

**УДК 576.385.7**

**Современные стратегии лечения лизосомных болезней накопления**

Чечулин Е. С.

Тюменский Государственный медицинский университет

Тюмень, Россия

**Modern strategies for the therapy of lysosomal storage diseases**

Chechulin E. S.

Tyumen State Medical University

Tyumen, Russia

**Аннотация**

Лизосомные болезни накопления (LSDs – англ. Lysosomal storage diseases) – группа редко встречающихся заболеваний накопления, являющихся следствием первичной генной мутации. Известно уже более 50 разновидностей LSDs, и традиционно они классифицируются согласно химическим свойствам накопленного комплекса. Отдельные случаи LSDs встречается не чаще, чем у одного из 100 тысяч новорождённых, при этом распространённость конкретного заболевания в различных популяциях может значительно варьироваться. В статье представлен обзор научных публикаций, в которых рассматриваются современные стратегии и принципы лечения лизосомных болезней накопления. Рассматриваются положительные и отрицательные моменты применения различных методик, среди которых выделяются: фермент-заместительная терапия, трансплантация стволовых гемопоэтических клеток, использование молекул фармакологических шаперонов и генотерапии. Проанализированы проблемы, возникающие при использовании данных терапевтических стратегий.

**Ключевые слова:** лизосомные болезни накопления; лизосомные ферменты; фермент-заместительная терапия; трансплантация гемопоэтических клеток; фармакологические шапероны; генотерапия.

**Annotation**

Lysosomal storage disease accumulation (LSD – Lysosomal storage disease accumulation) – a group of rare diseases of accumulation, which is a consequence of primary gene mutations. Already there are more than 50 varieties of LBN, and traditionally they are classified according to the chemical properties of the accumulated complex. Individual cases of LSD meeting is not more than one

person from 100 thousand newborns, while the prevalence of specific diseases in different populations may vary considerably. The article presents a review of the scientific publications that describe the current policies and principles of treatment of lysosomal diseases of accumulation. Examines the positive-and negative aspects of the application of various techniques, among which are: enzyme-replacement therapy, the transplantation of hematopoietic stem cells, the use of molecules of pharmacological chaperones and gene therapy. Analyzed problems encountered when using these therapeutic strategies.

**Keywords:** lysosomal storage diseases; lysosomal enzymes; enzyme replacement therapy; transplantation of hematopoietic cells; pharmacological chaperones; gene therapy.

## **Введение**

Лизосомные болезни накопления (LSDs – англ. Lysosomal storage diseases) – группа редко встречающихся наследственных заболеваний, вызываемых генетически обусловленным дефектом лизосомных гидролитических ферментов, клеточных транспортеров и белков, входящих в состав мембран. В конечном счете это приводит к накоплению макромолекул и метаболитов в клетках, а как следствие к повреждению отбельных тканей, органов и систем организма. Болезни накопления являются следствием первичной генной мутации.

Известно уже более 50 разновидностей LSDs, и традиционно они классифицируются согласно химическим свойствам накопленного комплекса. Отдельные случаи LSDs встречается не чаще, чем у одного из 100 тысяч новорождённых, при этом распространённость конкретного заболевания в различных популяциях может значительно варьироваться [12].

Большинство LSD наследуются аутосомно-рецессивно, за исключением заболеваний, которые наследуются сцеплено с X хромосомой. К ним относятся мукополисахаридоз Хантера (МПС II) и болезнь Фабри, являющиеся рецессивными X-сцепленными заболеваниями, а также синдром Данона, являющийся доминантным X-сцепленным заболеванием.

Заболевания характеризуются тяжестью последствий с точки зрения здоровья пациентов, социальных и экономических затрат. LSD затрагивают многие ткани и органы, поэтому для них характерна множественность внутренних, соматических и неврологических проявлений. Среди клинических проявлений, связанных с центральной нервной системой, чаще можно встретить прогрессирующие нейродегенеративные заболевания и умственную отсталость [2, 5].

Мультиполярность фенотипических проявлений LSD и их патофизиология представляют определенную сложность для терапевтических вмешательств. Способы лечения должны

быть направлены как на устранение причины заболевания, на восстановление пораженных органов, так и на повышение качества жизни пациентов. Начиная с конца 20 века было внедрено много терапевтических методов, однако у данных подходов есть ограничения, и важные проблемы остаются нерешенными. Кроме того, у каждого из доступных подходов есть строгие признаки и критерии применимости для отдельного LSD, или даже для отдельных пациентов. В принципе, ни у одного из вариантов нет возможности устраняя

ить все заболевания, поэтому в текущих условиях все силы направлены на поиски альтернативных терапевтических подходов для лечения LSDs на основе инновационных стратегий [3, 14].

