

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 575.1

doi: 10.26907/2542-064X.2024.4.683-703

АНАЛИЗ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ 9 И RH.10 СЕРОТИПОВ, КОДИРУЮЩИХ ГЕН АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ А, ПОСЛЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ СВИНЕЙ ВИРУСОМ 9 СЕРОТИПА

А.И. Муллагулова¹, А.А. Шаймарданова¹, Я.О. Мухамедшина^{1,2},
В.В. Соловьева¹, А. Ибрахим¹, А.А. Ризванов^{1,3}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Республиканская клиническая больница, г. Казань, Россия, 420064, Россия

³Академия наук Республики Татарстан, г. Казань, 420111, Россия

Аннотация

Лизосомные болезни накопления представляют собой наследственные заболевания, связанные с нарушением функции лизосом, включая работу ферментов, важных для клеточного метаболизма, сигнальных путей и других биологических процессов. Метакроматическая лейкодистрофия (МЛД), входящая в группу лизосомных болезней накопления, вызвана дефицитом арилсульфатазы А (ARSA), что приводит к накоплению сульфатидов и разрушению миелиновых оболочек структур нервной системы. В статье обсуждается эффективность использования аденоассоциированных вирусов (AAB) при нейродегенеративных заболеваниях, включая МЛД. Показано биораспределение и безопасность векторов AAB9-ARSA и AABrh.10-ARSA после предварительной иммунизации свиней. Обсуждены иммунные аспекты, связанные с генной терапией на основе AAB, а также возможные ограничения в эффективности и долгосрочности такой терапии.

Ключевые слова: метакроматическая лейкодистрофия, арилсульфатаза, генная терапия, нейродегенеративное заболевание.

Введение

Лизосомные болезни накопления – это группа наследственных заболеваний, при которых нарушается функция лизосом, в частности из-за неправильной работы ферментов, участвующих в клеточном метаболизме, передаче сигналов, обработке субстратов, врожденном иммунитете, апоптозе и других сложных процессах рециркуляции клеток [1]. Метакроматическая лейкодистрофия (МЛД) входит в группу лизосомных болезней накопления и представляет собой аутосомно-рецессивную лейкодистрофию, которая вызвана дефектом метаболизма лизосомного фермента арилсульфатазы А (ARSA (англ. arylsulfatase A), OMIM: 250100) или белка-активатора сапозина В (SapB (англ. saposin B), OMIM: 249900). При МЛД происходит накопление сульфатидов, преимущественно в нейронах, вызывая дисфункции и разрушение миелиновой оболочки, покрывающей отростки многих нейронов центральной и периферической нервной системы [2]. Галакто-

зилцерамид и сульфатид являются двумя основными липидами миелиновой оболочки [3]. При МЛД вследствие недостаточной активности ARSA из-за мутаций гена *ARSA* не расщепляются сульфатированные гликолипиды, в основном галактозил-3-сульфатцерамиды [4]. Накопление сульфатидов приводит к дегенерации нейронов, дисфункции астроцитов, происходит демиелинизация, приводящая к нарушению двигательной функции, спастическому тетрапарезу, атаксии, спазмам, атрофии зрительного нерва и когнитивным нарушениям [5].

Выделяют три основных клинических типа МЛД: поздний инфантильный (возраст клинической манифестации до 30 месяцев), ювенильный (возраст клинической манифестации от 2.5 до 16 лет) и взрослый (возраст клинической манифестации после 16 лет) [5]. Уровень остаточной ферментативной активности ARSA коррелирует с типом и тяжестью симптомов МЛД [6]. Для деградации сульфатидов и поддержания нормальной жизнедеятельности человека достаточно 10–15 % ферментативной активности ARSA. Клиническая картина МЛД разнообразна и зависит от начала, скорости прогрессирования и наличия периферической невропатии [7].

Для лечения МЛД в основном используют симптоматическую терапию, направленную на устранение нейрокогнитивных и нейропсихиатрических нарушений. Существуют различные терапевтические подходы, такие как фермент-заместительная терапия, трансплантация костного мозга, трансплантация гемопоэтических клеток или пуповинной крови. Однако эффективность этих методов остается недостаточной для предотвращения усугубления неврологических нарушений у пациентов [8, 9]. В качестве альтернативы описан генно-клеточный препарат на основе аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим комплементарную ДНК гена *ARSA* [10].

Нейродегенеративные заболевания относятся к наиболее сложным для лечения из-за ограниченного доступа к структурам головного мозга как на физическом, так и на физиологическом уровне. Генная и генно-клеточная терапии являются хорошей альтернативой и за последнее десятилетие привели к значительным успехам в лечении заболеваний, затрагивающих нервную систему [11]. Аденоассоциированные вирусы (AAB) являются предпочтительным вектором, различные их серотипы проявляют тропизм к отдельным тканям [12]. На сегодняшний день основными серотипами, которые используют в генной терапии, нацеленной на центральную нервную систему, являются 1, 5, 8, 9 и rh10. Многообещающие результаты получены с использованием AAB9-ARSA на мышах с моделью МЛД [13] и на крупных животных – мини-пигах [14], а также с применением AABrh.10-ARSA на мышах с моделью МЛД и на нечеловекообразных приматах [15, 16]. Сопоставление AAB9-ARSA и AABrh.10-ARSA показало, что последний более эффективно инфицирует клетки периферической нервной системы и снижает накопление сульфатидов в нервной системе мышей с моделью МЛД [17].

AAB обладают низкой иммуногенностью по сравнению с другими вирусами, но известно, что AAB дикого типа приводит к образованию иммунного ответа с развитием как гуморального, так и Т-клеточного иммунитета. Иммунизация представляет собой образование В-клетками специфичных антител, ко-

которые могут связываться с вирусным капсидом и блокировать его связывание с клеткой-мишенью, что снижает эффективность инфицирования вирусом. Также могут образовываться Т-лимфоциты, специфичные к антигенам ААВ [18, 19]. Несмотря на то, что с ААВ не ассоциировано на данный момент ни одного заболевания, большинство людей имеют антитела против ААВ из-за естественного носительства вирусов различных серотипов, что может ограничивать эффективность генной терапии на основе ААВ.

Считается, что генная терапия на основе ААВ приводит к длительной экспрессии трансгена. Однако на данный момент отсутствует достаточное количество медицинских данных пациентов, позволяющее установить эффективные сроки терапии. Кроме того, существует лимит безопасного количества вирусных частиц, которое можно ввести пациенту. Поэтому генная терапия на основе ААВ имеет ограничения. Длительный терапевтический эффект генной терапии может быть достигнут путем многократного введения вирусных векторов [20, 21]. Однако повторное введение характеризуется меньшей эффективностью, поскольку после первого введения вирусного вектора иммунная система пациента может начать вырабатывать противовирусный ответ, например, нейтрализующие антитела и Т-клетки. При местном или системном введении вирус будет восприниматься как чужеродный белок, поэтому иммунная система попытается его устранить [22, 23].

Таким образом, понимание иммунного ответа на ААВ и управление им являются важными факторами при разработке и внедрении генной терапии. Текущие исследования в этой области направлены на повышение эффективности и безопасности векторов ААВ путем разработки стратегий преодоления иммунных барьеров. В настоящей работе проведен сравнительный анализ биораспределения и безопасности ААВ9-ARSA и ААВrh.10-ARSA, содержащих кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности гена *ARSA*, при интратекальном введении после предварительной иммунизации свиней с помощью внутривенного введения ААВ9-ARSA.

1. Материалы и методы

1.1. Плазмидные конструкции, используемые для сборки ААВ. В работе использовали векторную плазмиду, содержащую кодон-оптимизированную последовательность кДНК гена *ARSA* человека, полученную ранее и описанную в работе [14].

Для наработки плазмид в препаративных количествах трансформировали штамм *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, США). Клетки инкубировали в среде Лурия-Бертани в отсутствие антибиотика. Компетентные клетки получали с помощью CaCl_2 -метода. Генетическую трансформацию компетентных клеток проводили с помощью теплового шока, после чего трансформированные клетки инкубировали на селективной среде с ампициллином. Плазмидную ДНК (pAAB-ARSA, pAAB-RC и pHelper) выделяли из полученной бактериальной биомассы с использованием GeneJET Plasmid MaxiprepKit (кат. № K0482, Thermo Fisher Scientific Inc., США).

1.2. Получение и очистка рекомбинантного ААВ. ААВ получали с помощью стандартной ко-трансфекции тремя плазмидами в клетки ААВ293 (Agilent

Technologies, США) с использованием кальций-фосфатного метода. Клетки AAB293 культивировали при 37 °C во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂ в полной среде DMEM (ПанЭко, Россия), которая содержала 10 % фетальной телячьей сыворотки, L-глутамин, 1 % антибиотиков (пенициллин и стрептомицин). Через 72 ч после трансфекции клетки центрифугировали, к осадку добавляли лизирующий буфер (NaCl, трис-HCl с pH 8.5, MgCl₂, dH₂O), ДНКазу (Benzonase® Nuclease, Sigma-Aldrich, США), 25 %-ный дезоксихолат натрия. Лизаты очищали с использованием ступенчатого градиента плотности йодиксанола (60, 40, 25 и 15 %). На последнем этапе очистки вируса использовали концентратор, подходящий для белков с размером 50 кДа (Vivaspin 20, membrane 50 kDa от Sartorius, Великобритания). Титр вируса определяли с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием специфичных праймеров (прямой 5'-3'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT, обратный 5'-3'-CGGCCTCAGTGAGCGA) и зонда на инвертированные концевые повторы (5'-3' (FAM) CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG (BBQ)).

