несет значительный риск смерти и развития осложнений, а также заместительную ферментную терапию, обуславливающую необходимость пожизненных инфузий замещающего фермента [9]. Ни один из упомянутых методов не обеспечивает адекватный оптимальный результат, даже в комбинации.

Необходимость поиска более эффективных методов лечения мукополисахаридозов привела к исследованию потенциального терапевтического эффекта геномного редактирования на модельных животных с данной патологией, в фибробластах и гемопоэтических клетках пациентов. Так, на мышинной модели мукополисахаридоза I типа, связанного с дефицитом лизосомальной гидролазы  $\alpha$ -L-идуронидазы, были показаны преимущества метода редактирования генома *in vivo* с помощью сконструированных нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN). Корректирующую копию гена *IDUA* вставляли в локус альбумина в гепатоцитах, что приводило к устойчивой экспрессии фермента, секреции его из печени в кровоток и последующему системному поглощению, достаточному для коррекции метаболического заболевания и предотвращения его биохимических и клинических признаков, в том числе нарушений поведения у мышей [10, 11].

Другими исследователями был продемонстрирован эффективный подход *ex vivo* для редактирования генома с использованием технологии CRISPR/Cas9 в фибробластах, гомозиготных по частой мутации Trp402\* гена *IDUA*: редактирование мутации привело к стойкому увеличению продукции фермента *IDUA*. Перспективным представляется использование липосом в качестве невирусных носителей системы CRISPR/Cas9 в данной работе [12]. В настоящее время проводятся клинические исследования геномного редактирования у 12 пациентов с мукополисахаридозами I и II типов с использованием

технологии «цинковых пальцев» с доставкой ZFN с помощью аденоассоциированного вируса (клинические исследования EMPOWERS и CHAMPIONS) [13–15]. У первого взрослого 44-летнего больного с мукополисахаридозом II типа, у которого было проведено редактирование связанной с этим заболеванием мутации в гене *IDS*, за 2 года, прошедшие после редактирования соматических клеток, наблюдается уменьшение выраженности клинических признаков болезни. Применяемая терапия в упомянутых клинических исследованиях не была связана с какими-либо зарегистрированными побочными эффектами.

В качестве альтернативного способа введения *ex vivo* модифицированных клеток пациента можно рассматривать внутривенные инфузии. Например, описаны терапевтические эффекты, опосредованные мезенхимальными стромальными клетками при лечении заболеваний легких. В частности, сообщалось об успешных повторных внутривенных введениях аллогенных мезенхимальных стромальных клеток при хронической дыхательной недостаточности вследствие мутации гена *FLNA* [16]. Впервые это лечение использовалось в качестве жизненно необходимой спасательной терапии у 18-месячного ребенка с новым патогенным вариантом гена *FLNA*, который в состоянии необратимой хронической дыхательной недостаточности получал повторные внутривенные вливания аллогенных мезенхимальных стромальных клеток. Состояние больного постепенно улучшилось, при этом нежелательных явлений, связанных с инфузиями, не наблюдалось.

Среди ожидаемых ограничений геномного редактирования в терапии X-сцепленной адренолейкодистрофии и других моногенных заболеваний следует указать крайне высокую стоимость технологии с использованием ZFN. Менее затратная технология CRISPR/Cas требует доработки из-за наблюдаемых эффектов редактирования *off target*. В то же время попытки ее совершенствования дают обнадеживающие результаты, поскольку последние модификации данной технологии на примере серповидноклеточной анемии (ген *HBB*) и болезни Тея–Сакса (ген *HEXA*) позволяют существенно сократить уровень эффектов *off target* [17]. Авторы подчеркивают, что предлагаемое ими так называемое редактирование генома без двуцепочечных разрывов или донорской ДНК позволит корректировать до 89% всех известных генетических вариантов, связанных с заболеваниями человека.

Проанализированные исследования применения геномного редактирования соматических клеток пациентов для развития новых методов терапии метаболических заболеваний вселяют надежду на успешное развитие метода эффективного лечения адренолейкодистрофии в обозримом будущем.

