

# Редактирование генома в терапевтических целях

VI Всероссийская конференция

«Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств,  
биомедицинских клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий»

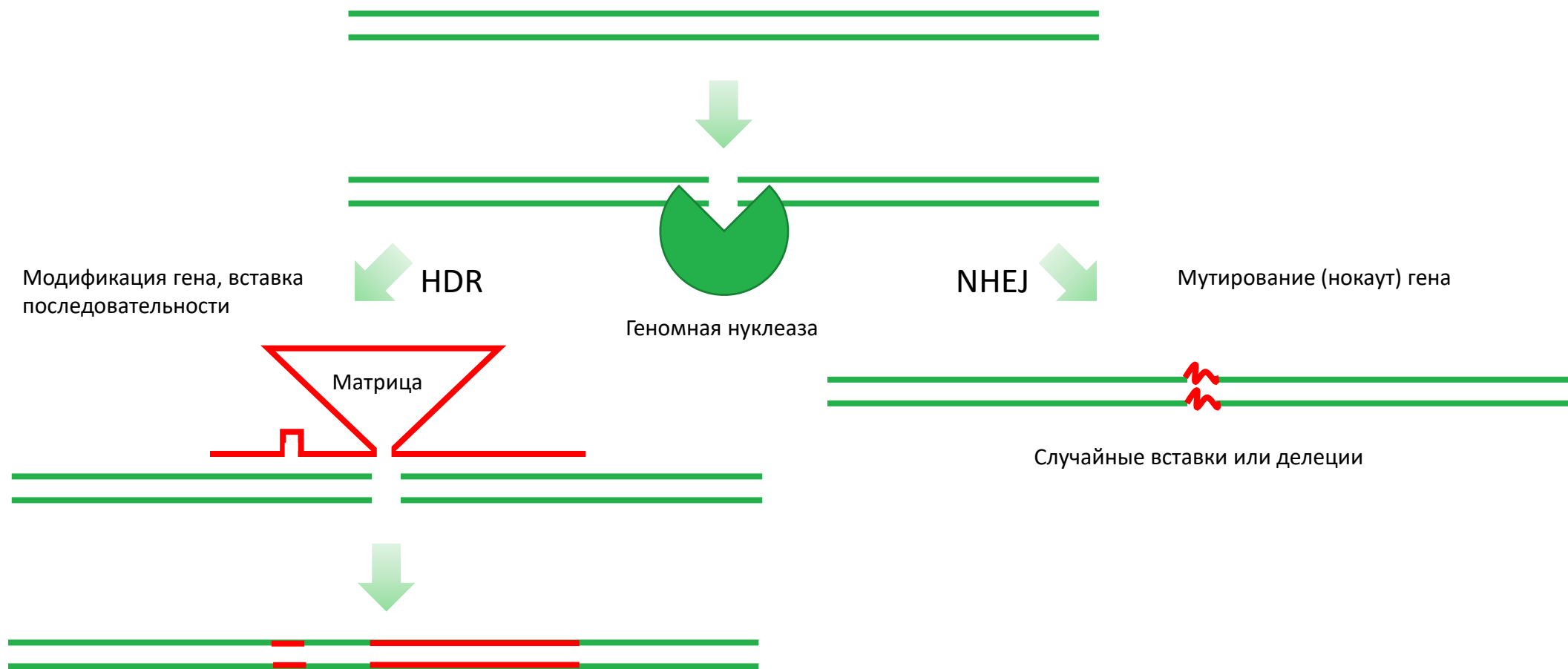
Дмитрий Мадера, Ph.D.

20 апреля 2018 года

# Необходимость редактирования генома

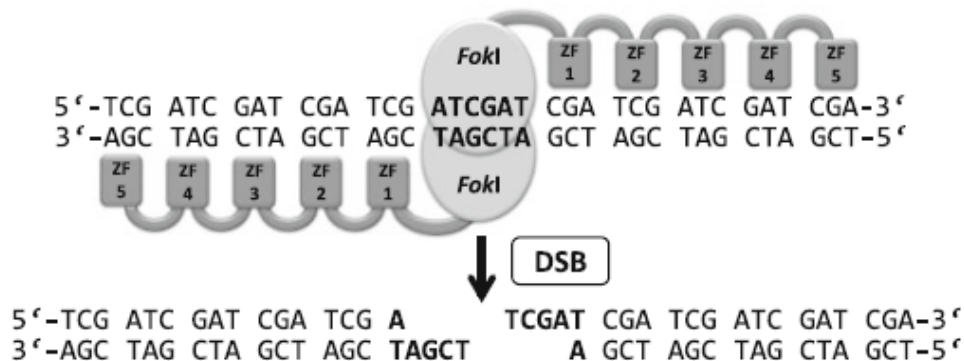
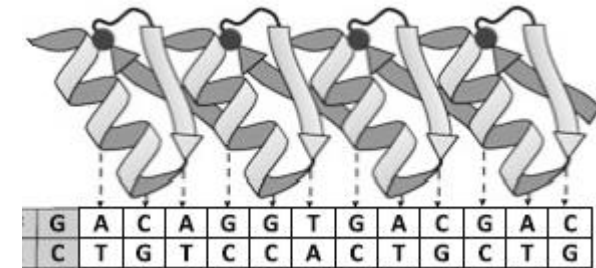
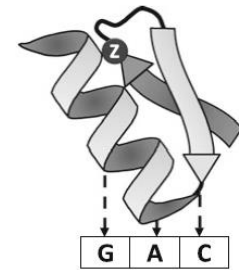


# Принцип геномного редактирования



# Zinc-finger nucleases

- «Цинковый палец» (zinc finger, ZF) – белковый домен, способный специфически связываться с триплетом ДНК.
- С помощью методик *in vitro* эволюции были разработаны 64 подобных домена, способных связываться с любым возможным триплетом.
- Важная особенность ZF – их модульность. Идя друг за другом, они вместе связываются с более длинными сайтами.
- Нуклеаза FokI распознаёт последовательность ATCGAT и, как большинство эндонуклеаз рестрикции, должна димеризоваться на ДНК, чтобы осуществить DSB.



