

ДВУХЭТАПНАЯ AAV8-ГЕНОТЕРАПИЯ РЕБЕНКА С СИНДРОМОМ КРИГЛЕРА–НАЙЯРА 1-ГО ТИПА

Д. В. Ребриков^{1,2}✉, А. В. Дегтярёва¹, Ю. Г. Янушевич², М. С. Готьё¹, Т. В. Городничева^{1,2}, А. С. Бавыкин^{1,2}, Л. В. Ушакова¹, Е. А. Филиппова¹, Д. Н. Дегтярёв¹, Г. Т. Сухих¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Пироговский Университет), Москва, Россия

Синдром Криглера–Найяра 1-го типа (СКН1) является следствием дефицита фермента уридиндифосфатглюкурозилтрансферы 1A1, кодируемого геном *UTG1A1* и проявляется при рождении тяжелой неконъюгированной гипербилирубинемией. В работе описан устойчивый клинический ответ у ребенка с СКН1, которого лечили двумя последовательными дозами AAV8-генотерапии, доставляющей кодирующую последовательность *UTG1A1*. Инфузия I (6×10^{12} вг/кг) обеспечила устойчивое снижение сывороточного билирубина, что позволило ослабить фототерапию с 12 ч до 4 ч в день. Инфузия II в двойной дозе была сделана через 6 месяцев; данное решение было принято с целью полной отмены фототерапии. Однако отмена привела к резкому повышению уровня билирубина, что потребовало возобновления фототерапии. В настоящее время состояние пациента стабильно на 4-часовой ежедневной фототерапии в течение 80 недель с момента возобновления и 107 недель с момента начала терапии генопрепаратом. Токсических побочных эффектов не наблюдалось. Плавный прирост уровня билирубина в сыворотке крови ставит вопрос о клинической целесообразности ежегодных инфузий препарата.

Ключевые слова: синдром Криглера–Найяра 1-го типа, AAV8, генная терапия

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ 124020400004-9).

Вклад авторов: Д. В. Ребриков — анализ литературы, планирование исследования, разработка концепции и дизайна исследования, разработка концепции препарата, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. В. Дегтярёва — анализ литературы, планирование исследования, разработка концепции и дизайна исследования, обследование пациента, интерпретация данных; М. С. Готьё, Л. В. Ушакова, Е. А. Филиппова — обследование пациента; Ю. Г. Янушевич, Т. В. Городничева, А. С. Бавыкин — разработка препарата, интерпретация данных, подготовка рукописи; Д. Н. Дегтярёв, Г. Т. Сухих — разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 12 от 01 декабря 2022 г. (для инфузии I) и протокол № 7 от 20 июля 2023 г. (для инфузии II)). Законные представители пациентки дали информированное добровольное согласие на исследование и на каждую инфузию препарата.

✉ **Для корреспонденции:** Д. В. Ребриков
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; drebrikov@gmail.com

Статья получена: 25.04.2025 **Статья принята к печати:** 29.04.2025 **Опубликована онлайн:** 30.04.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.025

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

TWO-STEP AAV8 GENE DELIVERY IN A CHILD WITH CRIGLER-NAJJAR SYNDROME TYPE I

Rebrikov DV^{1,2}✉, Degtyareva AV¹, Yanushevich YuG², Gautier MS¹, Gorodnicheva TV^{1,2}, Bavykin AS^{1,2}, Ushakova LV¹, Filippova EA¹, Degtyarev DN¹, Sukhikh GT¹

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University), Moscow, Russia

Crigler–Najjar syndrome type I, an orphan *UTG1A1* enzyme deficiency, manifests at birth with severe unconjugated hyperbilirubinemia. Here we describe sustained clinical response in a pediatric patient with Crigler–Najjar syndrome type I treated with two consecutive doses of AAV8 delivering the *UTG1A1* coding sequence. Infusion I (6×10^{12} vg/kg) afforded sustained decrease in serum bilirubin, allowing substantial relaxation of the phototherapy from 12 h to 4 h daily. Infusion II at a double dose was made in 6 months; the decision was intended at complete elimination of phototherapy. However, the elimination led to a sharp increase in bilirubin levels necessitating resumption of phototherapy. The patient is currently stable on 4 h daily phototherapy for 80 weeks since the resumption and 107 weeks since the AAV8 therapy initiation. No toxic side effects were encountered. A slow incremental dynamics in serum bilirubin opens the issue of clinical advisability for subsequent infusions of the drug.

