

GENE THERAPY IN MUCOVISCIDOSIS

Novruzova M.,*Doctor of Philosophy in Biology, associate professor***Talibova J.,***Doctor of Philosophy in Medicine, senior lecturer***Gasimova M.,***assistant***Muradova S.,***Doctor of Philosophy in Biology, senior lecturer***Suleymanova T.***Doctor of Philosophy in Biology, senior lecturer**Department of Medical Microbiology and Immunology, Azerbaijan Medical University**Azerbaijan, Baku*

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ

Новрузова М.С.*Доктор философии по биологии, доцент***Талибова С.Х.***Доктор философии в медицине, старший преподаватель***Гасимова М.Ч.***ассистент***Мурадова С.А.***Доктор философии по биологии, старший преподаватель***Сулейманова Т.Х.***Доктор философии по биологии, старший преподаватель**Кафедра Медицинской Микробиологии и Иммунологии,**Азербайджанский Медицинский Университет.**Азербайджан, Баку*<https://doi.org/10.5281/zenodo.10138134>**Abstract**

The article describes the advantage of the CRISPR-Cas 9 gene editing method for the treatment of cystic fibrosis. This method uses plasmids that contain CRISPR-Cas 9 components in the form of DNA, a nuclease expression cassette, and a bay RNA cassette. The advantage of the method is that no matter how CRISPR-Cas 9 is delivered to the cell, it immediately removes some gene fragment or replaces it. And this change remains forever in the cell, and in the descendant of this cell, we hope that this method of treatment will reduce the number of deaths in cystic fibrosis.

Аннотация

В статье описано преимущество метода лечения муковисцидоза геном редактирования CRISPR-Cas 9. В этом методе используются плазмиды в которых содержатся компоненты CRISPR-Cas 9 в виде ДНК, экспрессионная кассета с нуклеазой и кассета с гидовой РНК. Преимущество метода заключается в том, что независимо каким способом CRISPR-Cas 9 доставлена в клетку, она сразу же удаляет какой-то фрагмент гена или замещает его. И это изменение навсегда остается в клетке и в потомке этой клетки, и мы надеемся, что этот метод лечения уменьшит количество смертных случаев при муковисцидозе.

Keywords: cystic fibrosis, CRISPR-CAS-9, gene fragment, cell, mitochondria.**Ключевые слова:** муковисцидоз, CRISPR-CAS-9, фрагмент гена, клетка, митохондрия.

Муковисцидоз (Кистозный фиброз) является наиболее распространенным неизлечимым генетическим заболеванием со смертельным исходом, поражающим около 90 000 человек во всем мире. Это аутосомно-рецессивное заболевание, требующее мутаций в гене CF в обоих генетических аллелях [1]. Муковисцидоз - на сегодняшний момент неизлечимое заболевание. Для лечения часто пользуются генной терапией. Генное редактирование методом CRISPR-Cas9 имеет некоторое - преимущество перед классической генной терапией, и в

данном случае у него есть перспективы. Основная причина смерти при муковисцидозе - поражение легких и легочная недостаточность. Пациенты с муковисцидозом всю жизнь страдают от хронического воспаления в легких и вынуждены постоянно принимать антибиотики и другие препараты, которые их не излечивают. При муковисцидозе поражаются и другие органы, например, поджелудочная железа, но в этом случае довольно эффективна ферментозаместительная терапия, поэтому в первую