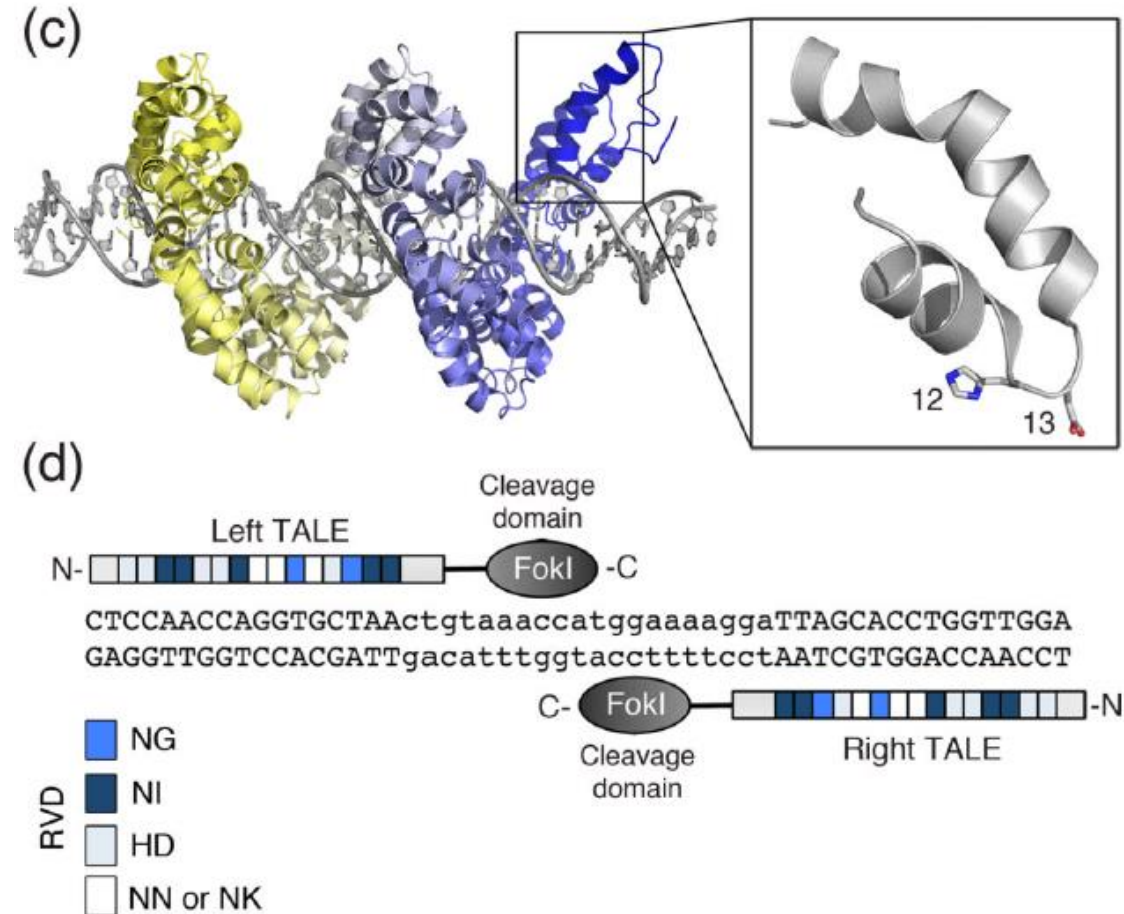
Zinc-finger nuclease (ZFN)



Hauschild-Quintern J et al. Cell. Mol. Life Sci. 70: 2969-2983 (2013)

# Transcription activator-like effector nucleases

- В бактерии *Xanthomonas* sp. были обнаружены белки с повторяющимися repeat variable diresidues (RVD) доменами. Каждый из этих доменов распознаёт один нуклеотид.
- В результате возможно создание на основе полидоменных RVD белков, распознающих очень длинные сайты ДНК.
- Белки, аналогичные ZFN, но построенные с использованием RVD, были названы transcription activator-like effector nucleases (TALEN).

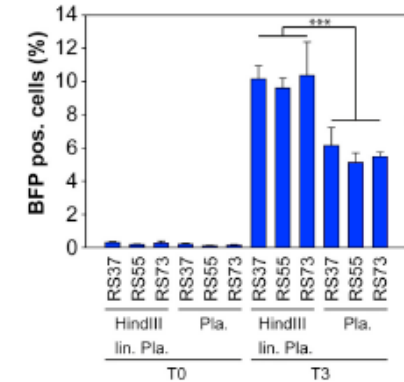
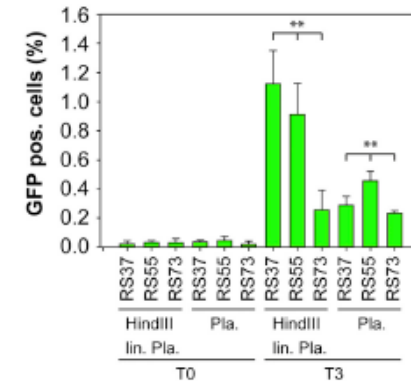
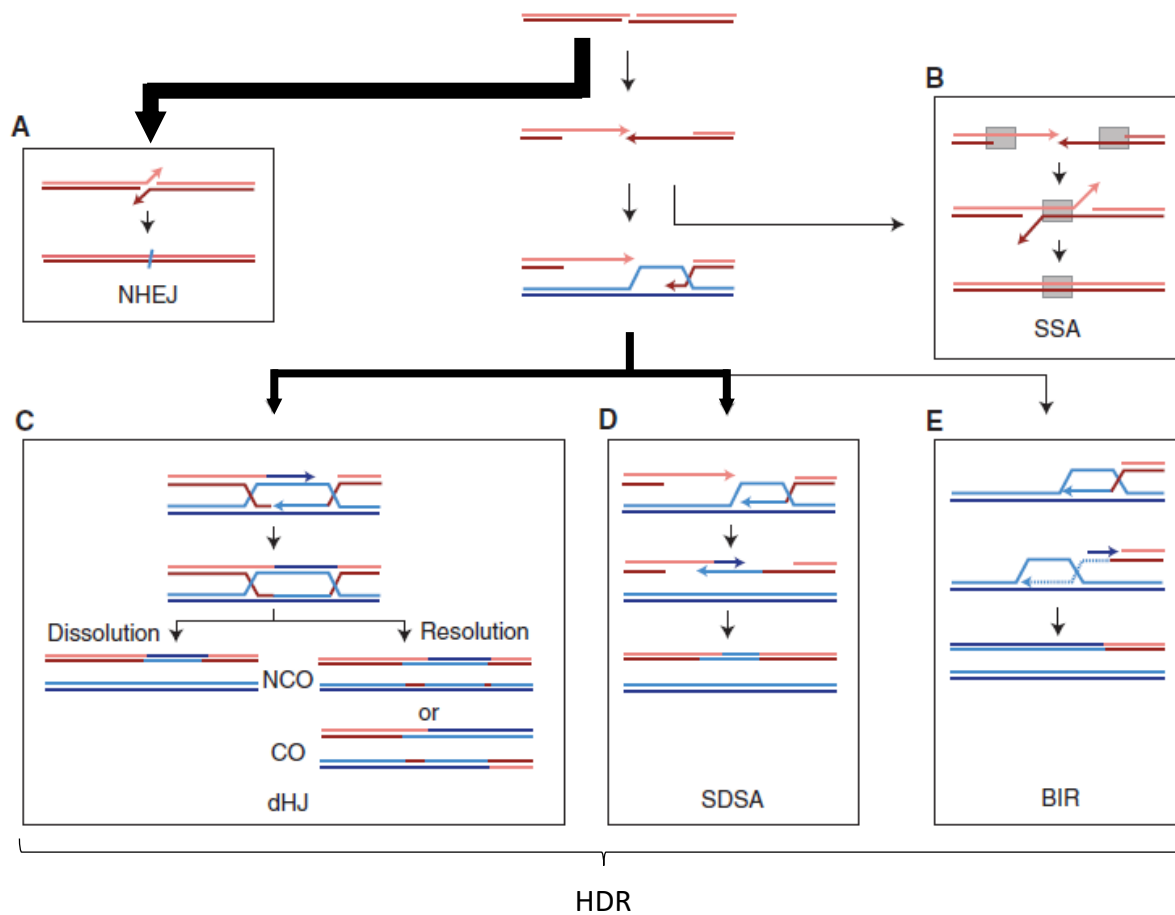