Keywords: Crigler–Najjar syndrome type I, AAV8, gene therapy

Funding: This work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (No. 124020400004-9).

Author contribution: Rebrikov DV — literature analysis, study planning, development of study concept and design, development of drug concept, data interpretation, manuscript preparation; Degtyareva AV — literature analysis, study planning, development of study concept and design, patient examination, data interpretation; Gautier MS, Ushakova LV, Filippova EA — patient examination; Yanushevich YuG, Gorodnicheva TV, Bavykin AS — drug development, data interpretation, manuscript preparation; Degtyarev DN, Sukhikh GT — development of study concept and design, data interpretation.

Compliance with ethical standards: the therapy was approved by Ethics Committee at the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology on Dec 01 2022, Protocol #12 for infusion I, and on Jul 20 2023, Protocol #7 for infusion II. The patient's legal representatives provided voluntary informed consents for the study and for each infusion of the drug.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis V. Rebrikov
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; drebrikov@gmail.com

Received: 25.04.2025 **Accepted:** 29.04.2025 **Published online:** 30.04.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.025

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Синдром Криглера–Найяра (СКН) — это орфанная ферментопатия, вызываемая вариантами потери функции фермента уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы 1A1, кодируемого геном *UGT1A1* [1]. Отсутствие активной уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы 1A1 приводит к накоплению конъюгатов билирубина (клинически представленных желтухой и тяжелыми неврологическими нарушениями) и является потенциально фатальным в младенчестве. Диагноз включает биохимические и молекулярно-генетические тесты на, соответственно, неконъюгированный билирубин и варианты *UGT1A1*. Никакого специфического патогенетического лечения этого состояния не было предложено, за исключением трансплантации печени при СКН 1-го типа (тяжелой форме заболевания). Пациенты нуждаются в постоянном наблюдении и находятся на постоянном удалении билирубина с помощью плазмафереза и (или) фототерапии, что сильно влияет на их качество жизни. Потенциал использования аденоассоциированного вируса серотипа 8 для лечения СКН был обоснован в доклинических исследованиях *in vivo* [2, 3]. В 2023 г. D'Antiga et al. сообщили об успешном лечении СКН1 у взрослых пациентов с использованием генного препарата с доставкой посредством AAV8 [4]. У детей эффективность применения такой терапии (спекулятивно) может быть ниже из-за высоких темпов роста и физиологического обновления клеток печени. Здесь мы описываем устойчивый клинический ответ (107 недель на момент написания статьи) у ребенка с СКН1 с использованием кодирующей последовательности *UGT1A1*, доставленной двумя последовательными дозами аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 8 (AAV8). Это первый отчет о терапии AAV в режиме доставки двумя дозами.

Описание клинического случая

Дизайн и очистка вектора

В качестве матрицы использовали кДНК от здорового донора с последовательностью *UGT1A1* дикого типа. Кодирующая последовательность была клонирована в плазмиду pAAV-TBG. Конструкция pAAV-TBG-*UGT1A1* была упакована в клетках HEK293.

Частицы очищали в ступенчатом градиенте плотности иодиксанола (OptiPrep, StemCell Technologies, США) при 350 000 g, +18 °C в течение 1,5 ч (ультрацентрифуга Optima-XPN; Beckman, США). 60%-ную фракцию и половину 40%-ной фракции йодиксанола собирали, очищали диализом (Spectrum™, Fisher Scientific #0867140; размер пор 100 кДа) против (1x) буфера PBS/350 mM NaCl/0,001% Pluronic F-68 при 4 °C в течение 14–18 ч, концентрировали с помощью центрифужных фильтров Amicon®, размер пор 100 кДа (Millipore Sigma, США) и дополнительно стерилизовали шприцевой фильтрацией 0,22 мкм. Продукт, альфаглюкуронозилтрансферазаген унопаровек, количественно определяли с помощью ПЦР «в реальном времени» с плазмидной ДНК в качестве эталона. Все показатели чистоты оказались в пределах референсных значений для клинического использования; продукт содержал эндотоксин <0,64 EU/мл (Endosafe® LAL; Charles River Endosafe, США), BSA < 159 нг/мл (BSA ELISA Kit; Wuhan Fine Biotech, KHP), остаточные белки HEK293 <2 нг/мл (HEK293 NSR ELISA Kit; Cygnus Technologies, США) и был микоплазмонегативным.