очередь необходимо купировать легочные симптомы. Органоиды легких - отличная модель легких *in vitro*. Органоиды состоят из разных типов клеток легких, которые взаимодействуют друг с другом, образуя такой мини-орган. Проводя эксперименты на органоидах, можно определить, в какие клетки поступает CRISPR-Cas9, где происходит редактирование, достаточно ли его для терапевтического эффекта [2, 3]. Новый инструмент редактирования генов, используемый бактериями для защиты от бактериофагов, называется сгруппированными короткими палиндромными повторами с регулярными интервалами (CRISPR) и его ферментом, ассоциированным с CRISPR белком 9 (Cas9), культивируемые клетки млекопитающих. Точное редактирование системы CRISPR-Cas9 наряду с универсальным использованием системы для подавления генов путем удаления части гена или замены гена нужным сделало систему CRISPR-Cas9 предпочтительным инструментом редактирования генов. Более того, относительная простота создания конкретного целевого сайта и низкая стоимость позволяют проводить эффективное редактирование генов в течение относительно короткого периода времени. CRISPR-Cas9 состоит из двух основных модулей: направляющей РНК (гРНК) и белкового фермента Cas9. ГРНК предназначена для распознавания определенного мотива последовательности рядом с сайтом-мишенью и рекрутирует белок Cas9 для разрезания и создания двухцепочечного разрыва ДНК (DSB).

Затем активируются естественные механизмы восстановления ДНК клетки для восстановления расщепленной ДНК посредством NHEJ или HDR. NHEJ напрямую лигирует сломанные концы и может создавать «вставки» или делеции генов, эффективно создавая мутанты. Однако с шаблоном восстановления HDR сделает возможной гомологичную рекомбинацию. Этот метод полезен для введения желаемого гена (или версии гена дикого типа). Однако частота HDR очень низкая и поэтому эффективность «восстановления» или замены мутантного гена остается проблемой [4]. *Базовое редактирование*: классическая зависимость системы CRISPR-Cas9 от введения DSB создает проблему эффективности, поскольку нежелательные случайные вставки или делеции (вставки) чаще происходят в сайтах расщепления ДНК, чем HDR. Таким образом, редактирование оснований было впервые использовано для повышения эффективности системы CRISPR-Cas9 за счет полного обхода необходимости в DSB, позволяя осуществлять прямое преобразование одного основания ДНК в другое без DSB в целевом локусе. Редакторы оснований цитозина (CBEs) облегчают постоянное преобразование пар оснований CG в пары TA, в то время как редакторы оснований аденина (ABEs) ферментативно конвертируют пары оснований AT в пары оснований G C. В контексте CF базовое редактирование могло бы стать привлекательным новым инструментом лечения CF, поскольку многие *CFTR* варианты могут быть спасены с помощью замены одной пары оснований [5, 6]. Предупреждением о

редактировании базы является ограничение только 4 возможными преобразованиями базы в базу, и это слишком велико для определенных векторов доставки генов.

Основное редактирование. В последнее время основное редактирование стало привлекательным усовершенствованием набора инструментов CRISPR. Эта технология редактирования генов позволяет редактировать определенную последовательность ДНК различной длины в целевом сайте с помощью комплекса слияния, состоящего из каталитически нарушенного белка Cas9 и сконструированной обратной транскриптазы. Первичная направляющая РНК для редактирования (pegRNA) кодирует желаемое редактирование гена и направляет слитый комплекс к целевому сайту. Первичное редактирование в качестве возможной терапевтической технологии замены генов очень многообещающе в контексте муковисцидоза, учитывая, что наиболее распространенный вариант *CFTR* (*CFTR*-F508del) был репарирован с помощью первичного редактирования кишечных органоидов, полученных от пациентов. Тем не менее, первичное редактирование действительно приводило к различной степени эффективности нацеливания, и также наблюдались нежелательные нецелевые мутации. Тем не менее, поскольку ген *CFTR* велик, и полная замена мутантного гена геном *CFTR* дикого типа, вероятно, будет неэффективной, первичное редактирование является ведущим методом борьбы с огромным количеством вариантов, вызывающих заболевание CF [7, 8].