# CRISPR/Cas9 – лидер и будущее модификации генома

- CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/CRISPR-associated (Cas) – семейство бактериальных белков, способных таргетировать и разрушать вирусную ДНК (или РНК, в зависимости от белка).
- Отличительная особенность CRISPR/Cas белков: белок осуществляет эндонуклеазную активность и таргетинг, но специфичность таргетинга определяется взаимодействующей с ним РНК.
- Природный Cas9 взаимодействует с двумя связанными молекулами: tracrRNA (скаффолд для белок-РНК интерфейса) и crRNA (определяет сайт для таргетирования).
- В адаптированных версиях Cas9 обе РНК связаны в одну РНК-молекулу small guiding RNA (sgRNA).
- Хотя сайт узнавания Cas9 определяется sgRNA, для связывания с сайтом Cas9 требует наличия непосредственно рядом с сайтом небольшого константного сайта Protospacer adjacent motif (PAM).

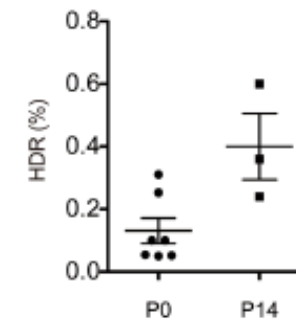
# Проблемы геномного редактирования

Процент HDR всегда ниже, чем NHEJ, но сильно зависит от условий эксперимента.



HDR

NHEJ



Song F & Stieger K. Molecular Therapy-Nucleic Acids 7: e53 (2017)

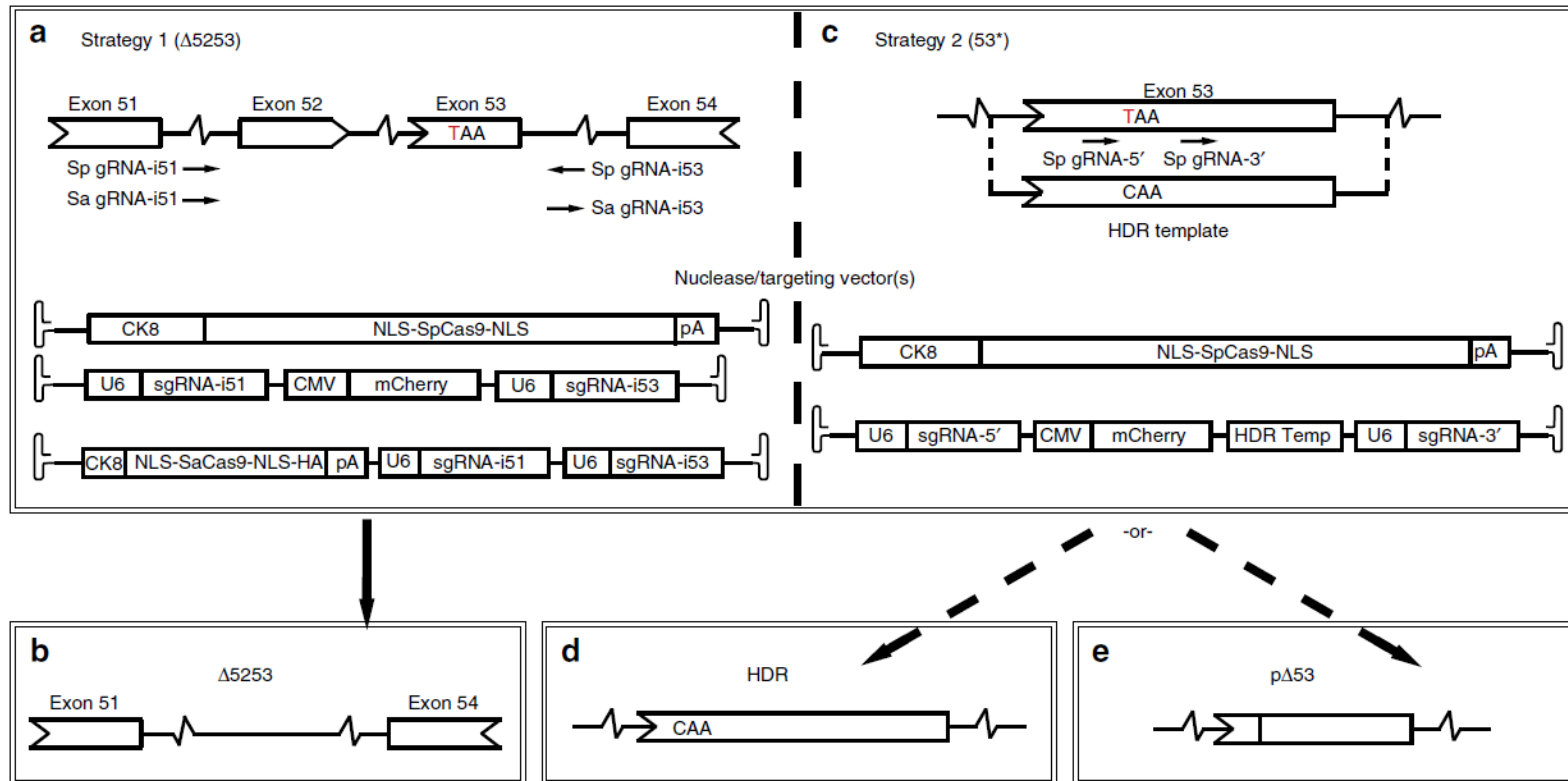




# Проблемы геномного редактирования

Низкая эффективность доставки нуклеаз в целевые ткани и/или модификации генома.