1.3. Животные. В работе использовали здоровых самок свиней возрастом 4 месяца и весом 9–12 кг. Общее количество подопытных свиней составляло 15 особей, которые были разделены на три группы. Для иммунизации свиньям внутривенно вводили AAB9-ARSA в количестве 1×10^{13} геномных копий/кг веса, кроме особей контрольной группы. Через 6 недель после первичной инъекции проводили интратекальное введение AAB9-ARSA и AABrh.10-ARSA в качестве второй точки эксперимента. Группы были разделены следующим образом: (1) интратекальное введение AAB9-ARSA в дозе 1×10^{12} геномных копий/кг ($n = 5$); (2) интратекальное введение AABrh.10-ARSA в дозе 1×10^{12} геномных копий/кг ($n = 5$); (3) контрольная группа без введения вируса ($n = 5$).

Свиней содержали в специализированных помещениях Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана (Россия, г. Казань) под наблюдением квалифицированного персонала. Эвтаназию животных проводили с использованием методов, которые соответствуют принципам, изложенным в Рекомендациях Европейской комиссии по эвтаназии подопытных животных.

1.4. Забор материала. До введения вируса отбирали спинномозговую жидкость (СМЖ) и кровь в качестве нулевой точки. На 42 сут после иммунизации у животных отбирали СМЖ и кровь и вводили AAB9-ARSA и AABrh.10-ARSA, после чего повторно проводили забор СМЖ и цельной крови на 49, 56, 63, 70 сут для оценки ферментативной активности ARSA в динамике. На 70 сут после введения вируса проводили эвтаназию подопытных свиней. Для определения уровня экспрессии ARSA проводили ПЦР-РВ, а также тест на определение ферментативной активности ARSA в гомогенатах различных отделов нервной системы.

У каждого животного проводили забор фрагментов следующих органов: мозжечок, затылочная доля головного мозга, шейный (С6-7), грудной (Th6-7) и поясничный (L2-3) отделы спинного мозга со спинальными корешками и ганглиями, скрытый нерв. Каждый из вышеперечисленных фрагментов помещали в 10%-ный раствор формалина. Через 48 ч от начала фиксации каждый фрагмент переносили последовательно в 15 и 30%-ную сахарозу. Полученные образцы

нервной ткани свиней в 30%-ной сахарозе помещали в среду для замораживания тканей Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Нидерланды). На криостате Microm HM 560 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) получали поперечные или сагитальные срезы исследуемых органов нервной системы толщиной 20 мкм и использовали для последующего иммунофлуоресцентного анализа.

1.5. Определение ферментативной активности ARSA проводили в плазме, СМЖ и гомогенатах органов. Плазму выделяли из цельной крови центрифугированием при 1900 об/мин в течение 20 мин. Фрагменты органов гомогенизировали в эппендорфах, содержащих 500 мкл натрий-ацетатного буферного раствора с добавлением стеклянных шариков, которые помещали в гомогенизатор и воздействовали частотой 5 Гц в течение 20 с. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 10 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость использовали для определения активности ARSA. Концентрацию общего белка в образцах определяли с помощью набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (кат. № 23227, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Образцы нормализовали относительно концентрации общего белка. Для определения активности ARSA 50 мкл образца инкубировали в течение 1 ч при 37 °C с раствором субстрата, состоящим из 0.01 М *n*-нитрокатехола сульфата в виде двунатриевой соли (кат. № N7251, Sigma-Aldrich, США), 0.5 М ацетата натрия, 5×10^{-4} М $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10%-ного хлорида натрия, pH = 5. Реакцию останавливали добавлением 1 н гидроксида натрия. В качестве стандартов использовали разведения сульфатазы (кат. № S9626, Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность измеряли при длине волны 515 нм. Ферментативную активность ARSA (нмоль/ч/мг белка) рассчитывали по формуле:

$$\text{Активность ARSA} = \frac{(A_{\text{образца}} - A_{\text{бланка}}) \times 1 \times 0.25 \times 1000}{12.6 \times 0.05 \times c_{\text{общего белка}}},$$

где A – оптическая плотность, 1 – время инкубации (ч), 0.25 – общий объем реакции (мл), 12.6 – коэффициент поглощения *n*-нитрокатехола сульфата при 515 нм, 0.05 – объем образца (мл), 1000 – коэффициент пересчета, $c_{\text{общего белка}}$ – концентрация общего белка (мг/мл).

1.6. ПЦР-РВ. Общую рибонуклеиновую кислоту (РНК) выделяли из органов животных с использованием TRIzol Reagent (кат. № 15596026, Invitrogen, США) согласно инструкции, предлагаемой производителем. Праймеры (прямой 5'-3'-CAAGGTACATGGCATTCGCA, обратный 5'-3'-CTGTGGATAGTGGGTGTGGT) и зонд (5'-3' (6-FAM) CCTGCCGCTGTGCATCTGCCA (BHQ-1)), специфичные к нуклеотидной последовательности *ARSA*, разработаны с помощью GenScript Online Real-time PCR (TaqMan) Primer Design Tool (GenScript, США) и синтезированы компанией «Евроген» (Россия).

Выделенную РНК применяли в качестве матрицы для синтеза кДНК с использованием обратной транскриптазы (кат. № SK021, MMLV RT kit, Евроген) согласно инструкции производителя. ПЦР-РВ по технологии TaqMan проводили в 96-луночных планшетах MicroAmp (кат. № MSA5001, BioRad, США). Для этого готовили смесь праймеров и зонда: прямой праймер – 3 мкл, обратный праймер – 3 мкл, зонд – 1 мкл, вода – 63 мкл. Далее готовили реакционную смесь для ПЦР-РВ, содержащую на 1 реакцию 2 мкл 5х реакционного буфера

qPCRmix-HS (кат. № PK145L, Евроген, Россия), 1.4 мкл смеси праймеров и зонд, 5.6 мкл воды и 1 мкл кДНК. ПЦР-амплификацию проводили с помощью CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, США) при следующих температурных условиях циклирования: предварительный нагрев при 95 °C в течение 3 мин, 45 циклов денатурации при 95 °C в течение 10 мин, отжиг при 55 °C в течение 30 с, элонгация при 72 °C в течение 30 с.

1.7. Оценка безопасности терапии. Для оценки безопасности проводили биохимический анализ крови. Для этого у животных отбирали цельную кровь в пробирки с гелем и активатором свертывания крови и центрифугировали в течение 20 мин при 1900 об/мин. В сыворотке крови определяли уровень аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), общего билирубина, креатинина с помощью биохимического анализатора ChemWell 2900 (Awareness Technology, США).

1.8. Иммунофлуоресцентный анализ. Криостатные поперечные или сагитальные срезы органов центральной и периферической нервной системы использовали для анализа экспрессии в ткани белка ARSA. Для иммунофлуоресцентного мечения срезы блокировали 5%-ной нормальной козьей сывороткой, далее окрашивали первичным антителом (кат. № PAA195Hu22, Cloud-Clone Corp., США), вторичными антителами (кат. № A32795, Invitrogen, США) и последовательно промывали натрий-фосфатным буферным раствором. Для визуализации ядер срезы окрашивали 10 мкг/мл 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (кат. № D9542, Sigma-Aldrich, США) в натрий-фосфатном буферном растворе. Срезы заключали в среду (кат. № sc-45086, ImmunoHistoMount, Santa Cruz Biotechnology, США) и изучали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

1.9. Статистический анализ. Анализ полученных данных проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США) с использованием критерия Шапиро-Уилка и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим post-hoc-тестом Тьюки. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm S$. Статистически достоверные различия обозначали как * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$.

2. Результаты

2.1. Анализ ферментативной активности ARSA. Для проверки функциональности рекомбинантных вирусов AAB9-ARSA и AABrh.10-ARSA после предварительной иммунизации с помощью внутривенного введения AAB9-ARSA и последующего интратекального введения AAB9-ARSA и AABrh.10-ARSA в дозе 1×10^{12} гк/кг рассмотрена активность ARSA в плазме крови, СМЖ и различных структурах центральной нервной системы. Статистически значимая разница в величинах ферментативной активности ARSA в СМЖ животных разных групп не обнаружена (рис. 1, а). Ферментативная активность ARSA в плазме крови свиней увеличивается на 14 и 28 сут после интратекального введения AABrh.10-ARSA на 240 и 220 % соответственно (рис. 1, б).

