

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИМИ СТЕЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Я. М. Валиева¹, К. В. Попов² ✉

¹ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

По тактике доставки терапевтических конструкций генную терапию разделяют на *in vivo* и *ex vivo*. При терапии *in vivo* вектор, содержащий терапевтическую конструкцию, вводят пациенту. При терапии *ex vivo* клетки извлекают из организма пациента, подвергают генетической модификации и возвращают обратно. В *ex vivo* терапии наследственных заболеваний модификации чаще всего подвергаются гемопоэтические стволовые клетки. Несмотря на преимущество терапии *in vivo*, состоящее в возможности масштабирования производства и удобства применения готового препарата, для ряда генетических заболеваний сохраняется актуальность терапии на основе трансплантации генетически модифицированных гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, генная клеточная терапия *ex vivo*, генная терапия *in vivo*, лизосомные болезни накопления, генные болезни

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 123020800103-6.

Вклад авторов: Я. М. Валиева — анализ литературы, сбор данных, написание рукописи. К. В. Попов — идея рукописи, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Константин Васильевич Попов
ул. Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; popov_konst@mail.ru

Статья получена: 25.12.2024 **Статья принята к печати:** 29.12.2024 **Опубликована онлайн:** 31.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.074

PROSPECTS OF GENE THERAPY WITH HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Valieva YM¹, Popov KV² ✉

¹ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russia

² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Gene therapy is subdivided into *in vivo* and *ex vivo* according to the tactics of delivery of therapeutic constructions. *In vivo* therapy, a vector containing a therapeutic construction is injected into the patient. In *ex vivo* therapy, cells are removed from the patient's body, genetically modified, and then returned. In *ex vivo* therapy for inherited diseases, hematopoietic stem cells are most often subjected to modification. Despite the advantage of *in vivo* therapy, which consists in the possibility of scale-up of production and convenience of use of ready-to-use drug, therapy based on transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells remains relevant for a number of genetic diseases.

Keywords: hematopoietic stem cells, *ex vivo* gene therapy, *in vivo* gene therapy, lysosomal storage diseases, genetic disorder

Funding: the paper was executed within the framework of the State Assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 123020800103-6.

Author contribution: Valieva YM — literature review, data acquisition, manuscript writing; Popov KV — manuscript concept, editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Konstantin V. Popov
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; popov_konst@mail.ru

Received: 25.12.2024 **Accepted:** 29.12.2024 **Published online:** 31.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.074

Согласно определению, терапевтическое действие генотерапевтического лекарственного препарата обусловлено последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты, входящей в его состав, или продуктом экспрессии такой последовательности [1]. В зависимости от молекулярного механизма, лежащего в основе заболевания, терапия может быть направлена на исправление генных дефектов или придание клеткам новых свойств. Тактика в отношении функции поврежденного гена может состоять в добавлении рабочей копии, подавлении экспрессии или исправлении последовательности. Добавление рабочей копии применяют для аутосомно-рецессивных заболеваний. Подавление экспрессии поврежденного гена — для аутосомно-доминантных [2]. С развитием методов геномного редактирования исправление последовательности поврежденного гена рассматривается как приоритетное направление разработки препаратов для лечения заболеваний и с аутосомно-рецессивным, и с аутосомно-доминантным типами наследования. Действие CAR-T-терапии, наиболее широко используемого в клинической практике генотерапевтического препарата,

основано на придании клеткам новых свойств, в данном случае введении химерного рецептора, позволяющего распознавать и уничтожать опухолевые клетки [3].

Актуальные методы генной терапии

Вне зависимости от механизма реализации терапевтического действия нуклеиновой кислоты, содержащейся в генотерапевтическом препарате, ключевым для разработки технологии производства препарата является выбор между *in vivo* и *ex vivo* доставкой терапевтической конструкции в клетки-мишени. В варианте *in vivo* применения препарат, содержащий вектор, вводят непосредственно в организм пациента. Для *ex vivo* применения из организма пациента выделяют клетки, подвергают генетической модификации и возвращают пациенту.