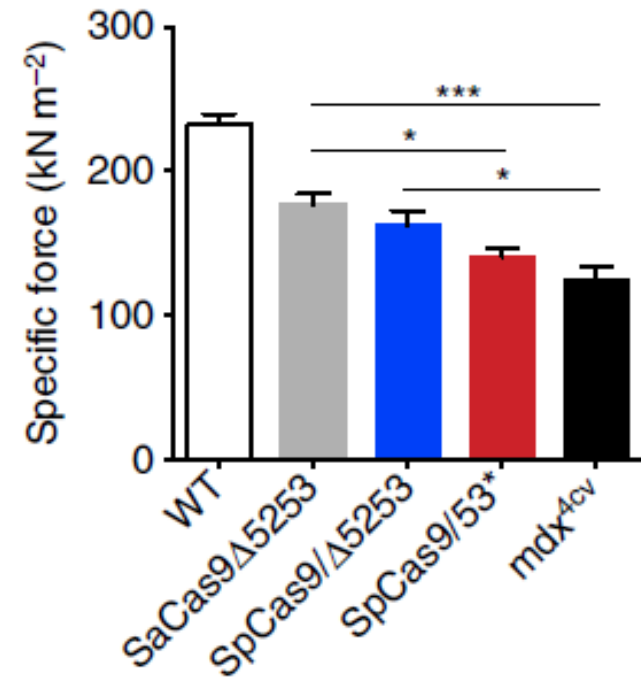
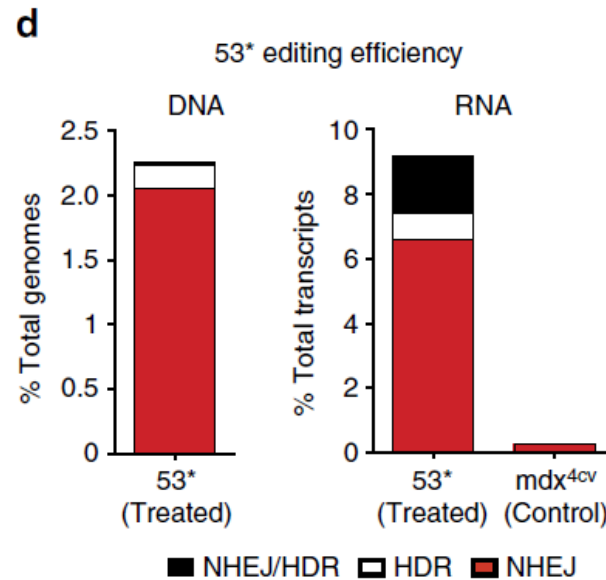
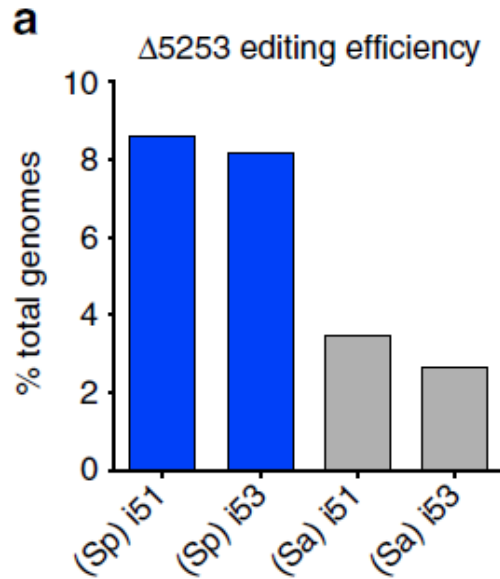
Снижение эффективности редактирования в силу иммунного ответа на работающий ген.



# Проблемы геномного редактирования

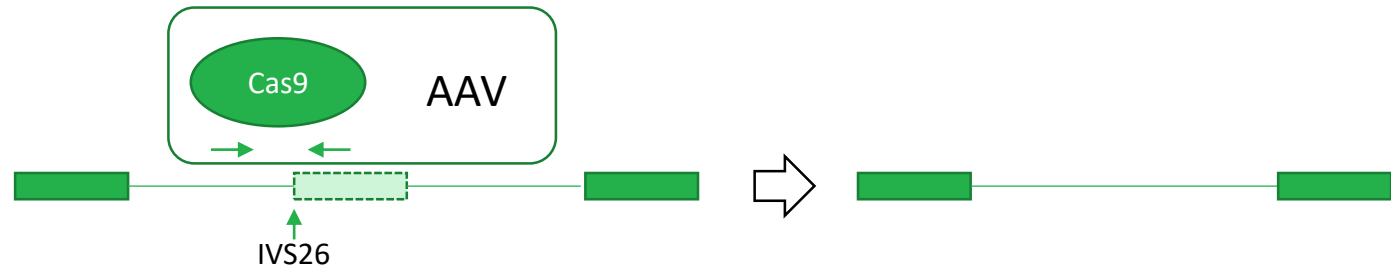
Низкая эффективность доставки нуклеаз в целевые ткани и/или модификации генома.

Снижение эффективности редактирования в силу иммунного ответа на работающий ген.