В этом методе используется плазмиды, в которых содержатся компоненты CRISPR-Cas9 в виде ДНК, экспрессионная кассета с нуклеазой и кассета с гидовой РНК. Гидовые РНК клонируются в плазмиды, а нуклеазы в другие компоненты CRISPR-Cas9. Эти плазмиды наращиваются в кишечной палочке, затем выделяются и трансфицируются в клетки. Клетки получены от пациентов с наследственными заболеваниями, то есть с мутациями. После трансфекции через несколько дней выделяется ДНК и оценивается эффективность редактирования. А затем проводятся дополнительные функциональные тесты на клетках, чтобы убедиться в том, что мутация исправлена и белок нормально работает. CRISPR-Cas9 разрезает ДНК в том месте, которое указывается с помощью короткой молекулы РНК — гидовой РНК. Затем путем рекомбинации этот фрагмент замещается. Для этого дается клетке донорная молекула, которая содержит правильную последовательность нуклеотидов, эта последовательность вставляется в нужное место. А в случае классической генной терапии просто доставляется в клетку правильная копия гена. Хотя генная терапия бывает разная, все зависит от того, каким способом доставляется правильный ген. Есть вирусные векторы, например, лентивирусные, которые могут копировать правильную копию гена и интегрировать ее в геном клетки. Но эта интеграция происходит в случайном месте, поэтому возникает инсерционный мутагенез. И для некоторых типов

таких интегрирующих вирусных векторов показано, что при этом могут развиваться лейкозы. Поэтому от них все чаще отказываются и используют неинтегрирующие вирусы. Затем, осуществляя генную терапию в делящихся клетках, такие неинтегрирующие векторы достаточно быстро элиминируются путем разбавления. Допустим, в каждую клетку попадает сто вирусных векторов, клетка начинает делиться, и в каждой дочерней клетке этих вирусных векторов становится все меньше и меньше, и в конечном итоге, их не остается вовсе. Это ведет к непродолжительному эффекту такой терапии [9]. Но есть неделящиеся клетки. И если доставлять туда неинтегрирующие вирусные векторы с терапевтическим геном, то они там могут персистировать годами. Так работает, например, Золгенсма, препарат для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА). Мотонейроны не делятся, поэтому неинтегрирующий вектор может очень долго в них персистировать, особенно в той форме, в которой его сделали. А сделали его самокомплементарным, поэтому он образует эписому, достаточно стабильную молекулу, и не элиминируется. Это позволяет надолго закрепить терапевтический эффект [10, 11]. Что касается CRISPR-Cas9, то неважно, каким способом эта конструкция доставлена в клетку. Она сразу делает на уровне ДНК то, что нужно, то есть удаляет какой-то фрагмент гена или замещает его. И это изменение навсегда остается в клетке и в потомках этой клетки. Геномное редактирование может быть использовано как *ex vivo*, когда у пациента берут клетки, редактируют их, а потом трансплантируют обратно, так и *in vivo*. При этом в организм больного вводят CRISPR-Cas9, который попадает в нужные клетки в организме и редактирует геном этих клеток. Основное отличие от генной терапии - в том, что вводится не терапевтический ген, а инструмент для изменения эндогенного гена.

Доставка генов

Существует несколько методов доставки генов для введения терапевтического гена или нацеливания на ген. Как невирусные, так и вирусные векторы доставки были протестированы в исследованиях генной терапии муковисцидоза.

Невирусные векторы: Невирусные векторы были разработаны как стратегия доставки гена *CFTR*. Эти неинтегрирующие методы доставки генов не нарушают геном хозяина, и поэтому риск мутагенеза низок. Невирусные векторы не ограничены по грузу, что позволяет использовать более крупные фрагменты донорской ДНК для репарации генов. Однако эффективность доставки генов сравнительно ниже, чем вирусных методов. Для усиления переноса генов в ядро катионный липид используется для создания плазмидной ДНК которая в комплексе с *CFTR* увеличивает транспорт хлоридов на 20% у пациентов с муковисцидозом по сравнению с уровнями, не связанными с муковисцидозом. При использовании распыляемого катионного липида pGM169/GL67A для доставки донорской ДНК наблюдалось до 3,7% уве-

личение функции *CFTR* в легких пациентов с муковисцидозом. Недостатком подхода, опосредованного катионными липосомами, является необходимость повторной доставки, поскольку временная экспрессия *CFTR* не имеет длительного эффекта. Несмотря на эти усилия, невирусные методы доставки генов не могут навсегда восстановить функции легких.