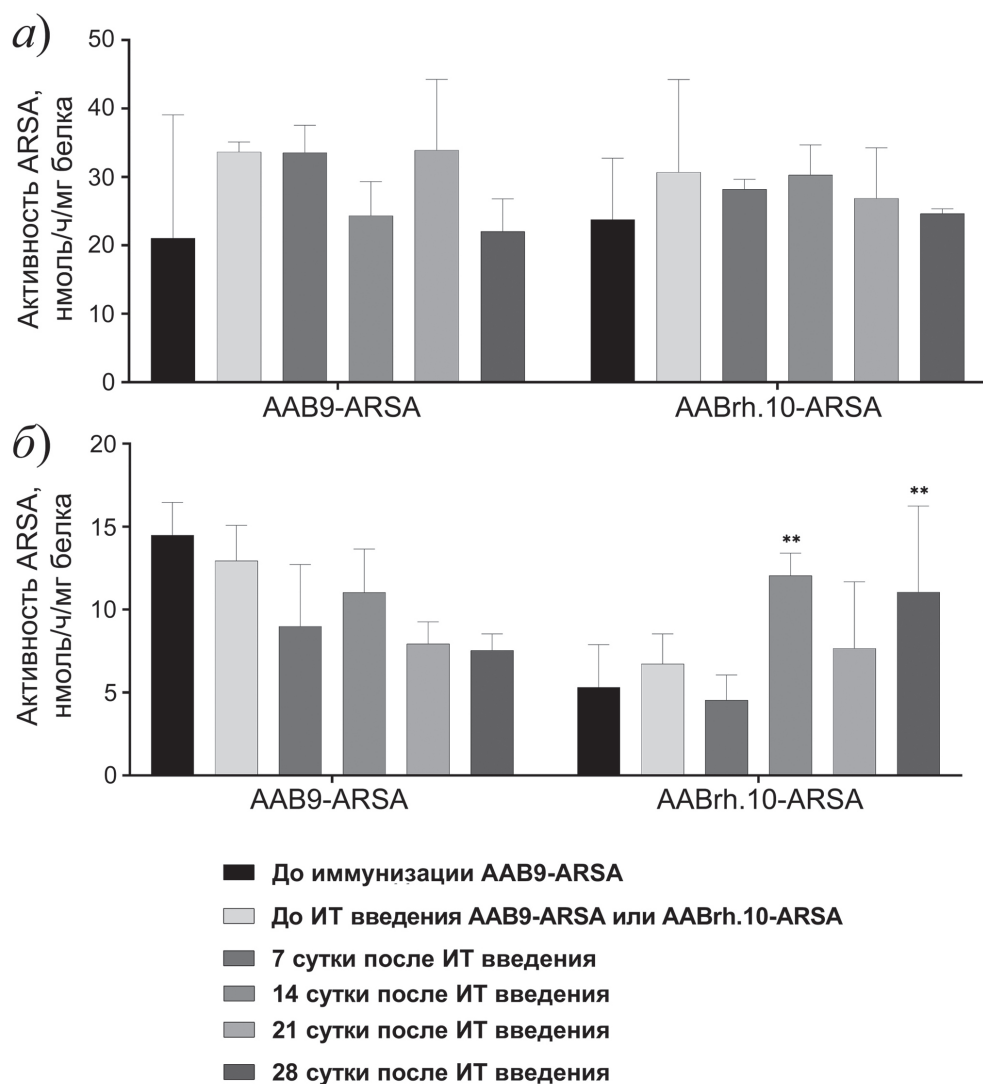


Рис. 1. Ферментативная активность ARSA в СМЖ (а) и плазме крови (б) после предварительной иммунизации AAB9-ARSA и последующего интратекального введения AAB9-ARSA (ИТ AAB9-ARSA) или AABrh.10-ARSA (ИТ AABrh.10-ARSA). ** – $p < 0.01$.

Установлено увеличение ферментативной активности ARSA в коре, мозжечке, поясничном отделе спинного мозга на 228, 228 и 121 % соответственно после введения AAB9-ARSA и на 232, 256 и 117 % соответственно после введения AABrh.10-ARSA по сравнению с результатами для контрольной группы животных (рис. 2).

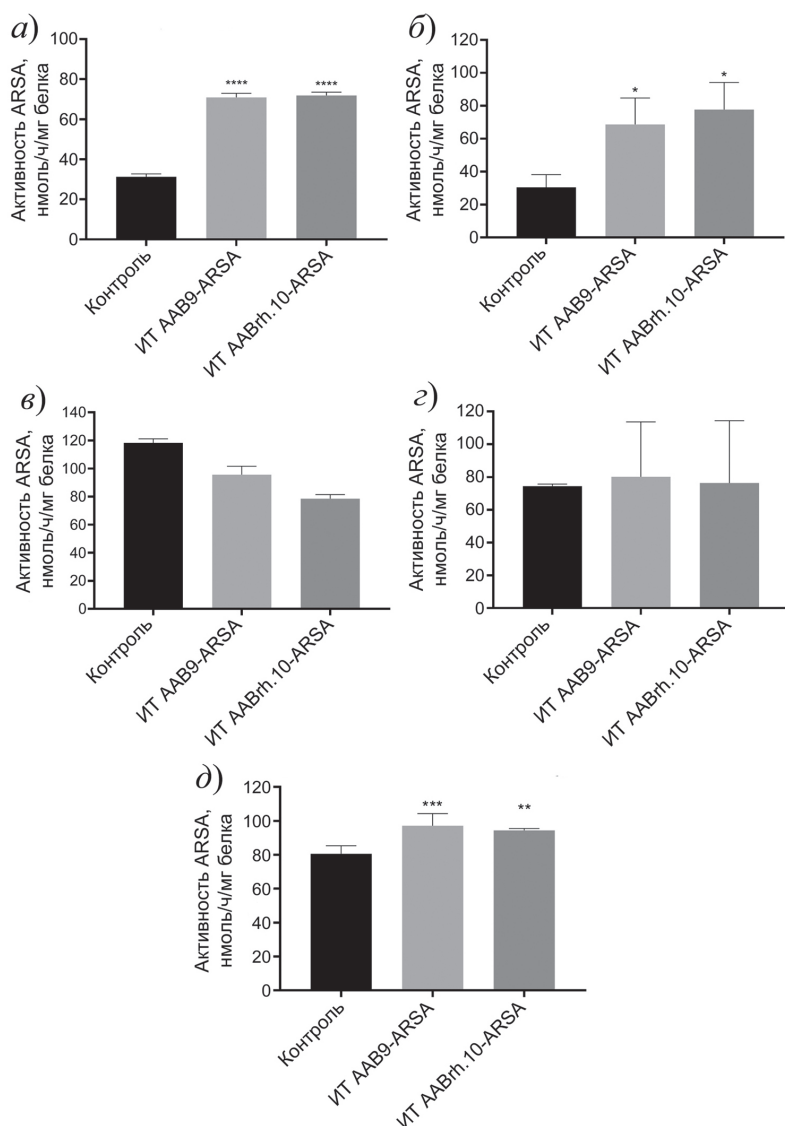


Рис. 2. Ферментативная активность ARSA в гомогенатах различных отделов нервной системы свиней после предварительной иммунизации AAB9-ARSA и последующего интратекального введения AAB9-ARSA (ИТ AAB9-ARSA) или AABrh.10-ARSA (ИТ AABrh.10-ARSA): *а* – кора затылочной доли головного мозга; *б* – мозжечок; *в* – шейный отдел спинного мозга; *г* – грудной отдел спинного мозга; *д* – поясничный отдел спинного мозга. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$. Контроль – контрольная группа животных

2.2. Анализ транскрипции мРНК ARSA в нервной ткани. Анализ с помощью ПЦР-РВ показал, что в первой группе животных после интратекального введения AAB9-ARSA в коре, мозжечке, шейном, грудном, поясничном отделах спинного мозга, ганглиях задних корешков шейного, грудного и поясничного отделов спинного мозга наблюдается транскрипция мРНК ARSA. Аналогичный эффект зарегистрирован и во второй группе животных, которым интратекально вводили AABrh.10-ARSA (рис. 3).