# Терапия пигментного ретинита (EDITAS)

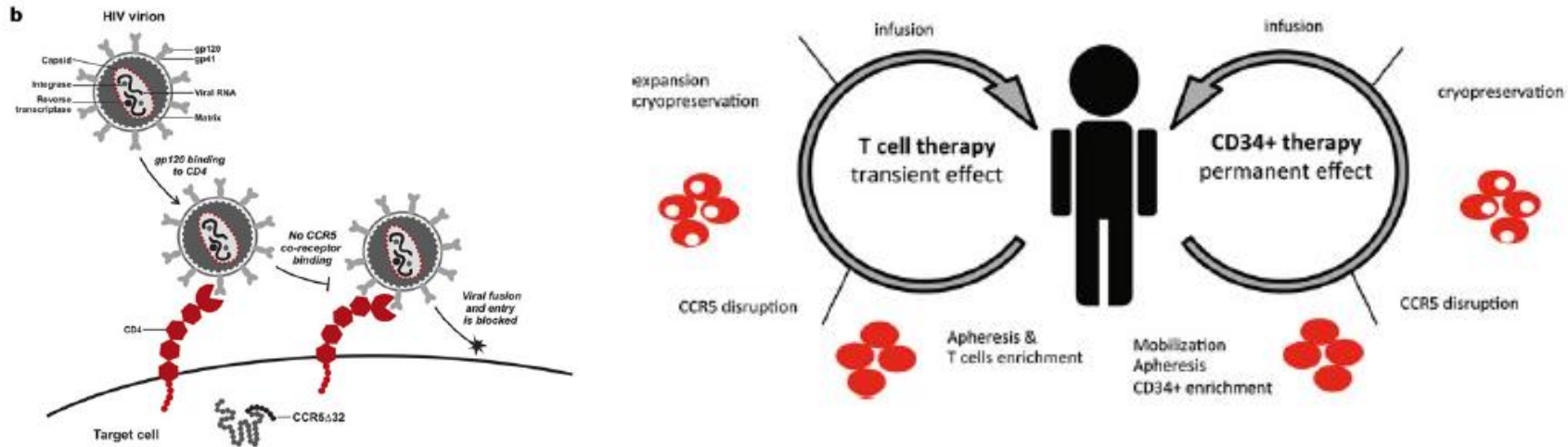
- Ген CEP290 необходим для корректной работы фоторецепторов глаза, но не их выживания.
- Одна из мутаций в CEP290 (IVS26) вызывает образование криптоэкзона со сдвигом рамки считывания.



- Все 3 компонента с одного AAV (CMV-SaCas9 + U6-sgRNA1 + U6-sgRNA2) субретинально, оптимальные sgRNA нашли с помощью селекции *in vitro*.
- Получили схожие данные на мышах и NHP (10% корректно модифицированных фоторецепторов, что достаточно для восстановления зрения) с оптимальной дозой  $10^{13}$  vg/ml.
- 19% пациентов с антителами к SaCas9, 4,5% - к SpCas9.

# Редактирование генома *ex vivo*

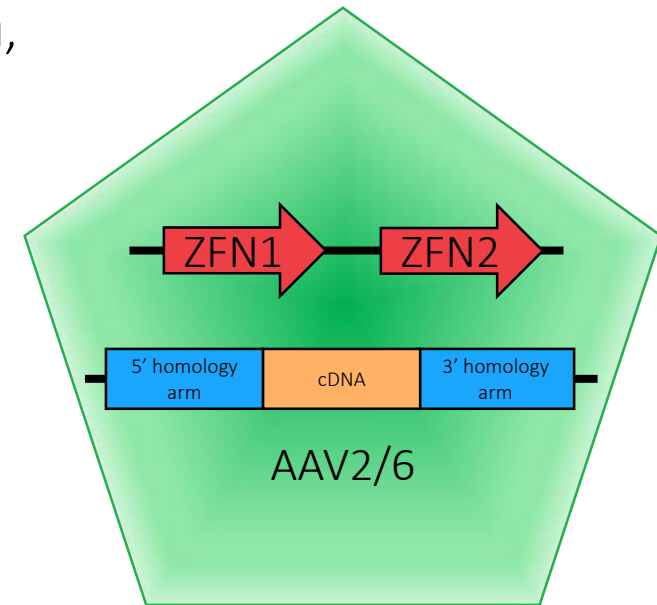
- Cathomen T. Gene editing in hematopoietic stem cells to treat chronic immunodeficiencies.



- Instead of silencing of CCR5, HSPC or T cells are isolated, and CCR5 is knocked-out with designer nucleases (TALEN or CRISPR/Cas). The cells are then transplanted autologously.
- Some patients showed a sustained decrease in HIV load.
- Naldini L. Advanced genetic engineering of hematopoiesis to treat human diseases.
  - Compared LV-based gene delivery with AAV6 or IDLV gene editing (potential targets: *IL2RG*, *RAG1/2*, *CD40L*).
  - The gene editing strategy is feasible, may provide better gene regulation and absence of insertional mutagenesis.
  - However, in HSC it is still limited because the cells are mostly in G0, and DNA repair mechanisms are not very active.
- Fanconi anemia (FANCI) gene was repaired in iPSC, differentiated into iHSC and transplanted in a pre-clinical model.

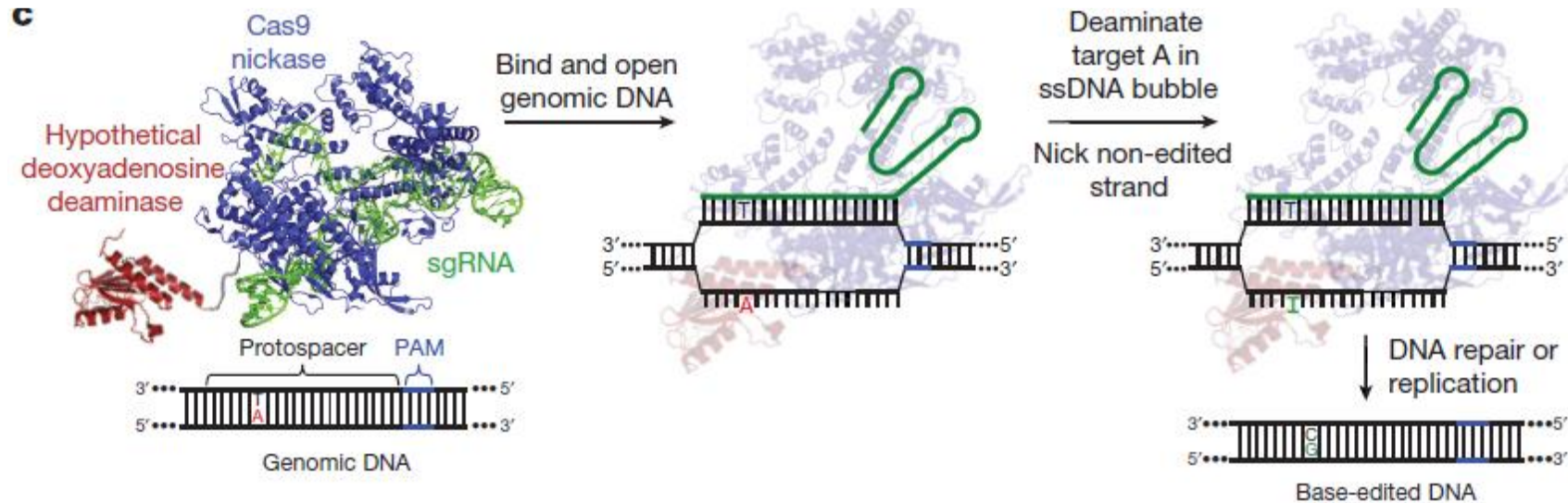
# Клинические испытания для терапии

- Мукополисахаридоз I (SB-318, NCT02702115) и II (SB-913, NCT03041324), гемофилия Б (SB-FIX, NCT02695160).
- Все исследования ведутся по одной схеме: доставка rAAV2/6 двух ZFN + матрица (кДНК), одна инъекция, 3 дозы (низкая, средняя, высокая).
- Устойчивость к ВИЧ при модификации с помощью SpCas9 CCR5 *ex vivo* в CD34<sup>+</sup> гематopoэтических клетках (Affiliated Hospital to Academy of Military Medical Sciences, Китай, NCT03164135).
- aCD19 CAR-T с нокаутом TCR и b2M с помощью SpCas9 для лечения CD19<sup>+</sup> лейкоemий и лимфом (Chinese PLA General Hospital, NCT03166878).