(ii) Вирусные векторы: для повышения эффективности нацеливания на клетки было протестировано несколько методов доставки на основе вирусов, включая аденовирус (Ad), аденоассоциированный вирус (AAV) и ретровирусный вектор в доклинических и клинических испытаниях для доставки скорректированный ген *CFTR* [12, 13].

Аденовирус (объявление)

Векторы на основе когда-то были предпочтительными векторами доставки для доставки генов. Мутационная делеция генов вирусной репликации и генов уклонения от иммунной клетки-хозяина в ранней области 1 и 3 (E1/E3) соответственно лишила вирус способности к саморепликации, что сделало эти вирусные векторы привлекательными для генной терапии. Однако слабая экспрессия вирусных генов из векторов с делецией E1, в дополнение к капсидным белкам, может вызывать иммунные ответы хозяина на Ad-векторы. В первом клиническом испытании (в 1993 г.) генной терапии МВ с использованием аденовирусного вектора не удалось восстановить экспрессию *MBTP* в носовом эпителии пациентов с МВ. Это привело к идентификации и тестированию других аденовирусов серотипов 2 и 5 в клинических испытаниях МВ, что привело к временному восстановлению транспорта хлоридов в назальном и бронхиальном эпителии. Однако были обнаружены доказательства провокальной реакции с этими Ad-векторами, которые требовали повторного введения для эффективной доставки генов. Тем не менее, испытания продемонстрировали лишь ограниченные клинические преимущества у пациентов с муковисцидозом.

Аденоассоциированный вирус

Векторы на основе AAV были испытаны в качестве еще одного средства доставки генов. Обладая способностью трансдуцировать терминально дифференцированные и неделящиеся клетки, AAV также могут дольше сохраняться *in vivo* по сравнению с его аналогом Ad. Временная иммуносупрессия может улучшить повторное введение векторов AAV в легкие мышей на срок до 8 месяцев. В 1998 году первое успешное клиническое испытание на людях с повторной доставкой AAV2-CFTR в верхнечелюстные пазухи продемонстрировало восстановление функции *CFTR* без заметной токсичности или повышенного иммунного ответа через 2 недели после доставки. Однако другие клинические испытания, проведенные спустя годы, не показали достаточной функциональной коррекции *CFTR* с помощью AAV-CFTR. Одним из предостережений векторов AAV является ограниченный размер геномины (менее 4,6 т.п.н.), которой можно вставить в вирусный вектор для эффективной экспрессии [14].

Хелпер-зависимые аденовирусы (Hd-Ad)

Чтобы избежать вредного иммунного ответа Ad, был разработан хелпер-зависимый аденовирус (Hd-Ad). Делеция всех вирусных кодирующих последовательностей позволяет Hd-Ad доставлять большой груз ДНК (до 37 т.п.н.), не вызывая иммунных ответов хозяина. Одной из уникальных особенностей векторов Hd-Ad является то, что их можно использовать для доставки как эндонуклеазной системы редактирования генов, так и донорской ДНК в одном векторе для достижения сайт-специфичной генной интеграции без экспрессии эндонуклеазы после генной коррекции.

Коррекция гена с использованием Hd-Ad в базальных клетках дыхательных путей мышей и свиней с муковисцидозом может восстановить функцию CFTR, сходную с уровнями, наблюдаемыми в нормальных клетках дикого типа, по данным анализа с помощью флуоресцентного ридера планшетов (FLiPR). Также было показано, что векторы HD-Ad эффективны в коррекции гена *CFTR* в легких мышей с нокаутом CF. Тем не менее, основная проблема остается для *in-vivo* генная терапия, поскольку способность поддерживать терапевтические эффекты теряется из-за обновления клеток дыхательных путей. Следовательно, нацеливание на компартмент стволовых клеток в дыхательных путях стало привлекательной целью для постоянной коррекции гена MB.