На сегодняшний день использование вирусных векторов — наиболее изученный способ доставки гена в клетку. Вирусы используют для таргетной доставки необходимого генетического материала в клетки *in vivo* и *ex vivo*. Лидерами среди переносчиков модифицированных

генов являются аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы и лентивирусные векторы. AAV-векторы преимущественно используют *in vivo*, в то время как лентивирусные — для *ex vivo* терапии [4, 5].

РНК-методы в генной терапии представляют собой быстро развивающуюся область со значительным потенциалом для лечения различных заболеваний. Эти методы включают терапию с использованием антисмысловых олигонуклеотидов, РНК-интерференции и матричной РНК (мРНК). Развитие невирусных систем доставки РНК, в частности на основе инкапсуляции в липидные наночастицы, позволит в перспективе обходиться без вирусных систем доставки и избежать рисков, связанных с реакцией иммунной системы на вирусные белки и с неконтролируемой интеграцией трансгенов в геном клеток пациента [6].

Прорывной технологией стала разработка нового метода геномного редактирования CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas9 можно использовать для коррекции генетических мутаций путем точного редактирования дефектного гена. Этот подход особенно актуален для моногенных заболеваний, когда за заболевание отвечает точечная мутация гена [7].

Генная терапия *in vivo* обладает конкурентным преимуществом в большинстве случаев благодаря возможности создания готовых лекарственных препаратов, адаптированных под основную когорту пациентов. Этим обуславливаются легкость масштабирования, снижение цены за единицу продукции и готовность к применению по требованию.

Генная терапия *ex vivo*, в основном, представлена в лечении онкологических заболеваний (в этом случае модификации подвергают иммунные клетки) и в лечении наследственных заболеваний генетически модифицированными гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК). ГСК являются оптимальными клетками-мишенями для терапевтического изменения генома благодаря их способности самообновляться и дифференцироваться. Таким образом обеспечиваются длительный уровень экспрессии терапевтической конструкции и доставка продуктов ее экспрессии в дифференцированные клетки, в большую часть организма. Кроме того, ГСК не несут риска иммуногенности, связанного с непосредственным применением высоких доз вирусных векторов *in vivo* [8].

Генная терапия на основе гемопоэтических стволовых клеток

Методика *ex vivo* генной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК ГТ) — многоступенчатый процесс. Сначала клетки ГСК забирают у пациента, затем их культивируют, подвергают генетической модификации, и модифицированные клетки вводят снова пациенту. Введенные клетки заселяют нишу ГСК в костном мозге [9]. ГСК ГТ *ex vivo* представляется перспективным подходом для лечения моногенных генетических заболеваний, включающих первичные иммунодефициты, гемоглобинопатии и лизосомные болезни накопления.

Наиболее успешный пример ГСК ГТ — зарегистрированный в 2020 г. геннотерапевтический препарат для лечения метахроматической лейкодиistroфии (МЛД) — Libmeldy. Препарат представляет собой аутологичные ГСК, трансдуцированные лентивирусным вектором, несущим функциональную копию гена ARSA. Результаты лечения показали наличие хорошего терапевтического эффекта

и длительной продолжительности действия препарата [10]. Использование векторов на основе лентивирусов обеспечивает стабильную интеграцию генетической конструкции в геном, высокую и длительную экспрессию гена. Однако при использовании вирусных векторов для модификации ГСК возникает риск инсерционного мутагенеза. Так при попытке лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (X-SCID) аналогичным препаратом на основе ГСК ГТ был выявлен повышенный риск развития Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза. Несмотря на усилия, направленные на изменения дизайна лентивирусных векторов с целью снижения риска развития онкологических заболеваний вследствие интеграции трансгена, были выявлены аналогичные осложнения при применении препарата для лечения адренолейкодистрофии [11]. Повышение безопасности модифицированных ГСК может быть достигнуто использованием невирусных систем доставки на основе транспозонов и систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas-систем.