Доклинические исследования

Испытания *in vitro* проводили на клетках HeLa (ATCC, США).

Исследования на животных были одобрены Комитетом по содержанию и использованию животных Пироговского Университета. Испытания *in vivo* на мышах C57BL6 проводили в три раунда: оценка зависимости реакции от дозы, оценка токсичности передозировки и оценка постепенного исчезновения в подростковом возрасте. Контрольная группа получала идентичный объем буфера для разбавления вместо препарата (во всех экспериментах).

Оценку зависимости реакции от дозы проводили на мышах в возрасте 8 месяцев в группах $n(c) = 11$, $n(L) = 11$, $n(M) = 11$, $n(H) = 11$. Исследования токсикологии и биораспределения включали мониторинг количества лейкоцитов и биохимических тестов на 3, 4 и 5 неделе после инфузии, а также посмертную оценку параметров крови и биораспределения препарата в мышцах и внутренних органах на 6-й неделе. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) показало селективное биораспределение кодирующей последовательности человеческого *UGT1A1* в печень. Сигнал hUGT1A1 увеличивался вместе с дозой как по интенсивности, так и по распространению в паренхиме печени из вен долек (рис. 1).

Оценку токсичности передозировки максимальной потенциальной терапевтической дозой проводили путем введения дозы $1,2 \times 10^{14}$ вг/кг 8-месячным мышам в контрольной и экспериментальной группах ($n = 6$ в каждой) с теми же контрольными точками и контролируемыми параметрами, что и выше. Существенных токсических эффектов не было обнаружено. Оценку постепенного исчезновения конструкции в подростковом возрасте проводили на 5-недельных мышах ($n = 24$), которым $1,2 \times 10^{13}$ вг/кг препарата вводили в хвостовую вену. Через 2 недели после инфузии (и затем каждые 3 недели до конца эксперимента в возрасте 19 недель) группы мышей ($n = 6, 4, 4, 4, 6$) подвергали эвтаназии и брали образцы печени для анализа копий вирусного генома методом количественной ПЦР и количественного обнаружения белка методом ИГХ (срезы печени, окрашенные антителом, специфичным к hUGT1A1). Результаты количественной ПЦР показали двукратное снижение содержания векторной ДНК каждые 6 недель (четырёхкратное за эксперимент). По результатам количественного анализа белка, уровень hUGT1A1 увеличивался в течение 5 недель после инфузии и оставался стабильным до конца эксперимента.

Пациент

Девочке с СКН1, подтвержденным секвенированием гена *UGT1A1* и проявляющимся тяжелой неконъюгированной гипербилирубинемией, находящейся под постоянным наблюдением в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, проводили 12-часовую ежедневную фототерапию, что позволило удерживать уровень непрямого билирубина в пределах токсичности 300–350 мкмоль/л.

Терапия AAV была одобрена этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России 01 декабря 2022 г., протокол № 12 (для инфузии I), и 20 июля 2023 г., протокол № 7 (для инфузии II). Заявление на проведение клинического исследования I-II фазы № 13571. Законные представители пациентки дали информированное добровольное согласие на исследование и на каждую инфузию препарата.