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. ORPHANET. X-linked adrenoleukodystrophy. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Expert=43](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=43) (accessed on 03 Dec 2019.)
2. Новиков П.В., Михайлова С.В., Захарова Е.Ю., Воинова В.Ю. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению X-сцепленной аденолейкодистрофии. М., 2013. <https://med-gen.ru/docs/adrenoleikodistrofiya.pdf>. [Novikov P.V., Mikhajlova S.V., Zakharova E.Yu., Voynova V.Yu. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of X-linked adrenoleukodystrophy. Moscow, 2013. (in Russ.)]
3. Воинова В.Ю., Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Умственная отсталость и хромосома X. М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2016; 219. [Voynova V.Yu., Yurov I.Yu., Vorsanova S.G., Yurov Yu.B. Mental retardation and chromosome X. Moscow: Izdatel'skii dom Akademii Estestvoznaniya, 2016; 219. (in Russ.)]
4. Peters C., Charnas L.R., Tan Y., Ziegler R.S., Shapiro E.G., DeFor T. et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* 2004; 104: 881–888.
5. Lund T.C. Hematopoietic stem cell transplant for lysosomal storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013; 11 (Suppl 1): 91–98.
6. Lentiviral Gene Therapy for X-ALD. Phase I/II clinical trial of gene therapy for treating X-linked adrenoleukodystrophy using a high-safety, high-efficiency, self-inactivating lentiviral vector TYF-ABCD1 to functionally correct the defective gene. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03727555> (accessed on 09 Jan 2020)
7. Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C., Bougnères P., Schmidt M., Kalle C.V. et al. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol* 2012; 507: 187–198. DOI: 10.1016/B978-0-12-386509-0.00010-7.
8. Kawaguchi K., Morita M. ABC Transporter Subfamily D: Distinct Differences in Behavior between ABCD1-3 and ABCD4 in Subcellular Localization, Function, and Human Disease. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 6786245. DOI: 10.1155/2016/6786245
9. Gugliani R., Vieira T.A., Carvalho C.G., Muñoz-Rojas M.V., Semyachkina A.N., Voynova V.Yu. et al. Immune tolerance induction for laronidase treatment in mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab Rep* 2017; 10: 61–66. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2017.01.004
10. Ou L., DeKaveler R.C., Rohde M., Tom S., Radeke R., St Martin S.J. et al. ZFN-Mediated In Vivo Genome Editing Corrects Murine Hurler Syndrome. *Mol Ther* 2019; 27 (1): 178–187. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.10.018
11. Gomez-Ospina N., Scharenberg S.G., Mostrel N., Bak R.O., Mantri S. et al. Human genome edited hematopoietic stem cells phenotypically correct Mucopolysaccharidosis type I. *Nat Comm* 2019; 10 (1): 4045. DOI: 10.1038/s41467-019-11962-8
12. Schuh R.S., Poletto É., Pasqualim G., Tavares A.M.V., Meyer F.S., Gonzalez E.A. et al. In vivo genome editing of mucopolysaccharidosis I mice using the CRISPR/Cas9 system. *J Control Release* 2018; 288: 23–33. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.08.031
13. Harmatz P., Muenzer J., Burton B.K. Update on phase 1/2 clinical trials for MPS I and MPS II using ZFN-mediated in vivo genome editing. *Mol Genet Metab* 2018; 123 (2): S59–S60. DOI: 10.1016/j.ymgme.2017.12.143
14. Ascending Dose Study of Genome Editing by the Zinc Finger Nuclease (ZFN) Therapeutic SB-318 in Subjects With MPS I. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02702115> (accessed on 09 Jan 2020).
15. Ascending Dose Study of Genome Editing by the Zinc Finger Nuclease (ZFN) Therapeutic SB-913 in Subjects With MPS II. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03041324> (accessed on 09 Jan 2020).
16. Pelizzo G., Avanzini M.A., Lenta E. Mantelli M., Croce S., Catenacci L. et al. Allogeneic mesenchymal stromal cells: Novel therapeutic option for mutated FLNA-associated respiratory failure in the pediatric setting. *Pediatr Pulmonol* 2020; 55 (1): 190–197. DOI: 10.1002/ppul.24497
17. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019; 576 (7785): 149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4

Поступила: 28.01.20

Received on: 2020.01.28

### Источник финансирования:

Исследование проведено в рамках финансирования Госзадания «Анализ клинико-генетического полиморфизма инвалидирующих моногенных заболеваний у детей для прогнозирования их течения и определения молекулярных мишеней для оптимизации лечения» АААА-А18-118051790107-2

### Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### Source of financing:

The study was carried out within the framework of state Funding «Analysis of clinical and genetic polymorphism of disabled monogenic diseases in children to predict their course and identify molecular targets for optimizing treatment» АААА-А18-118051790107-2

### Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest, which should be reported.