Преимущество *ex vivo* ГСК ГТ в сравнении с *in vivo* терапией на основе вирусных векторов состоит в отсутствии необходимости использовать высокие дозы вектора и подвергать этим самым пациента риску развития иммунных реакций. В частности, при использовании AAV-векторов вследствие эффекта первого прохождения значительная часть частиц остается в печени. Другими словами, если целевой орган-мишень отличен от печени, то AAV векторы его не достигают в нужной терапевтической дозе, а использование более высоких доз оказывает гепатотоксический и иммуногенный эффекты [12]. Так как при ГСК ГТ используют аутологичные клетки пациента, иммуногенность данных препаратов минимальна. Трансплантация ГСК со стабильной интеграцией генотерапевтической конструкции обеспечивает длительный, теоретически пожизненный, терапевтический эффект. В случае болезней кроветворения, таких как синдром Вискотта–Олдрича и других первичных иммунодефицитов, ГСК сами являются целевыми клетками. ГСК способны проникать через гематоэнцефалический барьер, дифференцироваться в макрофаги, занимая нишу микроглии, и экспрессировать необходимые ферменты в тканях головного мозга [13]. Этим объясняется эффект от трансплантации аллогенных ГСК от здорового донора для терапии группы наследственных заболеваний, обусловленных повреждением нервных клеток головного мозга, включающих мукополисахаридозы, адренолейкодистрофию, метахроматическую лейкодиistroфию. Тот же эффект достигается при использовании аутологичных ГСК с исправленным генным дефектом.

Улучшение методов культивирования ГСК *ex vivo* позволяет получить значительно больше ГСК для модификации, чем доступно при непосредственном использовании клеток, собранных у пациента. Высокие дозы ГСК, используемых для трансплантации, позволяют надеяться на введение в практику протоколов трансплантации модифицированных ГСК, не требующих генотоксичных режимов кондиционирования. В настоящее время для достижения клинического эффекта от трансплантации ГСК требуется предварительное миелоаблятивное кондиционирование с помощью химиотерапии, направленной на подавление костного мозга пациента. Такое кондиционирование несет как краткосрочные риски, связанные с развитием инфекционных заболеваний, так и отдаленные риски нарушения роста, интеллектуального развития, потери фертильности, развития других заболеваний

[14]. В настоящее время разрабатываются протоколы формирования ниши ГСК с использованием конъюгатов антител, специфичных к ГСК с токсинами.

Сегодня самый дорогой препарат в мире — препарат Lentimeldy на основе ГСК для лечения метахроматической лейкоциклопозии [15]. В силу использования для производства препарата клеток пациента отсутствует возможность снижения стоимости дозы препарата увеличением объема производимой партии. Кроме того, *ex vivo* применение требует обеспечения сложной логистики и несет дополнительные риски обеспечения качества и безопасности применения, связанные с донорским материалом. Возможность снижения стоимости производства данных препаратов связана с оптимизацией логистики доставки донорского материала и готового препарата и автоматизации процесса производства. Существенного снижения стоимости препаратов можно ожидать от замены используемых в настоящее время вирусных векторов на невирусные

системы доставки геннотерапевтических конструкций. Такой подход поможет сократить время и затраты на каждую единицу лекарственного препарата. Создание научно-технологических комплексов для разработки персонализированных лекарственных препаратов на основе ГСК ГТ поможет автоматизировать, ускорить и масштабировать процесс производства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработка ГСК ГТ *ex vivo* актуальна и перспективна на сегодняшний день. Развитие такой терапии предоставит возможности для этиологического лечения многих неизлечимых генетических заболеваний. Дальнейшее изучение данного направления генной терапии, совершенствование имеющихся методов и разработка новых позволят расширить количество заболеваний, лечение которых эффективно с клинической и экономической точек зрения препаратами ГСК ГТ.