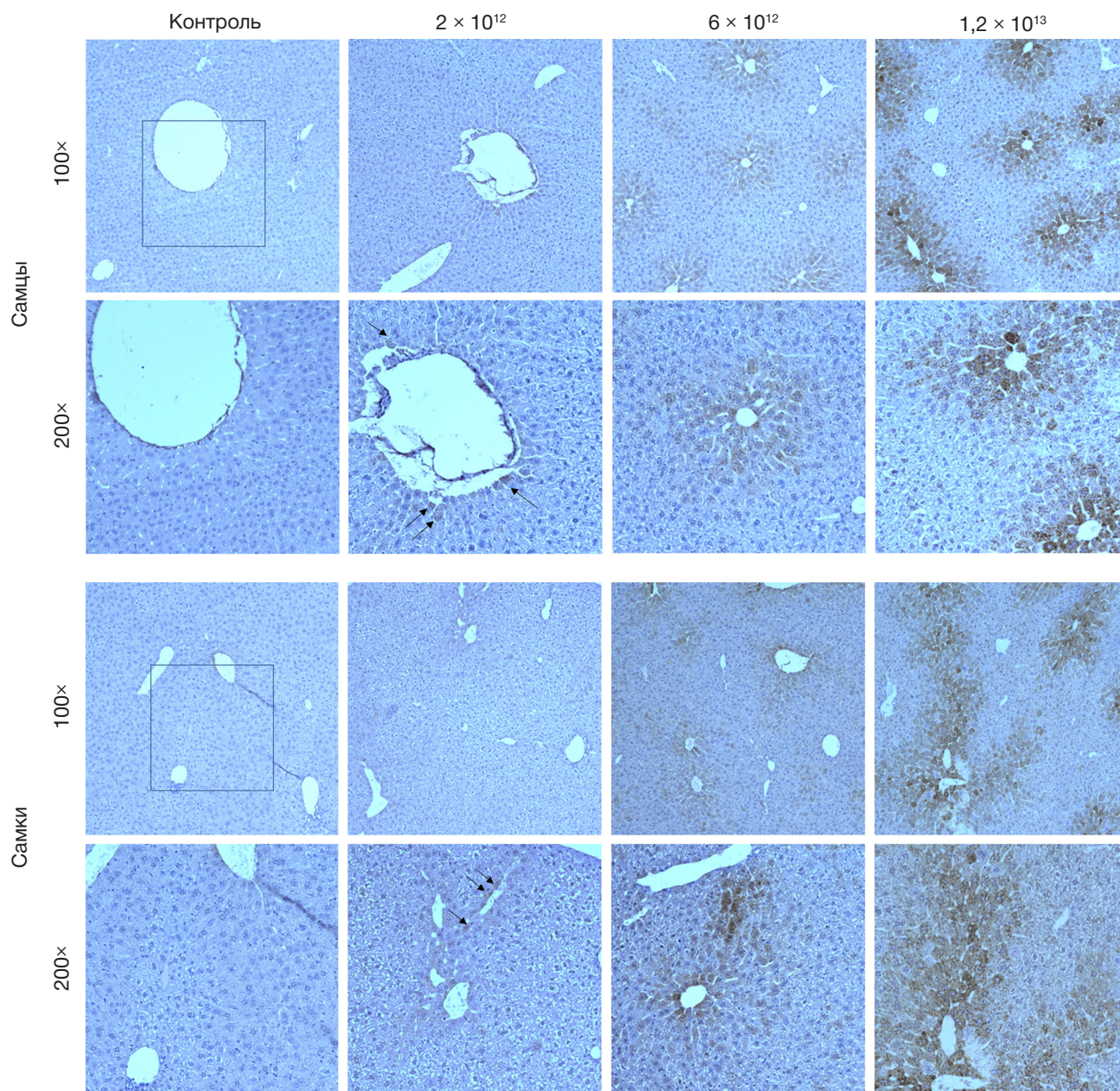


Рис. 1. Результаты ИГХ для человеческой УДФ-глюкурозилтрансферазы 1A1 в печени мыши (6-я неделя после инфузии). Срезы, контрастно окрашенные гематоксилином, оценивали с использованием антител к человеческому UGT1A1, покрытых вторичным антителом, конъюгированным с HRP. Указаны дозы вектора, вг/кг. Черные стрелки на изображениях с низкой дозой указывают на периваскулярную локализацию сигнала