# Перспективные технологии геномного редактирования

- Нуклеотидные редакторы.



- Новые нуклеазы, никирующие нуклеазы.
- Способы повышения эффективности HDR: использование одноцепочечной ДНК, привязка к клеточному циклу и т. д.

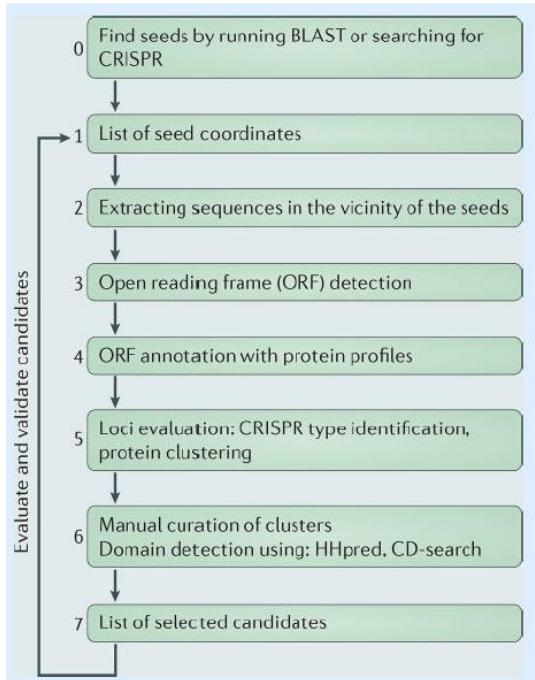
# Расширение набора инструментов CRISPR/Cas

- Ранее описаны Cpf1, Cas13, SaCas9, St1Cas9 и другие.
- ScCas9: очень похожа на SpCas9, но отличается последовательностью PAM (NNGT). (Jacobson J, MIT)
- Компания LifeEdit разработала pipeline по поиску новых нуклеаз, найдены тысячи возможных кандидатов.
- AsCpf1 и LbCpf1: библиотека точечных мутаций (рациональный дизайн) повысила эффективность нуклеаз в 3 раза. (Dong Y, Ohio State University)
- NmeCas9: повысили специфичность, добавив дополнительный DNA binding domain и используя fusion NmeCas9-pDBD (Wolfe S, UMassMed).
- CRISPRicity: новый pipeline для идентификации генов системы CRISPR (I, II, III типов) – предсказаны десятки тысяч генов (Severinov, Koonin, NIH, MIT & Skoltech).
- SpyCas9-NmeCas9 слияние позволяют осуществлять точные вырезания фрагментов без indels. (Wolfe S, UMassMed)



# Новые нуклеазы для геномного редактирования

- Меньший размер гена.
- Высокая точность и эффективность.
- Новизна.



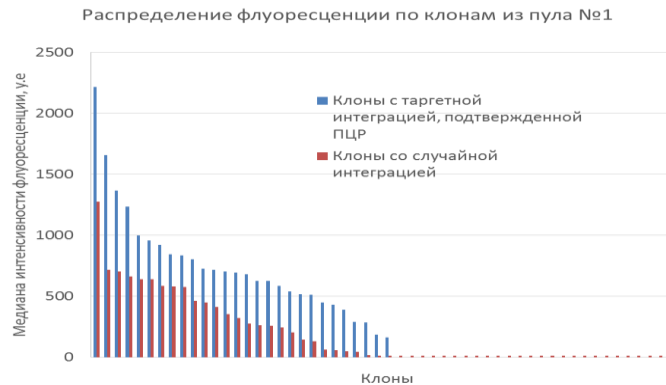
		Nuclease domains	tracrRNA	PAM	Substrate	Cleavage pattern
Type II Cas9		RuvC and HNH	Yes	3', GC-rich	dsDNA	Blunt ends
Type V-A Cas12a (Cpf1)		RuvC and Nuc	No	5', AT-rich	dsDNA	Staggered ends, 5' overhangs
Type V-B Cas12b (C2c1)		RuvC	Yes	5', AT-rich	dsDNA	Staggered seven-nucleotide cut of target DNA
Type VI-A Cas13a (C2c2)		2 HEPN domains	No	5', non-G PFS	ssRNA	Cleaves ssRNA near uracil and collateral activity