Ретровирусы и лентивирусы

Ретровирусные и лентивирусные векторы использовались для методов доставки генов еще в конце 1990-х годов. Ретровирусы, несущие человеческий ген *CFTR*, трансдуцированные в эпителиальные клетки трахеи кролика, демонстрировали постоянную экспрессию в дыхательных путях до 3 недель. Однако трансдуцируемая способность ретровирусов была низкой, и трансдукция происходила только в области ран. Лентивирусные векторы оказались эффективными при доставке трансгена *CFTR* в эпителий дыхательных путей с потенциалом нацеливания на популяцию стволовых клеток легких для устойчивой и постоянной экспрессии *CFTR*. Хотя и ретровирусы и лентивирусы могут эффективно нацеливаться на клетки-хозяина и интегрироваться в геном хозяина, остаются серьезные опасения по поводу их использования в качестве вектора доставки для генной терапии. Иммунные ответы хозяина остаются значительным препятствием для эффективной доставки экзогенных генетических материалов вирусными методами. В контексте заболевания дыхательных путей муковисцидозом провоспалительная среда пораженных дыхательных путей, усугубляемая слизистыми обструкциями, представляет собой проблему для любых методов доставки генов. Во-вторых, существуют опасения по поводу инсерционного мутагенеза, эпигенетического сайленсинга и вторичного воздействия измененных уровней экспрессии, возникающих при использовании вирусных промоторов для управления нерегулируемой экспрессией трансгена.

Таким образом, в то время как новые подходы к редактированию генов могут повысить эффективность направленной коррекции генов, точная и эффективная доставка генетических инструментов к нужному типу клеток для постоянной коррекции генов остается препятствием для клинического использования. Чтобы изучить эти, новые животные и передовые модели на основе стволовых клеток могут позволить исследовать стратегии доставки клеток и нацеливания.

Животные модели CF

Животные модели муковисцидоза являются ценными инструментами, которые можно использовать для дальнейшего понимания патогенеза заболевания и тестирования новых терапевтических средств. Есть две фундаментальные проблемы, которые еще предстоит решить, прежде чем генная терапия станет жизнеспособной для пациентов, и модели на животных обеспечивают соответствующую платформу, с помощью которой эти препятствия могут быть безопасно преодолены. Во-первых, эффективность нацеливания генов *in-vivo* должна достигать уровня, который будет транслироваться в терапевтический результат. Во-вторых, эффективность нацеливания на гены должна перевешивать проблемы нецелевого мутагенеза с помощью инструментов редактирования генов. Животные модели традиционно были полезными моделями для понимания основных механизмов патогенеза заболевания. Последние модели животных для муковисцидоза, особенно те, которые содержат варианты человеческого CF, предлагают возможности для тестирования новых появляющихся модуляторов CFTR, для которых эти модуляторы предназначены специально для достижения конкретного функционального результата. Здесь мы кратко коснемся нескольких из этих животных моделей и их использования в открытии терапии муковисцидоза. Лекарственные препараты на основе технологии CRISPR-Cas9 разрабатываются. Как показывает американская база клинических исследований, сейчас проводится около 70 клинических исследований с использованием этой технологии. Примерно половина из них - это лечение онкологических заболеваний. Если говорить о наследственных болезнях, то тут исследования проводятся в первую очередь для гемоглобинопатий, наследственного амилоидоза, амавроза Лебера и других. Наиболее близок к одобрению препарат CTX001 для лечения бета-талассемии и серповидно-клеточной анемии. Это терапия *ex vivo*. У пациента забирают гемопоэтические стволовые клетки, в них осуществляют нокаут гена *BCL11A*, в норме подавляющего синтез фетального гемоглобина. При нокауте гена *BCL11A* фетальный гемоглобин начинает синтезироваться и замещает собой поврежденный из-за мутаций гемоглобин. Предварительные результаты этих исследований очень обнадеживают. Что касается зарегистрированных генотерапевтических препаратов, основная проблема состоит в том, что они невероятно дорогие. Это объясняется себестоимостью их разработки. С момента открытия гена MB более 30 лет назад стало