Лечение и результат

Терапия генопрепаратом была начата в возрасте 7 лет и 5 месяцев. Пациентке было проведено две внутривенные инфузии альфаглюкурозилтрансферазагена унопарвовека: 6×10^{12} вирусных геномов на кг массы тела (вг/кг) на 0-й неделе и $1,2 \times 10^{13}$ вг/кг на 27-й неделе (рис. 2). Безопасность контролировали по уровням трансаминаз и самочувствию пациента. Эффективность оценивали по снижению уровня билирубина в сыворотке. Диаграмма уровней непрямого билирубина за 3,5 года, включая обширный период времени, предшествовавший лечению, представлена на рис. 2. Режим фототерапии постоянно корректировался в соответствии с уровнями непрямого билирубина. Обе инфузии сопровождались поддержкой преднизолоном для смягчения иммунных реакций: пациентка принимала преднизолон ежедневно перорально в дозах, постепенно снижаемых с 1 мг/кг

до 0 в течение 8 и 2 недель с момента первой и второй инфузии соответственно (рис. 2). Кроме того, в день инфузии II пациентка получила 250 мг (10 мг/кг) метилпреднизолона внутривенно.

Нейтрализующие антитела к AAV8 не были обнаружены до инфузии I. Положительная иммунологическая реакция с эпитопами AAV8 была выявлена после первой инфузии и сохранялась в течение всего исследования.

Инфузия I снизила сывороточный билирубин в 2 раза (минимум, достигнутый на протяжении 2–9 недель). Поскольку ежедневные дозы фототерапии постепенно снижались до 4 ч к 8-й неделе, концентрация сывороточного билирубина восстановилась до ~ 250 мкмоль/л (с 10-й недели и далее). Клиническое решение относительно инфузии II предполагало полную отмену фототерапии. Инфузия II на 27-й неделе не дала токсических эффектов и обеспечила дополнительное снижение концентрации сывороточного билирубина на $\sim 20\%$ на 29-й неделе. В связи с положительной