Существует три основные научные стратегии в лечении LSD, которые ориентированы на снижение концентрации патологического субстрата, восстановление и поддержание конформации поврежденного белка, либо на устранение первопричины – генетической мутации.

### **1. Воздействие на патологический субстрат**

Стратегия воздействия на патологический субстрат заключается в двух подходах: химическая модификация продукта накопления и снижение синтеза субстрата. Модификация продукта применяется в том случае, если происходит повреждение транспортных систем лизосом [3, 6]. Химическое превращение накопившегося субстрата позволяет получить такое вещество, которое может без трудностей выходить из лизосом через их мембранные переносчики. Данный механизм лежит в основе лечения цистиноза. Цистиноз - редкое аутосомно-рецессивное заболевание, причиной которого является мутация в гене CTNS, кодирующем лизосомальный переносчик цистина. При этом заболевании в различных органах и тканях происходит накопление цистина в лизосомах и отложение его кристаллов. Для лечения данной патологии используется цистеамин – единственное вещество, являющееся супрессором отложения цистина внутри лизосом. Препарат проникает в органеллу, где расщепляет цистин на две молекулы цистеина и затем соединяется с одной из них с помощью дисульфидной связи. Образующиеся при этом цистеин-цистеаминовый комплекс и цистеин не нуждаются в цистинозине для выхода из лизосомы. Дисульфидное соединение, являющееся аналогом лизина, переносится через лизиновый транспортер [6].

Большинство известных на данный момент групп LSDs связаны со сбоем определенных стадий катаболизма (мукополисахаридозы, гликофинголипидозы и т.д.), и их патогенетические механизмы обусловлены накоплением в клетках нерасщепленного субстрата [16]. Методика снижения синтеза субстрата применяется в том случае, если сохраняется малая активность дефектного фермента. При субстратредуцирующей терапии происходит снижение

катализируемого вещества, этим путем достигается равновесие между синтезом субстрата и его диссимиляцией. Об успешности данного метода заговорили, когда были получены положительные результаты на животных моделях болезни Тея–Сакса и Сандхоффа. Использование данной методики приводило к снижению концентрации субстрата в центральной нервной системе и, как следствие, к уменьшению степени выраженности симптомов заболевания. В последующем подобные эксперименты проводили на животных моделях болезни Гоше типа I, где также был достигнут положительный эффект [1, 5].

## 2. Коррекция функций измененного фермента

Большинство терапевтических подходов при лечении LSDs направлено на восстановление потерь измененного фермента путем увеличения его содержания в клетках и тканях.

К данным методикам относится **фермент-заместительная терапия (ФЗТ)**, которая в прошлом являлась огромным рывком в лечении LSDs, а на данный момент является стандартом коррекции многих заболеваний (болезнь Гоше, Фабри, Помпе и мукополисахаридозы). Обоснования эффективности ФЗТ развивались с момента обнаружения молекулярных механизмов, которые участвуют в сортировке и распределении синтезируемых ферментов. ФЗТ основывается на концепции, согласно которой лизосомные гидролазы могут усваиваться клетками и тканями через маннозный или манноза-6-фосфатный транспортер, затем проникают в лизосомы, где восполняют функцию дефектного фермента [8]. Еще одним толчком для эволюции заместительной терапии стало развитие технологий, позволяющих производить очистку и разнообразные манипуляции с ферментами для их нацеленной доставки в клетки и ткани.

Несмотря на успехи применения, ФЗТ имеет определенные ограничения. Основные трудности заключаются в распределении ферментов, так как белковые молекулы имеют большие размеры и не могут свободно проходить через биологическую мембрану. В большинстве случаев рекомбинантные ферменты не могут проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В связи с этим терапия не оказывает влияние на неврологические проявления заболевания. Здесь как альтернативный способ доставки препаратов в центральную нервную систему может быть применен интратектальный путь введения. В качестве другого метода преодоления ГЭБ были предприняты попытки химической модификации  $\beta$ -глюкуронидазы (при дефекте этого фермента развивается МПС VII типа). Измененные молекулы отменяли маннозный и маннозо-6 фосфатный путь поглощения фермента, в результате происходило накопление фермента в плазме крови и увеличение его доставки к клеткам головного мозга через неизвестный путь [11].

Также существует проблема целенаправленной доставки фермента. Так при болезни Помпе наблюдается метаболическая миопатия в результате дефицита кислой  $\alpha$ -1,4-глюкозидазы. Действие лечебного фермента направлено на коррекцию деятельности основных пунктов потребления – сердце и мышцы, но это представляет определенную сложность, так как большая часть энзима будет захвачена печенью и только незначительная часть препарата доставляется в мышцы. На эффективность ФЗТ также могут влиять аспекты патофизиологии и вторичные клеточные нарушения, вызванные накоплением субстрата. К тому же побочным эффектом введения рекомбинантных ферментов ослабленным пациентам может служить иммунный ответ. Следует отметить и то, что для поддержания устойчивого уровня корректирующих ферментов необходимо постоянное проведение инъекции или установка имплантируемой венозной порт-системы. Не стоит игнорировать и экономический аспект вопроса. Лечение одного больного может обойтись в несколько сотен тысяч долларов [7].