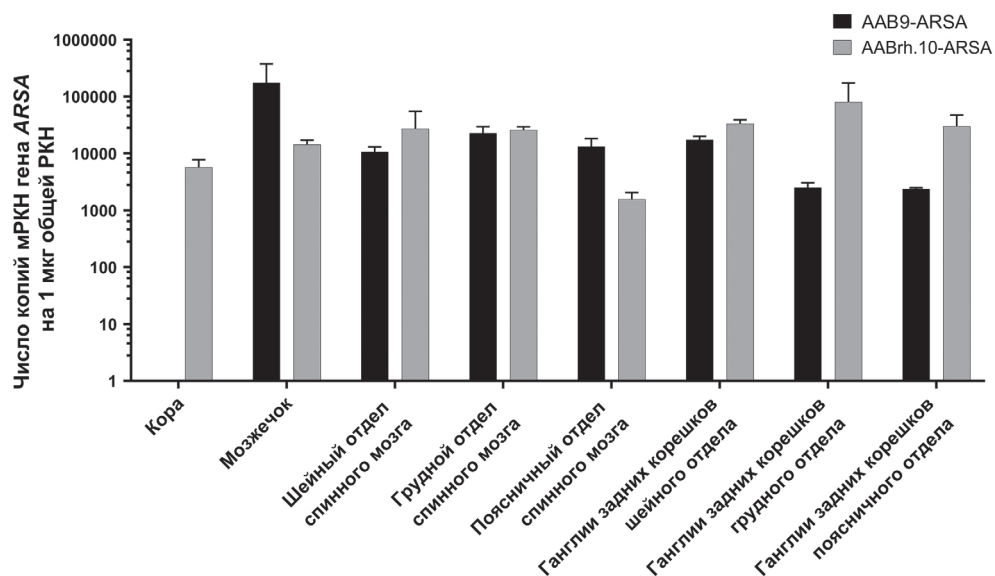


Рис. 3. Количество копий мРНК *ARSA* в различных отделах нервной системы свиней после предварительной иммунизации AAB9-ARSA и последующего интратекального введения AAB9-ARSA (AAB9-ARSA) и AABrh.10-ARSA (AABrh.10-ARSA) по данным ПЦР-РВ

2.3. Оценка безопасности терапии. Исследовано изменение биохимических показателей в сыворотке крови свиней до введения препарата, на 7 сут после иммунизации AAB9-ARSA, на 7 сут после последующего интратекального введения AAB9-ARSA или AABrh.10-ARSA, а также на 70 сут. Статистически значимых изменений в биохимических показателях (АЛТ, АСТ, креатинин, общий билирубин) после введения препаратов не обнаружено (рис. 4).

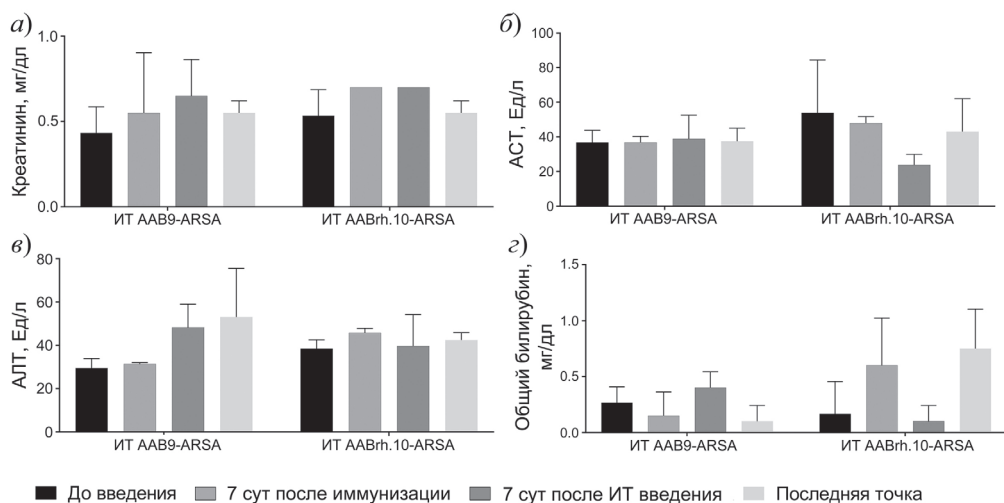


Рис. 4. Биохимические показатели сыворотки крови свиней после иммунизации AAB9-ARSA и последующего интратекального введения AAB9-ARSA (ИТ AAB9-ARSA) или AABrh.10-ARSA (ИТ AABrh.10-ARSA): а – креатинин; б – АСТ; в – АЛТ; г – общий билирубин. Данные получены с помощью иммуноферментного анализа

Также следует отметить, что после введения препаратов у животных не наблюдались признаки интоксикации, снижение массы тела, изменение походки и внешнего вида. При некропии не выявлены макроскопические изменения внутренних органов животных.

2.4. Оценка экспрессии *ARSA* в нервной системе. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что в обеих экспериментальных группах животных в коре мозжечка присутствуют сверхэкспрессирующие *ARSA* нейроны Пуркинье. Однако в первой группе (AAB9-ARSA) количество указанных клеток больше ($p < 0.05$), чем во второй (AABrh.10-ARSA) (рис. 5, а–а3). Обнаруженные сверхэкспрессирующие *ARSA* нейроны Пуркинье у экспериментальных животных чаще всего локализованы группами в границах одной извилины. У интактных свиней сверхэкспрессия *ARSA* в мозжечке, в частности в нейронах Пуркинье, не обнаружена (рис. 5, а2).

Анализ затылочной доли головного мозга не показал значимого увеличения экспрессии *ARSA* как в субарахноидальном пространстве, так и в коре у всех опытных свиней. На поперечных срезах коры головного мозга у свиней контрольной и обеих опытных групп обнаружены *ARSA*⁺-клетки, специфическое свечение в которых локализовано на периферии цитоплазмы тела клетки и частично в отростках.

Анализ поперечных срезов шейного, грудного и поясничного отделов спинного мозга показал достоверные различия в экспрессии *ARSA* в сером веществе животных первой и второй групп. Количество сверхэкспрессирующих *ARSA* нейронов в сером веществе шейного отдела спинного мозга животных во второй группе (AABrh.10-ARSA) было больше, чем в первой группе (AAB9-ARSA), в которой только у одной особи был найден единичный сверхэкспрессирующий *ARSA* нейрон (рис. 5, б–б4). Однако количество сверхэкспрессирующих *ARSA* нейронов в сером веществе грудного и поясничного отделов спинного мозга в первой группе (AAB9-ARSA) было больше, чем во второй группе (AABrh.10-ARSA) (рис. 5, в–в3). В вентральных рогах указанных отделов интактного спинного мозга свиней сверхэкспрессирующие *ARSA* нейроны не обнаружены.

Исследование ганглий заднего корешка на уровне шейного, грудного и поясничного отделов спинного мозга выявило сверхэкспрессирующие *ARSA* нейроны у животных обеих опытных групп, за исключением ганглий задних корешков поясничного отдела особей первой группы (AAB9-ARSA) (рис. 5, д–д5). Количество сверхэкспрессирующих *ARSA* нейронов ганглий задних корешков шейного отдела животных во второй группе (AABrh.10-ARSA) было больше ($p < 0.05$), чем в первой группе (AAB9-ARSA). Наибольшее количество сверхэкспрессирующих *ARSA* нейронов обнаружено в спинномозговых ганглиях на уровне грудного отдела спинного мозга, но различия между опытными группами недостоверны. Анализ корешков спинномозговых нервов и скрытого нерва не выявил различий в экспрессии *ARSA* у животных опытных и интактной групп.