Литература

- Carvalho M, Sepodes B, Martins AP. Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-Art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2017; 4. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2017.00182/full>.
- Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part ii. gene therapy strategies and applications. 2014. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4440458/>.
- CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer [Internet]. Cancer gov. 2022. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>.
- Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024; 9 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38565561/>.
- Kohn DB, Booth C, Shaw KL, Xu-Bayford J, Garabedian E, Trevisan V, et al. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2021; 384 (21): 2002–13. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2027675>.
- Zhu Y, Zhu L, Wang X, Jin H. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell Death and Disease* [Internet]. 2022 Jul 23;13(7). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-05075-2>
- Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023; 8 (1). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01309-7>.
- Ferrari S, Valeri E, Conti A, Scala S, Aprile A, Di Micco R, et al. Genetic engineering meets hematopoietic stem cell biology for next-generation gene therapy. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (5): 549–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37146580/>.
- Meaker GA, Wilkinson AC. Ex vivo hematopoietic stem cell expansion technologies: recent progress, applications, and open questions. *Experimental Hematology*. 2023; 130: 104136. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11511678/>.
- Horgan C, Watts K, Ram D, Rust S, Hutton R, Jones S, et al. A retrospective cohort study of Libmeldy (atidarsagene autotemcel) for MLD: What we have accomplished and what opportunities lie ahead. *JIMD Reports*. 2023; 64 (5): 346–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmd2.12378>.
- Duncan CN, Bledsoe JR, Grzywacz B, Beckman A, Bonner M, Eichler FS, et al. Hematologic Cancer after Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. *New England Journal of Medicine*. 2024; 391 (14): 1287–301. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2405541>.
- Rabinowitz J, Chan YK, Samulski RJ. Adeno-Associated Virus (AAV) Versus Immune Response. *Viruses*. 2019; 11 (2): 102. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/102>.
- de Vasconcelos P, Lacerda JF. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Neurological Disorders: A Focus on Inborn Errors of Metabolism. *Front Cell Neurosci*. 2022; 16: 895511. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2022.895511/full>.
- Mikulska M, Gualandi F, Anserini P. Early and late complications of hematopoietic stem cell transplantation. *Handb Clin Neurol*. 2024; 202: 135–51.
- Maragkou I, Maragkou I. The most expensive drugs in the US. *Pharmaceutical Technology*. 2024. Available from: <https://www.pharmaceutical-technology.com/features/the-most-expensive-drugs-in-the-us/>.

References

- Carvalho M, Sepodes B, Martins AP. Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-Art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2017; 4. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2017.00182/full>.
- Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part ii. gene therapy strategies and applications. 2014. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4440458/>.
- CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer [Internet]. Cancer gov. 2022. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>.
- Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024; 9 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38565561/>.
- Kohn DB, Booth C, Shaw KL, Xu-Bayford J, Garabedian E, Trevisan V, et al. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2021; 384 (21): 2002–13. Available from: <https://www>.

- nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2027675.
6. Zhu Y, Zhu L, Wang X, Jin H. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell Death and Disease* [Internet]. 2022 Jul 23;13(7). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-05075-2>
 7. Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023; 8 (1). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01309-7>.
 8. Ferrari S, Valeri E, Conti A, Scala S, Aprile A, Di Micco R, et al. Genetic engineering meets hematopoietic stem cell biology for next-generation gene therapy. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (5): 549–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37146580/>.
 9. Meaker GA, Wilkinson AC. Ex vivo hematopoietic stem cell expansion technologies: recent progress, applications, and open questions. *Experimental Hematology*. 2023; 130: 104136. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11511678/>.
 10. Horgan C, Watts K, Ram D, Rust S, Hutton R, Jones S, et al. A retrospective cohort study of Libmeldy (atidarsagene autotemcel) for MLD: What we have accomplished and what opportunities lie ahead. *JIMD Reports*. 2023; 64 (5): 346–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmd2.12378>.
 11. Duncan CN, Bledsoe JR, Grzywacz B, Beckman A, Bonner M, Eichler FS, et al. Hematologic Cancer after Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. *New England Journal of Medicine*. 2024; 391 (14): 1287–301. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2405541>.
 12. Rabinowitz J, Chan YK, Samulski RJ. Adeno-Associated Virus (AAV) Versus Immune Response. *Viruses*. 2019; 11 (2): 102. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/102>.
 13. de Vasconcelos P, Lacerda JF. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Neurological Disorders: A Focus on Inborn Errors of Metabolism. *Front Cell Neurosci*. 2022; 16: 895511. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2022.895511/full>.
 14. Mikulska M, Gualandi F, Anserini P. Early and late complications of hematopoietic stem cell transplantation. *Handb Clin Neurol*. 2024; 202: 135–51.
 15. Maragkou I, Maragkou I. The most expensive drugs in the US. *Pharmaceutical Technology*. 2024. Available from: <https://www.pharmaceutical-technology.com/features/the-most-expensive-drugs-in-the-us/>.