Применение ФЗТ основано на экзогенном введении препаратов, но применяются и методы, направленные на эндогенное замещение энзимов путем пересадки стволовых клеток – **трансплантация костного мозга**. Практически для всех LSDs был опробован данный терапевтический метод, но большинство экспериментов касаются лишь единичных случаев и, в большинстве случаев, это не приводило к коррекции всех осложнений заболевания. Первое заболевание, для которого была проведена ТКМ, и достигнуты наилучшие результаты – МПС I типа [5, 14]. Эффективность лечения зависит от сроков начала процедуры и является продуктивной до 2 лет, когда поражение центральной нервной системы не столь существенно. После пересадки гемопоэтических клеток у пациентов наблюдается восстановление собственной активности ферментов до нормальных значений и снижение уровня экскреции глюкозаминогликанов, до уровня верхней границы нормы для данного возраста [1]. Существуют и проблемы в применении данного метода. Они заключаются в высоком риске данной манипуляции, в сложности подбора донора и в посттрансплантационных осложнениях, однако ТКМ остается на сегодняшний день стандартным методом лечения МПС I типа.

Для лечения других LSDs роль трансплантации гемопоэтических клеток менее доказана или противопоказана пациентам с тяжелыми нейродегенеративными формами. В перспективе рассматривается применение мезенхимальных и других стволовых клеток костного мозга, а также сочетание ТКМ с другими методами лечения [5, 14].

В последние годы изучается новый подход к лечению LSDs, основанный на использовании низкомолекулярных соединений - **фармакологических шаперонов**. Точечные мутации часто приводят к нарушению фолдинга белков, в результате чего ферменты не способны сохранять свою нативную структуру и это приводит к угнетению их функций. В клетке суще-

ствуется система, отвечающая за контроль качества вновь синтезируемых белков. Она сосредоточена в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и состоит из молекул-шаперонов, которые способствуют правильной конформации протеинов и «датчиков» молекул, распознающих белок с нарушенной нативной структурой. Таким образом, правильно сложенные белки отправляются в цитоплазму, а мутантные запускают серию реакций, направленных на их утилизацию в ЭР-связанных комплексах дегенерации [13,14].

При генетических патологиях нонсенс мутации или мутации со сдвигом рамки считывания приводят к синтезу укороченной молекулы белка, которая не обладает каталитической активностью. Однако некоторые мисенс-мутации и небольшие делеции без сдвига рамки считывания не затрагивают активный центр ферментов или участок связывания и приводят к нарушениям пространственной конформации [5, 13, 14]. Ряд веществ могут служить стабилизаторами белков, помогая образовать устойчивую структуру и пройти «пункт контроля». Эти соединения получили название «фармакологических шаперонов» по аналогии с белками «шаперонами», участвующими в фолдинге протеинов. Идея терапии фармакологическими шаперонами базируется на концепции, что лиганды, такие как субстраты, кофакторы, неконкурентные ингибиторы, могут помочь в построении дефектного фермента и сохранить его каталитическую активность [10]. Результатом подобного механизма является увеличение внутриклеточного пула активных ферментов и частичное восстановление метаболизма.

В качестве фармакологических шаперонов было предложено использование низкомолекулярных, чаще гидрофобных, молекул, стабилизирующих нативную конформацию специфических для них белков. В экспериментах *in vitro* было обнаружено, что некоторые соединения способны связываться с каталитическим центром энзима и поддерживать его структуру. Работа над культурами клеток с мутациями в гене  $\alpha$ -галактозидазы (болезнь Фабри) показала, что при введении в культурную среду 1-deoxygalactonojirimycin в концентрациях близких к ингибиторным происходит стабилизация измененного фермента. Введение вещества трансгенным мышам с патологией гена  $\alpha$ -галактозидазы приводит к повышению активности энзима в сердце, почках, селезенке и других тканях [5, 10]. Данные результаты говорят нам о том, что конкурентные ингибиторы восстанавливают конформацию белка и обеспечивают его доставку в другие структуры клетки. Подобные наблюдения позволяют применять методику фармакологических шаперонов для многих заболеваний, связанных с мисенс-мутациями.

### **3. Генотерапия**

Целью генотерапии является доставка нормальной ДНК в клетки пациента и синтез утерянного фермента. В этих целях в лабораториях применяют различные вирусные векторы (ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы) и другие методики.