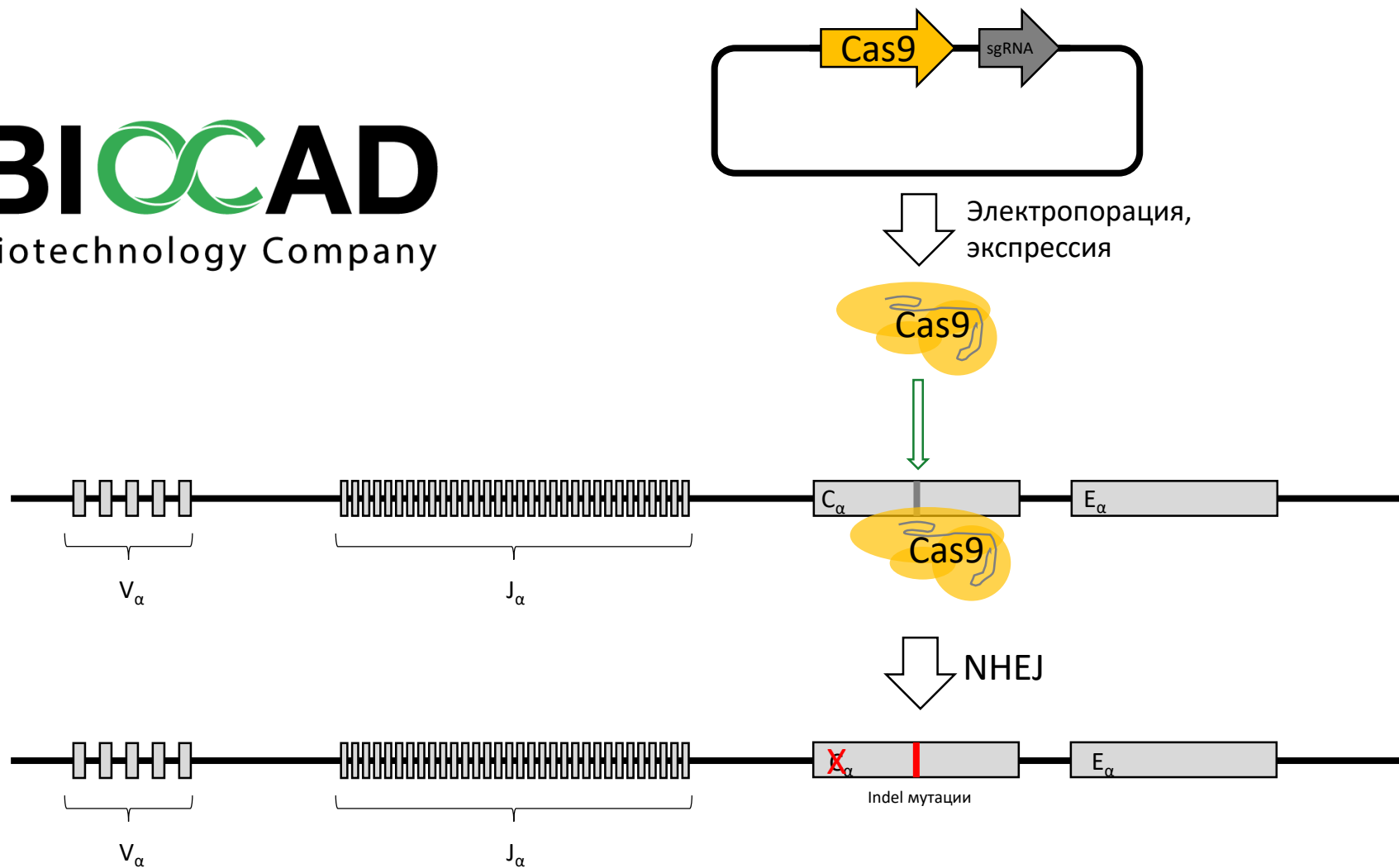
# Редактирование генома *ex vivo*: линии-продуценты



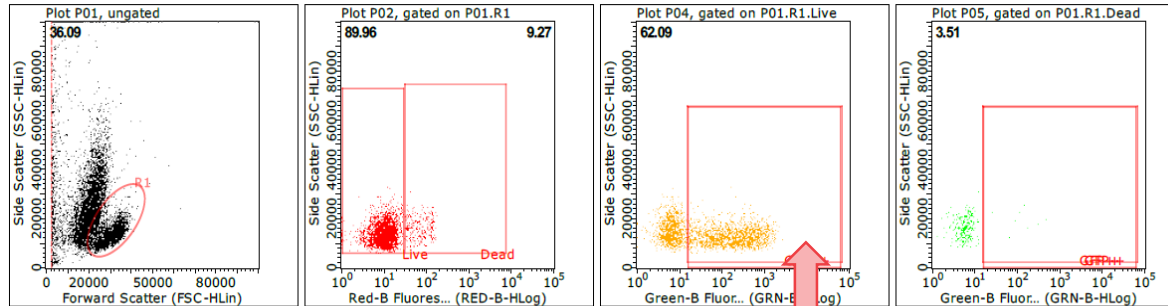
- Получение линии продуцента биоаналога трастузумаба с использованием TALEN-нуклеаз.
- Проверка перспективного сайта интеграции в геном для инженерии клеток и создания линий-продуцентов (CRISPR-интеграция).
- CRISPR-базирующаяся модификация клеток-продуцентов: инактивация проапоптотических генов, интеграция антиапоптотических генов и т. п.



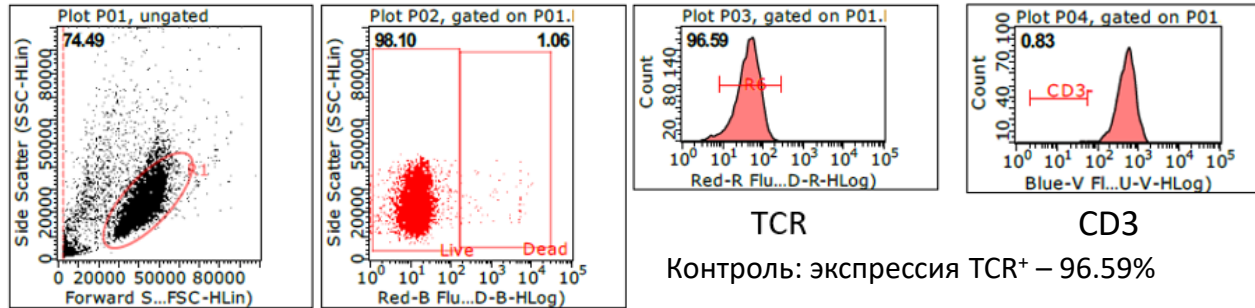
# Редактирование генома *ex vivo*: CAR-T