очевидно, что поиск эффективной терапии для лечения всех форм МВ остается сложной задачей. Хотя открытие новых низкомолекулярных модуляторов значительно продвинуло лечение некоторых форм муковисцидоза, эффективность этих спасающих жизнь лекарств не была универсальной и скорее ограничивалась определенными классами мутаций. Благодаря новым достижениям в области технологий редактирования генов в сочетании с передовыми клеточными моделями для тестирования подходов генной инженерии это приведет к быстрой разработке новых методов лечения всех форм муковисцидоза [15, 16].

Список литературы:

1. Accurso F. The Tiger-1 clinical trial on denufisol in cystic fibrosis. *Ped Pulmonol* 2008; 31:191.
2. Wilschanski M, Miller LL, Shoseyov D, et al. Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2011;38(1):59–69.
3. Grasemann H, Stehling F, Brunar H, et al. Inhalation of moli1901 in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2007; 131:1461–66.
4. Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis/ K. Paul [et al.]// *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2004. - №169. - 712–25.
5. European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines /I. Sermet-Gaudelus [et al.]// *J Cyst Fibros.* -2011. -10(2). -p.16-23
6. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines/ R. Smyth [et al.]//*Cyst Fibrosis.* -2014. -13. -pp.23– S42
7. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre/S. Conway [et al.] // *Journal of Cystic Fibrosis.* - 2014. - №13. -p.7-26
8. Fungi in the cystic fibrosis lung: Bystanders or pathogens /S.H. Chotirmall [et al.]// *Int J Biochem Cell Biol.* -2014. – 52. -pp.161–173.
9. Genotype and phenotype in cystic fibrosis/ Zielenski J. [et al.]// *Respiration.* – 2000. – V. 67(2). – p. 117-133.
10. Сотникова Е.А., Климушина М.В., Киселева А.В., Скирко О.П., Курилова О.В., Дивашук М.Г., Хлебус Э.Ю., Козлова В.А., Покровская М.С., Сломинский П.А., Мешков А.Н., Драпкина О.М. Частота гетерозиготного носительства мутаций в гене CFTR, обуславливающих развитие муковисцидоза, в популяционной выборке ЭССЕ-Вологда. *Медицинская генетика.* 2020;19(7):64-65.
11. Sotnikova EA, Klimushina MV, Kiseleva AV, Skirko OP, Kurilova OV, Divashuk MG, Khlebus EYu, Kozlova VA, Pokrovskaya MS, Slominsky PA, Meshkov AN, Drapkina OM. The frequency of heterozygous carriage of CFTR gene mutations causing the development of cystic fibrosis in a population-based cohort study (ESSE-Vologda). *Medical Genetics.* 2020;19(7):64-65. (In Russ.)
12. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017;181:S4-S15.e1.
13. Лопес-Пачеко М. Модуляторы CFTR: изменение лица кистозного фиброза в эпоху точной медицины. *Фронт Фармакол.* 2019;10:1662
14. Stephenson A, Stanojevic S, Sykes J, Burgel P. The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis. *La Presse Médicale.* 2017;46(6):87-95.
15. Опыт применения таргетного секвенирования для молекулярной диагностики муковисцидоза / Т.С. Симакова (и др.)// *Клиническая лабораторная Диагностика* с 305-309
16. Кондратьева, Е. Инновационные методы терапии муковисцидоза / Е. Кондратьева // *Врач.* 2016 –С.77-81.