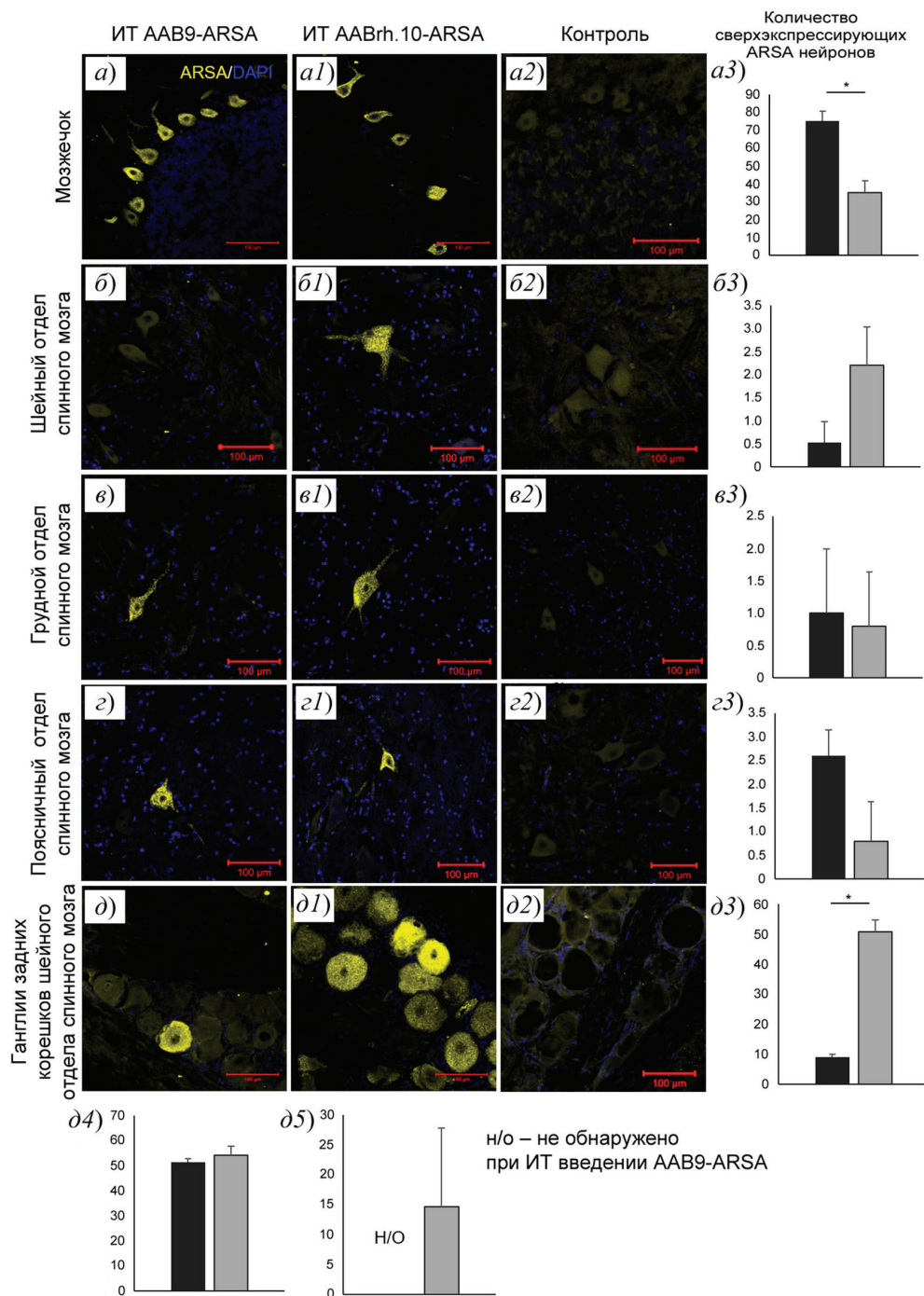


Рис. 5. Оценка экспрессии *ARSA* (желтое) в различных отделах нервной системы свиней после иммунизации AAB9-ARSA и последующего интратекального введения AAB9-ARSA (a–d) или AABrh.10-ARSA (a1–d1), а также в интактной группе животных (контроль a2–d2) методом конфокальной микроскопии (ядра окрашены DAPI (синее)). Шкала: 100 мкм. Количество сверхэкспрессирующих *ARSA* нейронов в области коры мозжечка (a3), шейного (б3), грудного (в3) и поясничного (г3) отделов спинного мозга, ганглий задних корешков шейного (д3), грудного (д4) и поясничного (д5) отделов спинного мозга. * – $p < 0.05$

Обсуждение

В настоящее время перспективными подходами для лечения МЛД являются генная и генно-клеточная терапии. При генно-клеточной терапии используют генетически модифицированные клетки, трансдуцированные с помощью ретро- и лентивирусов [24, 25]. В 2021 г. в Европейском союзе был одобрен генно-клеточный препарат под названием Libmeldy для трансплантации пациентам с предсимптоматической или очень ранней симптоматической стадиями МЛД, который содержит CD34⁺ гемопоэтические стволовые клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, кодирующим *ARSA*. Это приводит к ремиелинизации и нормализации двигательной активности пациентов. Тем не менее у пациентов, имевших симптомы заболевания на момент трансплантации, двигательная активность не улучшилась (NCT01560182, NCT03392987). Кроме того, применение лентивирусов потенциально может приводить к злокачественной трансформации генетически модифицированных клеток за счет вставочного мутагенеза, что также является лимитирующим фактором генно-клеточной терапии.

Векторы на основе AAV стали популярными системами доставки для терапевтического переноса генов и успешно используются в клинических исследованиях. За последние годы одобрены несколько препаратов, таких как Luxturna, Zolgensma, Hemgenix, и достигнуты долгосрочные терапевтические эффекты при других нейродегенеративных заболеваниях [5, 26]. Различные серотипы AAV отличаются эффективностью трансдукции нейронов. Тропизм и скорость трансдукции различных серотипов AAV зависят от тестируемых видов животных, областей мозга, путей введения и дозы вводимого препарата [27–29]. Эффективность AAV9 продемонстрирована на многочисленных доклинических моделях нарушений центральной нервной системы и в некоторых клинических исследованиях [14, 30]. На мышах с моделью МЛД показана эффективность внутривенного [13] и интратекального введения AAV9-*ARSA* [31]. Также на мышах с моделью МЛД показано, что внутривенное введение AAVrh.10-*ARSA* приводит к широкой трансдукции клеток головного и спинного мозга [32]. Такая же эффективность достигнута при интрацеребральном введении AAVrh.10 нечеловекообразным приматам [16].

Несмотря на быстрые темпы роста применения векторов AAV, их использование в определенных лечебных целях ограничено из-за недостатков, таких как ранее сформировавшийся гуморальный иммунитет к капсидам AAV, низкая эффективность трансдукции в определенных тканях, низкая органная специфичность и дозозависимая токсичность вектора у пациентов. Иммунный ответ пациента является основным препятствием для способности AAV вызывать эффективную и долгосрочную терапевтическую экспрессию генов. Иммунный ответ против капсида и/или транскгена AAV может вызывать сильный гуморальный иммунный ответ и выработать нейтрализующие антитела, препятствующие успешному повторному введению вектора [33]. Кроме того, капсид может запускать ответ цитотоксических Т-лимфоцитов, который приводит к потере экспрессии транскгена [34, 35]. Выполнен сравнительный анализ эффективности и безопасности AAV9-*ARSA* и AAVrh.10-*ARSA* с использованием интратекального введения после предварительной иммунизации свиней с помощью AAV9.

В предыдущих исследованиях [14] показана эффективность трансфекции первичных человеческих эмбриональных клеток почки (HEK293) pAAB-ARSA на основе данных ферментативной активности ARSA и вестрен-блот-анализа. Установлено, что трансфекция приводит к 15-кратному увеличению ферментативной активности ARSA в полученных клетках по сравнению с нативными клетками. Также отмечено наличие белка, молекулярная масса которого составила примерно 33 кДа [14].

В настоящей работе оценена способность AAB9-ARSA и AABrh.10-ARSA синтезировать функционально активный фермент ARSA при интратекальном введении после иммунизации животных с помощью внутривенного введения AAB9-ARSA. Наблюдение в динамике за ферментативной активностью ARSA показало ее увеличение в плазме крови только при введении AABrh.10-ARSA. Отсутствие ферментативной активности в плазме крови после повторного введения AAB9-ARSA можно объяснить тем, что иммунная система, возможно, распознала вирус после введения первой дозы и вызвала иммунный ответ, что препятствует трансдукции после повторного введения. Введенный AAB может быть абсорбирован или поглощен клетками вблизи места инъекции, что приведет к минимальному количеству AAB в СМЖ. Это объясняет отсутствие ферментативной активности ARSA в СМЖ. Ферментативная активность ARSA в гомогенатах органов статистически значимо увеличивается в обеих группах животных, но в большей степени при введении AABrh.10-ARSA. Анализ транскрипции *ARSA* с помощью ПЦР-РВ также показал, что большая экспрессия наблюдается во второй группе животных при введении AABrh.10-ARSA. Кроме того, при введении AAB9-ARSA сверхэкспрессия наблюдается в мозжечке и поясничном отделе спинного мозга. Данные иммунофлуоресцентного анализа показывают, что AABrh.10-ARSA способен лучше трансдуцировать нейроны спинного мозга на уровне шейного и грудного утолщения. В свою очередь, повторное введение AAB9-ARSA приводит к наиболее эффективной трансдукции нейронов мозжечка (клетки Пуркинье) и серого вещества спинного мозга на уровне поясничного утолщения, что подтверждается и ПЦР-РВ. Установлено, что повторное введение AAB приводит к трансдукции клеток нервной системы. Эффективность генной терапии после повторного введения AAB людям описана в клиническом испытании (NCT00482027), в котором AAB использовали для получения иммунного ответа на вакцину против ВИЧ [36]. Также есть клинические исследования (NCT01208389) с введением AAB2 пациентам с дистрофией сетчатки, показавшие, что повторное введение приводит к улучшению функции сетчатки и зрения, а также функционального зрения [37]. Продемонстрировано преимущество в трансдукции областей мозга при низких дозах внутривенно вводимого вектора AABrh.10 новорожденным мышам по сравнению с AAB9, однако различия в эффектах AAB9 и AABrh.10 становятся менее очевидными при увеличении дозы вектора, что объясняется отличиями в механизмах трансдукции для рассматриваемых серотипов AAB [29].

Различные типы введения и серотипы AAB могут по-разному влиять на типы клеток нервной системы. Показана большая экспрессия при интратекальном введении AABrh.10 по сравнению с AAB9 после предварительной иммунизации животных с помощью AAB9.

Заключение Комитета по этике. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике Казанского федерального университета (протокол № 23 от 30.06.2020.).