# Редактирование генома *ex vivo*: CAR-T



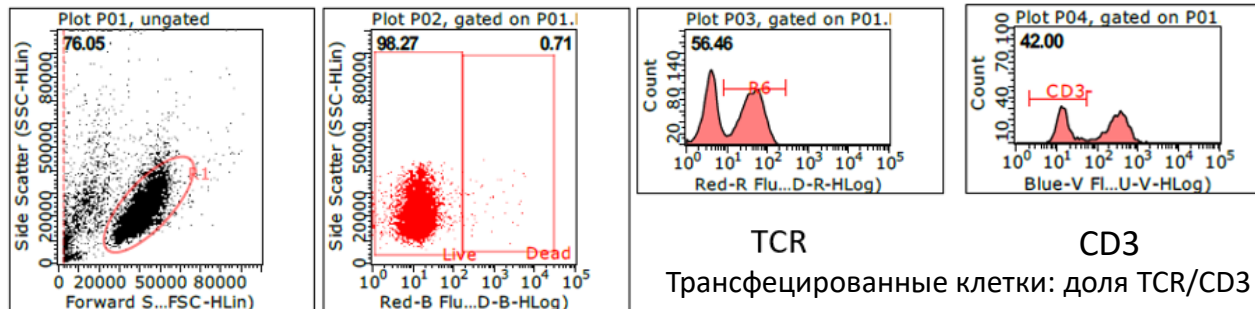
62% - живых GFP+ клеток



TCR

CD3

Контроль: экспрессия TCR+ – 96.59%



TCR

CD3

Трансфицированные клетки: доля TCR/CD3  
негативных клеток - 42-44%

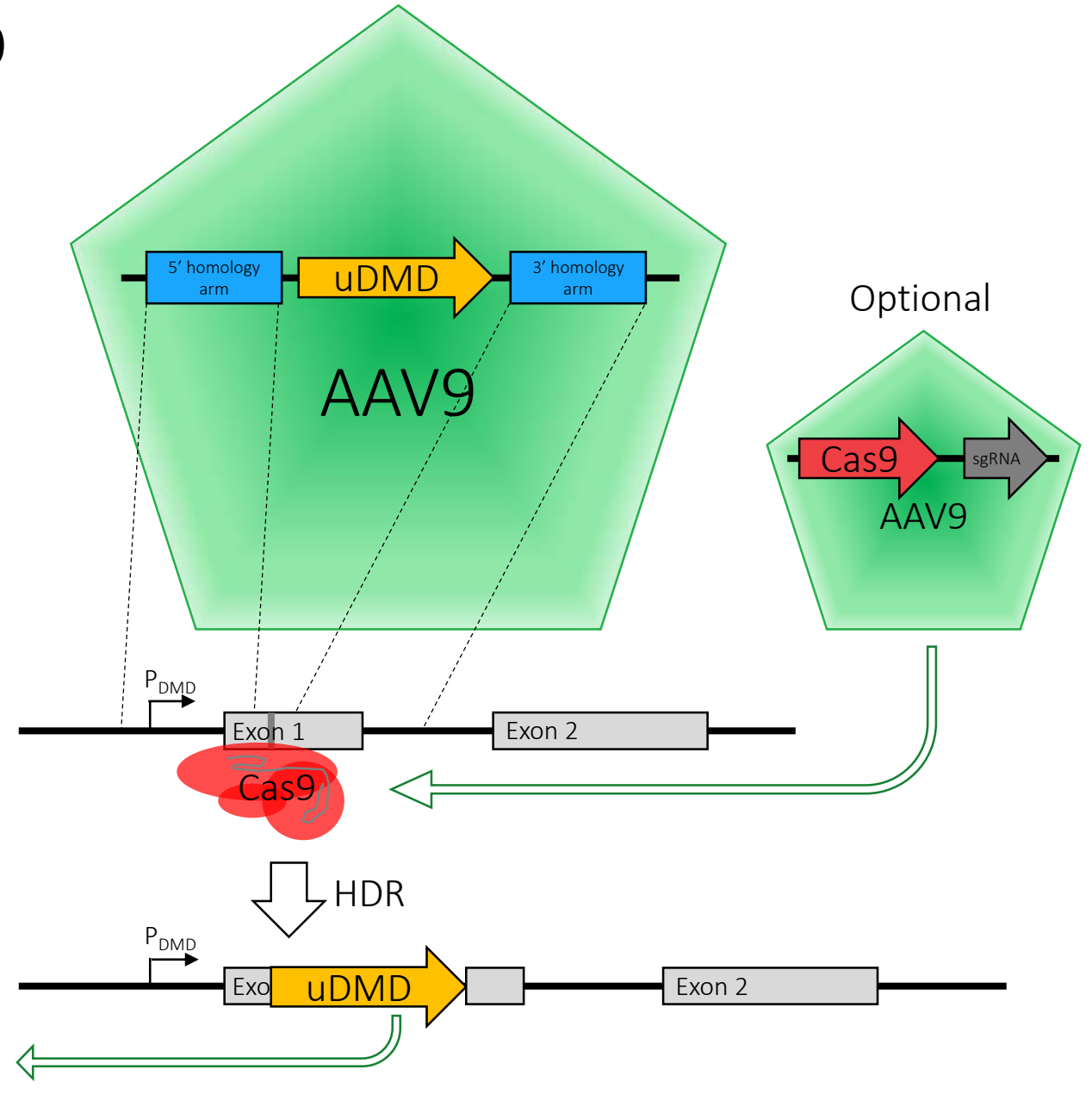
# Редактирование генома *ex vivo*: CAR-T

Анализ геномных модификаций.

ID клона	Тип мутации	Локализация мутации в экзоне 2
Trac_2d_1	делеция 3 нуклеотидов	26..28
Trac_2d_2	делеция 11 нуклеотидов	18..28
Trac_2d_3	делеция 2 нуклеотидов	28..29
Trac_2d_7	делеция 2 нуклеотидов	28..29
Trac_2d_9	делеция 5 нуклеотидов	24..28
Trac_2d_11	инсерция	25..26
Trac_2d_13	делеция 12 нуклеотидов	22..33
Trac_2d_14	дикий тип	
Trac_2d_15	инсерция	25..26
Trac_2d_16	делеция 5 нуклеотидов	24..28
Trac_2d_17	инсерция	24..25
Trac_2d_18	инсерция	25..26
Trac_2d_19	инсерция	25..26
Trac_2d_20	инсерция	25..26
Trac_2d_21	инсерция	25..26
Trac_2d_22	инсерция	26..27
Trac_2d_23	инсерция	25..26
Trac_2d_24	инсерция	25..26
Trac_3d_2	делеция 2 нуклеотидов	28..29
Trac_3d_7	дикий тип	
Trac_3d_9	инсерция	25..26
Trac_3d_20	дикий тип	
Trac_3d_24	дикий тип	

День	Ожидаемый % нокаутов	Наблюдаемый % нокаутов
2	$0,77^2 \times 100 = 59$	44
3	$0,40^2 \times 100 = 16$	18

# Стратегия лечения DMD



# Выводы

- Геномное редактирование – чрезвычайно перспективный подход для лечения наследственных заболеваний.
- Использование геномного редактирования в терапевтических целях затруднено в связи с технологическими трудностями:
  - Недостаточная точность имеющихся нуклеаз;
  - Сложность эффективной таргетной доставки нуклеаз и матриц;
  - Преобладание NHEJ над HDR.
- Компания BIOCAD, совместно с партнёрами, ведёт активные работы, направленные на внедрение геномного редактирования в терапию наследственных заболеваний:
  - Использование CRISPR/Cas9 для редактирования генома клеток *ex vivo*;
  - Дизайн и разработка схем терапии наследственных заболеваний с геномным редактированием;
  - Поиск и характеристика новых нуклеаз с улучшенными свойствами.

# Спасибо за внимание!

Дмитрий Мадера, Ph.D.  
Руководитель ЛМГ  
BIOCAD  
Тел.: +7 (812) 380 49 33, ext. 568  
Моб.: +7 (981) 175 71 87  
[biocad.ru](http://biocad.ru)

**BIOCAD**  
Biotechnology Company