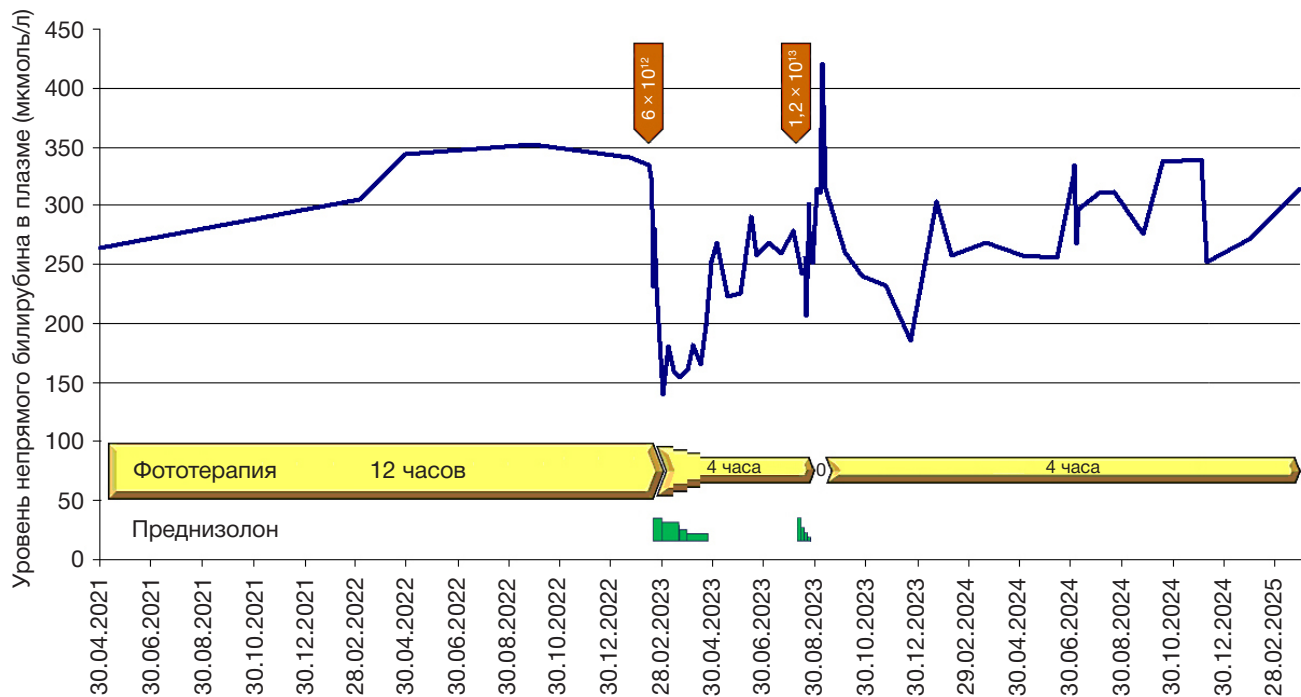


Рис. 2. Динамика уровня непрямого билирубина в зависимости от первой и второй инфузий альфаглобуринозилтрансферазаген унопаровкека, скорректированных схем фототерапии и поддержки преднизолоном (пероральные дозы, начиная с 1 мг/кг в день)

динамикой поддержка фототерапией была прекращена, но возобновлена через 2 недели в той же ограниченной дозе 4 ч, поскольку концентрация сывороточного билирубина резко увеличилась до ~400 мкмоль/л. Повторная фототерапия обеспечила быструю коррекцию концентрации сывороточного билирубина до ~250 мкмоль/л. Профили печеночных ферментов оставались нормальными в течение всего периода наблюдения. На момент написания статьи (107-я неделя) пациент стабилен при фототерапии, проводимой по 4 ч в день, без системных жалоб.

Обсуждение клинического случая

Лечение не вызвало токсических побочных эффектов. Хотя полное прекращение фототерапии оказалось невозможным

на данном этапе, лечение обеспечило длительное трехкратное снижение ежедневного воздействия ультрафиолета по сравнению с первоначальными значениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование печень-специфичной генной терапии у детей связано с ускоренной потерей эффекта, по-видимому, из-за высокой регенерационной способности и роста печени. Возможность безопасного повторного введения вектора AAV8 позволяет удовлетворительно контролировать критический биохимический показатель. Генная терапия SKH1 в настоящее время находится в фазе 1/2 испытания (<https://clinicaltrials.gov/study/NCT06641154>) и может быть применима к другим пациентам в возрасте от 3 месяцев до 10 лет.

Литература

1. Dhawan A, Lawlor MW, Mazariegos GV, McKiernan P, Squires JE, Strauss KA, Gupta D, James E, Prasad S. Disease burden of Crigler-Najjar syndrome: Systematic review and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020; 35 (4): 530–43. DOI: 10.1111/jgh.14853.
2. Collaud F, Bortolussi G, Guianvarc'h L, et al. Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of
3. Greig JA, Nordin JML, Draper C, et al. AAV8 Gene Therapy Rescues the Newborn Phenotype of a Mouse Model of Crigler-Najjar. *Hum Gene Ther*. 2018; 29 (7): 763–70.
4. D'Antiga L, Beuers U, Ronzitti G, et al. Gene Therapy in Patients with the Crigler-Najjar Syndrome. *N Engl J Med*. 2023; 389 (7): 620–31. DOI: 10.1056/NEJMoa2214084.

References

1. Dhawan A, Lawlor MW, Mazariegos GV, McKiernan P, Squires JE, Strauss KA, Gupta D, James E, Prasad S. Disease burden of Crigler-Najjar syndrome: Systematic review and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020; 35 (4): 530–43. DOI: 10.1111/jgh.14853.
2. Collaud F, Bortolussi G, Guianvarc'h L, et al. Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of
3. Greig JA, Nordin JML, Draper C, et al. AAV8 Gene Therapy Rescues the Newborn Phenotype of a Mouse Model of Crigler-Najjar. *Hum Gene Ther*. 2018; 29 (7): 763–70.
4. D'Antiga L, Beuers U, Ronzitti G, et al. Gene Therapy in Patients with the Crigler-Najjar Syndrome. *N Engl J Med*. 2023; 389 (7): 620–31. DOI: 10.1056/NEJMoa2214084.