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2023-0011), а также программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Platt F.M., d'Azzo A., Davidson B.L., Neufeld E.F., Tiffi C.J. Lysosomal storage diseases // Nat. Rev. Dis. Primers. 2018. V. 4, No 1. Art. 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>.
2. Шаймарданова А.А., Чулпанова Д.С., Соловьева В.В., Муллагулова А.И., Китаева К.В., Ризванов А.А. Новые терапевтические стратегии для лечения метакроматической лейкодистрофии // Гены и клетки. 2020. Т. 15, № 2. С. 41–50. <https://doi.org/10.23868/202004023>.
3. Marcus J., Honigbaum S., Shroff S., Honke K., Rosenbluth J., Dupree J.L. Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure // Glia. 2006. V. 53, No 4. P. 372–381. <https://doi.org/10.1002/glia.20292>.
4. Lamichhane A., Rocha Cabrero F. Metachromatic Leukodystrophy. Treasure Island, FL: StatPearls Publ., 2023.
5. Shaimardanova A.A., Chulpanova D.S., Solovyeva V.V., Mullagulova A.I., Kitaeva K.V., Allegrucci C., Rizvanov A.A. Metachromatic leukodystrophy: Diagnosis, modeling, and treatment approaches // Front. Med. 2020. V. 7. Art. 576221. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.576221>.
6. Van Rappard D.F., Boelens J.J., Wolf N.I. Metachromatic leukodystrophy: Disease spectrum and approaches for treatment // Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab. 2015. V. 29, No 2. P. 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.10.001>.
7. Beerepoot S., Nierkens S., Boelens J.J., Lindemans C., Bugiani M., Wolf N.I. Peripheral neuropathy in metachromatic leukodystrophy: Current status and future perspective // Orphanet J. Rare Dis. 2019. V. 14, No 1. Art. 240. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1220-4>.
8. Smith N.J., Marcus R.E., Sahakian B.J., Kapur N., Cox T.M. Haematopoietic stem cell transplantation does not retard disease progression in the psycho-cognitive variant of late-onset metachromatic leukodystrophy // J. Inherited Metab. Dis. 2010. V. 33, No S3. P. 471–475. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9240-1>.
9. Matthes F., Stroobants S., Gerlach D., Wohlenberg C., Wessig C., Fogh J., Gieselmann V., Eckhardt M., D'Hooge R., Matzner U. Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age // Hum. Mol. Genet. 2012. V. 21, No 11. P. 2599–2609. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds086>.
10. Fumagalli F., Calbi V., Natali Sora M. G., Sessa M., Baldoli C., Rancoita P.M.V., Ciotti F., Sarzana M., Frascini M., Zambon A.A., Acquati S., Redaelli D., Attanasio V., Miglietta S., De Mattia F., Barzaghi F., Ferrua F., Migliavacca M., Tucci F., Gallo V., Del Carro U., Canale S., Spiga I., Liorioli L., Recupero S., Fratini E.S., Morena F., Silvani P., Calvi M.R., Facchini M., Locatelli S., Corti A., Zancan S., Antonioli G., Farinelli G., Gabaldo M., Garcia-Segovia J., Schwab L.C., Downey G.F., Filippi M., Cicalese M.P., Martino S., Di Serio C., Ciceri F., Bernardo M.E., Naldini L., Biffi A., Aiuti A. Lentiviral haematopoietic

- stem-cell gene therapy for early-onset metachromatic leukodystrophy: Long-term results from a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial and expanded access // *Lancet*. 2022. V. 399, No 10322. P. 372–383. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02017-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02017-1).
11. *Hocquemiller M., Giersch L., Audrain M., Parker S., Cartier N.* Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS diseases // *Hum. Gene Ther.* 2016. V. 27, No 7. P. 478–496. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.087>.
 12. *Cearley C.N., Wolfe J.H.* Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain // *Mol. Ther.* 2006. V. 13, No 3. P. 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.11.015>.
 13. *Miyake N., Miyake K., Asakawa N., Yamamoto M., Shimada T.* Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector // *Gene Ther.* 2014. V. 21, No 4. P. 427–433. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.17>.
 14. *Mullagulova A., Shaimardanova A., Solovyeva V., Mukhamedshina Y., Chulpanova D., Kostennikov A., Issa S., Rizvanov A.* Safety and efficacy of intravenous and intrathecal delivery of AAV9-mediated ARSA in minipigs // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24, No 11. Art. 9204. <https://doi.org/10.3390/ijms24119204>.
 15. *Piguet F., Sondhi D., Piraud M., Fouquet F., Hackett N.R., Ahouansou O., Vanier M.-T., Bieche I., Aubourg P., Crystal R.G., Cartier N., Sevin C.* Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice // *Hum. Gene Ther.* 2012. V. 23, No 8. P. 903–914. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.015>.
 16. *Rosenberg J.B., Chen A., De B.P., Dyke J.P., Ballon D.J., Monette S., Ricart Arbona R.J., Kaminsky S.M., Crystal R.G., Sondhi D.* Safety of direct intraparenchymal AAVrh.10-mediated central nervous system gene therapy for metachromatic leukodystrophy // *Hum. Gene Ther.* 2021. V. 32, Nos 11–12. P. 563–580. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.269>.
 17. *Newman S., Rupar T.* Viral vector therapy as a therapeutic option for peripheral nerve disease associated with metachromatic leukodystrophy // *Eur. J. Hum. Genet.* 2019. V. 27, No S2. P. 1134.
 18. *Whitehead M., Osborne A., Yu-Wai-Man P., Martin K.* Humoral immune responses to AAV gene therapy in the ocular compartment // *Biol. Rev.* 2021. V. 96, No 4. P. 1616–1644. <https://doi.org/10.1111/brv.12718>.
 19. *Nidetz N.F., McGee M.C., Tse L.V., Li C., Cong L., Li Y., Huang W.* Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: Understanding barriers to gene delivery // *Pharmacol. Ther.* 2020. V. 207. Art. 107453. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107453>.
 20. *Rivière C., Danos O., Douar A.M.* Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice // *Gene Ther.* 2006. V. 13, No 17. P. 1300–1308. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302766>.
 21. *Sinn P.L., Burnight E.R., McCray P.B., Jr.* Progress and prospects: Prospects of repeated pulmonary administration of viral vectors // *Gene Ther.* 2009. V. 16, No 9. P. 1059–1065. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.87>.
 22. *Louis Jeune V., Joergensen J.A., Hajjar R.J., Weber T.* Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy // *Hum. Gene Ther. Methods.* 2013. V. 24, No 2. P. 59–67. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.24>.
 23. *Kruzik A., Fetahagic D., Hartlieb B., Dorn S., Koppensteiner H., Horling F.M., Scheifflinger F., Reipert B.M., de la Rosa M.* Prevalence of anti-adeno-associated virus immune responses in international cohorts of healthy donors // *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.* 2019. V. 14. P. 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.05.014>.

24. Matzner U., Hartmann D., Lüllmann-Rauch R., Coenen R., Rothert F., Månsson J.-E., Fredman P., D'Hooge R., De Deyn P.P., Gieselmann V. Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: Effects on visceral and nervous system disease manifestations // *Gene Ther.* 2002. V. 9, No 1. P. 53–63. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301593>.
25. Biffi A., Capotondo A., Fasano S., del Carro U., Marchesini S., Azuma H., Malaguti M.C., Amadio S., Brambilla R., Grompe M., Bordignon C., Quattrini A., Naldini L. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116, No 11. P. 3070–3082. <https://doi.org/10.1172/JCI28873>.
26. Pupo A., Fernández A., Low S.H., François A., Suárez-Amarán L., Samulski R.J. AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy // *Mol. Ther.* 2022. V. 30, No 12. P. 3515–3541. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.09.015>.
27. Pillay S., Carette J.E. Host determinants of adeno-associated viral vector entry // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 24. P. 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.003>.
28. Zhang H., Yang B., Mu X., Ahmed S.S., Su Q., He R., Wang H., Mueller C., Sena-Esteves M., Brown R., Xu Z., Gao G. Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system // *Mol. Ther.* 2011. V. 19, No 8. P. 1440–1448. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.98>.
29. Tanguy Y., Biferi M.G., Besse A., Astord S., Cohen-Tannoudji M., Marais T., Barkats M. Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice // *Front. Mol. Neurosci.* 2015. V. 8. Art. 36. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00036>.
30. Saraiva J., Nobre R.J., de Almeida L.P. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9 // *J. Controlled Release.* 2016. V. 241. P. 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.011>.
31. Miyake N., Miyake K., Sakai A., Yamamoto M., Suzuki H., Shimada T. Treatment of adult metachromatic leukodystrophy model mice using intrathecal administration of type 9 AAV vector encoding arylsulfatase A // *Sci. Rep.* 2021. V. 11, No 1. Art. 20513. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99979-2>.
32. Audouard E., Oger V., Meha B., Cartier N., Sevin C., Piguet F. Complete correction of brain and spinal cord pathology in metachromatic leukodystrophy mice // *Front. Mol. Neurosci.* 2021. V. 14. Art. 677895. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.677895>.
33. Petry H., Brooks A., Orme A., Wang P., Liu P., Xie J., Kretschmer P., Qian H.S., Hermiston T.W., Harkins R.N. Effect of viral dose on neutralizing antibody response and transgene expression after AAV1 vector re-administration in mice // *Gene Ther.* 2008. V. 15, No 1. P. 54–60. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3303037>.
34. Manno C.S., Pierce G.F., Arruda V.R., Glader B., Ragni M., Rasko J.J.E., Ozelo M.C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Rustagi P., Nakai H., Chew A., Leonard D., Wright J.F., Lessard R.R., Sommer J.M., Tigges M., Sabatino D., Luk A., Jiang H., Mingozzi F., Couto L., Ertl H.C., High K.A., Kay M.A. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response // *Nat. Med.* 2006. V. 12, No 3. P. 342–347. <https://doi.org/10.1038/nm1358>.
35. Li C., Samulski R.J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy // *Nat. Rev. Genet.* 2020. V. 21, No 4. P. 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>.
36. Vardas E., Kaleebu P., Bekker L.-G., Hoosen A., Chomba E., Johnson P.R., Anklesaria P., Birungi J., Barin B., Boaz M., Cox J., Lehrman J., Stevens G., Gilmour J., Tarragona T., Hayes P., Lowenbein S., Kizito E., Fast P., Heald A.E., Schmidt C. A phase 2 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 vaccine based on

- adeno-associated virus // AIDS. Res. Hum. Retroviruses. 2010. V. 26, No 8. P. 933–942. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.024>.
37. Bennett J., Wellman J., Marshall K.A., McCague S., Ashtari M., DiStefano-Pappas J., Elci O.U., Chung D.C., Sun J., Wright J.F., Cross D.R., Aravand P., Cyckowski L.L., Bennicelli J.L., Mingozzi F., Auricchio A., Pierce E.A., Ruggiero J., Leroy B.P., Simonelli F., High K.A., Maguire A.M. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by *RPE65* mutations: A follow-on phase 1 trial // Lancet. 2016. V. 388, No 10045. P. 661–672. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30371-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30371-3).