В основном исследование по применению вирусных векторов проводится на животных моделях и дают положительные результаты. Так огромный потенциал показывает система переноса генов с применением аденоассоциированных вирусов (AAV). Впервые разработан и применен пожизненно был AAV 2 типа. Внутримышечные инъекции данного вектора проводились трансгенным мышам с моделью болезни Помпе, Фабри и МПС VII типа. В результате наблюдался высокий уровень активности дефектного фермента в инъекционной мышце, но относительно низкий или неопределяемый уровень в системе крови. Инъекции AAV-2 в паренхиму печени и мышцы взрослым мышам с МПС VII типа приводят к относительно высокому уровню экспрессии в тканях и снижению количества накопившегося субстрата. Однако такой подход обеспечивает лишь незначительные клинические улучшения [9, 15].

О значительных улучшениях при внутривенном введении вектора свидетельствуют биохимические, гистологические и клинические улучшения в нескольких мышечных моделях LSDs. Положительные изменения и сокращение накопившегося метаболита наблюдаются во многих тканях после внутривенного введения вектора AAV-2 у взрослых животных с МПС VII, болезнью Помпе и болезнью Фабри. Еще более впечатляющие результаты, такие как улучшение роста костей и развития скелета, нормальное функционирование органов зрения и слуха, наблюдаются у мышей с МПС VII после внутривенного введения вектора в неонатальный период. Исследования новорожденных доказали полезность раннего вмешательства для профилактики прогрессирующего заболевания [9, 15]. Генотерапия является перспективным направлением в лечении LSDs, но существуют проблемы, которые еще предстоит решить в будущем.

### **Выводы:**

Лизосомные болезни накопления – это обширная группа заболеваний, причинами которых являются мельчайшие сбои в молекулярной физиологии клеток. Существуют различные способы борьбы с данными дефектами, однако каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Современные технологии позволяют ученым все глубже познавать механизмы развития заболеваний и помогают им приблизиться к способам устранения дефектов. Различные методики (генотерапия, использование фармакологических шаперонов) являются

будущим медицины и вскоре могут стать основными способами лечения лизосомных болезней накопления.

### Литература

1. Бучинская, Н. В. Современные подходы к терапии мукополисахаридозов у детей, / Н.В. Бучинская и др. // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – №3. – Том 13. – С. 35-43.
2. Бушуева Т.В. Современный взгляд на проблему фенилкетонурии у детей: диагностика, клиника, лечение. / Т.В. Бушуева // Вопросы современной педиатрии. – 2010. - №1. – Том 9. – С. 157-159.
3. Гасина, А.А., Гусина, Н.Б. Современные подходы к лечению лизосомных болезней накопления, /А.А. Гасина, Н.Б. Гусина// Медицина. –2009.– № 3. – С. 27-32.
4. Захарова Е. Современные подходы к лечению болезни Гоше и других лизосомных болезней накопления. / Е. Захарова и др. // RASUS. Редкие болезни в России. – 2014. - №2. – С. 16-18.
5. Захарова, Е. Ю. Лизосомные болезни накопления, / Е.Ю. Захарова // Педиатрия и детская хирургия. – 2010. - №4. – С. 49-53.
6. Цыгин, А.Н. Нефропатический цистиноз, / А.Н. Цыган и др. // Клиническая нефрология. – 2011. – №4. – С. 20-23.
7. Beutler E. Lysosomal storage diseases: natural history and ethical and economic aspects // Mol Genet Metab. – 2006. №88. – P.208-215.
8. Brady RO. Enzyme replacement for lysosomal diseases // Annu Rev Med. – 2006. №57. — P. 283-296.
9. Cheng SH, Smith AE. Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders // Gene Therapy. – 2003. - №10. – P.1275-1281.
10. Fan JQ, Ishii S. Active site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors // FEBS J. – 2007, 274: 4962-4971.
11. Grubb JH, Vogler C, Levy B, Galvin N, Tan Y, Sly WS. Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII // Proc Natl Acad Sci USA. – 2008. №105. – P. 2616-2621
12. Marca G. Lysosomals. Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases // Springer Berlin Heidelberg. - 2014. — P. 785-793.
13. Parenti G, Andria G, Valenzano KJ. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders // Molecular Medicin. – 2015. №23. – P. 113-1148.



14. Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics // EMBO Molecular Medicin. – 2009. №1. – P. 268-279.
15. Sands M.S., Davidson B.L. Gene Therapy for Lysosomal Storage Diseases // Molecular Therapy. – 2006. №13. – P.839-849.
16. Scriver, Charles R.: The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease // Scriver, R. Charles. - 8th ed. New York: McGraw-Hill., 2001. – P. 6338.