Поступила в редакцию 29.01.2024

Принята к публикации 23.05.2024

Муллагулова Айсылу Илдаровна, аспирант кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии, младший научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: aisilu.mullagulova@yandex.ru

Шаймарданова Алиса Алмазовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: aliceshaimardanova@mail.ru

Мухамедшина Яна Олеговна, доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии; главный научный сотрудник

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Республиканская клиническая больница
Оренбургский тракт, д. 138., г. Казань, 420064, Россия
E-mail: yana.k-z-n@mail.ru

Соловьева Валерия Владимировна, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: solovyovavv@gmail.com

Ибрахим Ахмад, магистрант кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ahmadibrahim4949@gmail.com

Ризванов Альберт Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины, профессор кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии; академик-секретарь отделения медицинских и биологических наук

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Академия наук Республики Татарстан
ул. Баумана, д. 20, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: rizvanov@gmail.com

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.4.683-703

**Biodistribution Analysis of Adeno-Associated Viral Vectors of Serotypes 9 and rh.10
Encoding Arylsulfatase A Following Prior Immunization with Serotype 9 in Pigs***A.I. Mullagulova^{a*}, A.A. Shaimardanova^{a**}, Ya.O. Mukhamedshina^{a,b***},**V.V. Solovyeva^{a****}, A. Ibrahim^{a*****}, A.A. Rizvanov^{a,c*****}**^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia**^bRepublican Clinical Hospital of Tatarstan, Kazan, 420064 Russia**^cTatarstan Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia*E-mail: **aisilu.mullagulova@yandex.ru, **aliceshaimardanova@mail.ru, ***yana.k-z-n@mail.ru,*
*****solovyovavv@gmail.com, *****ahmadibrahim4949@gmail.com, *****rizvanov@gmail.com*

Received January 29, 2024; Accepted May 23, 2024

Abstract

Lysosomal storage diseases are a group of inherited disorders caused by lysosomal dysfunction, impairing cellular metabolic enzymes, signaling pathways, and other biological processes. Among them is metachromatic leukodystrophy (MLD) associated with arylsulfatase A (ARSA) deficiency, which leads to the accumulation of sulfatides and the destruction of myelin sheaths in the nervous system. This study evaluates the therapeutic efficacy of adeno-associated viruses (AAVs) in treating neurodegenerative diseases such as MLD. The biodistribution and safety of AAV9-ARSA and AAVrh.10-ARSA vectors following prior immunization in pigs were shown. The immune aspects of AAV-based gene therapy were outlined. Its potential efficacy and durability limitations were discussed.

Keywords: metachromatic leukodystrophy, arylsulfatase, gene therapy, neurodegenerative disease

Institutional Review Board Statement. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of Kazan Federal University (protocol no. 23 dated June 30, 2020).

Acknowledgments. This study was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (project no. FZSM-2023-0011) and supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. ARSA enzymatic activity in CSF (*a*) and blood plasma (*b*) following prior immunization with AAV9-ARSA and subsequent intrathecal injection of AAV9-ARSA (IT AAV9-ARSA) or AAVrh.10-ARSA (IT AAVrh.10-ARSA). ** – $p < 0.01$.

Fig. 2. ARSA enzymatic activity in the homogenates of various regions of the pig nervous system following prior immunization with AAV9-ARSA and subsequent intrathecal injection of AAV9-ARSA (IT AAV9-ARSA) or AAVrh.10-ARSA (IT AAVrh.10-ARSA): *a* – occipital cortex; *b* – cerebellum; *c* – cervical spinal cord; *d* – thoracic spinal cord; *e* – lumbar spinal cord. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$. Control – the control group of animals.

Fig. 3. Number of ARSA mRNA copies in various regions of the pig nervous system following prior immunization with AAV9-ARSA and subsequent intrathecal injection of AAV9-ARSA (AAB9-ARSA) and AAVrh.10-ARSA (AABrh.10-ARSA) based on the qPCR data.

Fig. 4. Blood serum biochemical parameters in pigs following prior immunization with AAV9-ARSA and subsequent intrathecal injection of AAV9-ARSA (IT AAV9-ARSA) or AAVrh.10-ARSA (IT AAVrh.10-ARSA): *a* – creatinine; *b* – AST; *c* – ALT; *d* – total bilirubin. Data obtained by the enzyme immunoassay.

Fig. 5. Assessment of *ARSA* expression (yellow) in various regions of the pig nervous system following prior AAV9-ARSA immunization and subsequent intrathecal injection of AAV9-ARSA (*a–e*) or AAVrh.10-ARSA (*a1–e1*), compared to the control group (control, *a2–e2*). Confocal microscopy (cell nuclei stained with DAPI (blue)). Scale bar: 100 μ m. Number of *ARSA* overexpressing neurons in: cerebellar cortex (*a3*); cervical (*b3*), thoracic (*c3*), and lumbar (*d3*) spinal cord regions; posterior root ganglia of cervical (*d3*), thoracic (*d4*), and lumbar (*d5*) spinal cord regions. * – $p < 0.05$.

References

1. Platt F.M., d'Azzo A., Davidson B.L., Neufeld E.F., Tift C.J. Lysosomal storage diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2018, vol. 4, no. 1, art. 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>.
2. Shaimardanova A.A., Chulpanova D.S., Solovyeva V.V., Mullagulova A.I., Kitaeva K.V., Rizvanov A.A. New therapeutic strategies for the treatment of metachromatic leukodystrophy. *Genes & Cells*, 2020, vol. 15, no. 2, pp. 41–50. <https://doi.org/10.23868/202004023>. (In Russian)
3. Marcus J., Honigbaum S., Shroff S., Honke K., Rosenbluth J., Dupree J.L. Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. *Glia*, 2006, vol. 53, no. 4, pp. 372–381. <https://doi.org/10.1002/glia.20292>.
4. Lamichhane A., Rocha Cabrero F. *Metachromatic Leukodystrophy*. Treasure Island, FL, StatPearls Publ., 2023.
5. Shaimardanova A.A., Chulpanova D.S., Solovyeva V.V., Mullagulova A.I., Kitaeva K.V., Allegrucci C., Rizvanov A.A. Metachromatic leukodystrophy: Diagnosis, modeling, and treatment approaches. *Front. Med.*, 2020, vol. 7, art. 576221. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.576221>.
6. Van Rappard D.F., Boelens J.J., Wolf N.I. Metachromatic leukodystrophy: Disease spectrum and approaches for treatment. *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015, vol. 29, no. 2, pp. 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.10.001>.
7. Beerepoot S., Nierkens S., Boelens J.J., Lindemans C., Bugiani M., Wolf N.I. Peripheral neuropathy in metachromatic leukodystrophy: Current status and future perspective. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2019, vol. 14, no. 1, art. 240. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1220-4>.
8. Smith N.J., Marcus R.E., Sahakian B.J., Kapur N., Cox T.M. Haematopoietic stem cell transplantation does not retard disease progression in the psycho-cognitive variant of late-onset metachromatic leukodystrophy. *J. Inherited Metab. Dis.*, 2010, vol. 33, no. S3, pp. 471–475. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9240-1>.
9. Matthes F., Stroobants S., Gerlach D., Wohlenberg C., Wessig C., Fogh J., Gieselmann V., Eckhardt M., D'Hooge R., Matzner U. Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. *Hum. Mol. Genet.*, 2012, vol. 21, no. 11, pp. 2599–2609. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds086>.
10. Fumagalli F., Calbi V., Natali Sora M. G., Sessa M., Baldoli C., Rancoita P.M.V., Ciotti F., Sarzana M., Frascini M., Zambon A.A., Acquati S., Redaelli D., Attanasio V., Miglietta S., De Mattia F., Barzaghi F., Ferrua F., Migliaiavacca M., Tucci F., Gallo V., Del Carro U., Canale S., Spiga I., Liorioli L., Recupero S., Fratini E.S., Morena F., Silvani P., Calvi M.R., Facchini M., Locatelli S., Corti A., Zancan S., Antonoli G., Farinelli G., Gabaldo M., Garcia-Segovia J., Schwab L.C., Downey G.F., Filippi M., Cicalese M.P., Martino S., Di Serio C., Ciceri F., Bernardo M.E., Naldini L., Biffi A., Aiuti A. Lentiviral haematopoietic stem-cell gene therapy for early-onset metachromatic leukodystrophy: Long-term results from a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial and expanded access. *Lancet*, 2022, vol. 399, no. 10322, pp. 372–383. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02017-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02017-1).
11. Hocquemiller M., Giersch L., Audrain M., Parker S., Cartier N. Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS diseases. *Hum. Gene Ther.*, 2016, vol. 27, no. 7, pp. 478–496. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.087>.
12. Cearley C.N., Wolfe J.H. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.*, 2006, vol. 13, no. 3, pp. 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.11.015>.

13. Miyake N., Miyake K., Asakawa N., Yamamoto M., Shimada T. Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector. *Gene Ther.*, 2014, vol. 21, no. 4, pp. 427–433. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.17>.
14. Mullagulova A., Shaimardanova A., Solovyeva V., Mukhamedshina Y., Chulpanova D., Kostennikov A., Issa S., Rizvanov A. Safety and efficacy of intravenous and intrathecal delivery of AAV9-mediated ARSA in minipigs. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 11, art. 9204. <https://doi.org/10.3390/ijms24119204>.
15. Piguet F., Sondhi D., Piraud M., Fouquet F., Hackett N.R., Ahouansou O., Vanier M.-T., Bieche I., Aubourg P., Crystal R.G., Cartier N., Sevin C. Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice. *Hum. Gene Ther.*, 2012, vol. 23, no. 8, pp. 903–914. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.015>.
16. Rosenberg J.B., Chen A., De B.P., Dyke J.P., Ballon D.J., Monette S., Ricart Arbona R.J., Kaminsky S.M., Crystal R.G., Sondhi D. Safety of direct intraparenchymal AAVrh.10-mediated central nervous system gene therapy for metachromatic leukodystrophy. *Hum. Gene Ther.*, 2021, vol. 32, nos. 11–12, pp. 563–580. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.269>.
17. Newman S., Rupar T. Viral vector therapy as a therapeutic option for peripheral nerve disease associated with metachromatic leukodystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2019, vol. 27, no. S2, p. 1134.
18. Whitehead M., Osborne A., Yu-Wai-Man P., Martin K. Humoral immune responses to AAV gene therapy in the ocular compartment. *Biol. Rev.*, 2021, vol. 96, no. 4, pp. 1616–1644. <https://doi.org/10.1111/brv.12718>.
19. Nidetz N.F., McGee M.C., Tse L.V., Li C., Cong L., Li Y., Huang W. Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: Understanding barriers to gene delivery. *Pharmacol. Ther.*, 2020, vol. 207, art. 107453. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107453>.
20. Rivière C., Danos O., Douar A.M. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther.*, 2006, vol. 13, no. 17, pp. 1300–1308. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302766>.
21. Sinn P.L., Burnight E.R., McCray P.B., Jr. Progress and prospects: Prospects of repeated pulmonary administration of viral vectors. *Gene Ther.*, 2009, vol. 16, no. 9, pp. 1059–1065. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.87>.
22. Louis Jeune V., Joergensen J.A., Hajjar R.J., Weber T. Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum. Gene Ther. Methods*, 2013, vol. 24, no. 2, pp. 59–67. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.24>.
23. Kruzik A., Fetahagic D., Hartlieb B., Dorn S., Koppensteiner H., Horling F.M., Scheiflinger F., Reipert B.M., de la Rosa M. Prevalence of anti-adeno-associated virus immune responses in international cohorts of healthy donors. *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.*, 2019, vol. 14, pp. 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.05.014>.
24. Matzner U., Hartmann D., Lüllmann-Rauch R., Coenen R., Rothert F., Månsson J.-E., Fredman P., D’Hooge R., De Deyn P.P., Gieselmann V. Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: Effects on visceral and nervous system disease manifestations. *Gene Ther.*, 2002, vol. 9, no. 1, pp. 53–63. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301593>.
25. Biffi A., Capotondo A., Fasano S., del Carro U., Marchesini S., Azuma H., Malaguti M.C., Amadio S., Brambilla R., Grompe M., Bordignon C., Quattrini A., Naldini L. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, no. 11, pp. 3070–3082. <https://doi.org/10.1172/JCI28873>.
26. Pupo A., Fernández A., Low S.H., François A., Suárez-Amarán L., Samulski R.J. AAV vectors: The Rubik’s cube of human gene therapy. *Mol. Ther.*, 2022, vol. 30, no. 12, pp. 3515–3541. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.09.015>.
27. Pillay S., Carette J.E. Host determinants of adeno-associated viral vector entry. *Curr. Opin. Virol.*, 2017, vol. 24, pp. 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.003>.
28. Zhang H., Yang B., Mu X., Ahmed S.S., Su Q., He R., Wang H., Mueller C., Sena-Esteves M., Brown R., Xu Z., Gao G. Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol. Ther.*, 2011, vol. 19, no. 8, pp. 1440–1448. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.98>.

29. Tanguy Y., Biferi M.G., Besse A., Astord S., Cohen-Tannoudji M., Marais T., Barkats M. Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front. Mol. Neurosci.*, 2015, vol. 8, art. 36. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00036>.
30. Saraiva J., Nobre R.J., de Almeida L.P. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J. Controlled Release*, 2016, vol. 241, pp. 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.011>.
31. Miyake N., Miyake K., Sakai A., Yamamoto M., Suzuki H., Shimada T. Treatment of adult metachromatic leukodystrophy model mice using intrathecal administration of type 9 AAV vector encoding arylsulfatase A. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1, art. 20513. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99979-2>.
32. Audouard E., Oger V., Meha B., Cartier N., Sevin C., Piguet F. Complete correction of brain and spinal cord pathology in metachromatic leukodystrophy mice. *Front. Mol. Neurosci.*, 2021, vol. 14, art. 677895. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.677895>.
33. Petry H., Brooks A., Orme A., Wang P., Liu P., Xie J., Kretschmer P., Qian H.S., Hermiston T.W., Harkins R.N. Effect of viral dose on neutralizing antibody response and transgene expression after AAV1 vector re-administration in mice. *Gene Ther.*, 2008, vol. 15, no. 1, pp. 54–60. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3303037>.
34. Manno C.S., Pierce G.F., Arruda V.R., Glader B., Ragni M., Rasko J.J.E., Ozelo M.C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Rustagi P., Nakai H., Chew A., Leonard D., Wright J.F., Lessard R.R., Sommer J.M., Tigges M., Sabatino D., Luk A., Jiang H., Mingozzi F., Couto L., Ertl H.C., High K.A., Kay M.A. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.*, 2006, vol. 12, no. 3, pp. 342–347. <https://doi.org/10.1038/nm1358>.
35. Li C., Samulski R.J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 2020, vol. 21, no. 4, pp. 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>.
36. Vardas E., Kaleebu P., Bekker L.-G., Hoosen A., Chomba E., Johnson P.R., Anklesaria P., Birungi J., Barin B., Boaz M., Cox J., Lehrman J., Stevens G., Gilmour J., Tarragona T., Hayes P., Lowenbein S., Kizito E., Fast P., Heald A.E., Schmidt C. A phase 2 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 vaccine based on adeno-associated virus. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 2010, vol. 26, no. 8, pp. 933–942. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.024>.
37. Bennett J., Wellman J., Marshall K.A., McCague S., Ashtari M., DiStefano-Pappas J., Elci O.U., Chung D.C., Sun J., Wright J.F., Cross D.R., Aravand P., Cyckowski L.L., Bennicelli J.L., Mingozzi F., Auricchio A., Pierce E.A., Ruggiero J., Leroy B.P., Simonelli F., High K.A., Maguire A.M. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by *RPE65* mutations: A follow-on phase 1 trial. *Lancet*, 2016, vol. 388, no. 10045, pp. 661–672. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30371-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30371-3).

Для цитирования: Муллагулова А.И., Шаймарданова А.А., Мухамедишина Я.О., Соловьева В.В., Ибрахим А., Ризванов А.А. Анализ биораспределения аденоассоциированных вирусов 9 и rh.10 серотипов, кодирующих ген арилсульфатазы А, после предварительной иммунизации свиней вирусом 9 серотипа // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 4. С. 683–703. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.4.683-703>.

For citation: Mullagulova A.I., Shaimardanova A.A., Mukhamedshina Ya.O., Solovyeva V.V., Ibrahim A., Rizvanov A.A. Biodistribution analysis of adeno-associated viral vectors of serotypes 9 and rh.10 encoding arylsulfatase A following prior immunization with serotype 9 in pigs. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 4, pp. 683–703. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.4.683-703>. (In Russian)