

## Лаборатория моделирования и генной терапии заболеваний человека

### Результаты работ

При выполнении работ по 1 этапу реализации Исследовательской программы и Плана-графика получены следующие основные результаты:

1. В результате проведенного исследования разработана стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Snca*, кодирующего альфа-синуклеин. Синтезированы РНК и ДНК олигонуклеотиды, необходимые для создания РНП комплексов, осуществляющих направленную гомологическую рекомбинацию в *Snca* локусе генома мыши. Скрининг клонов, полученных в результате нуклеофекции клеток материнского клона 126 эмбриональных стволовых клеток мыши созданными РНП комплексами, позволил идентифицировать клон 126-2-F4, отвечающий первичным критериям успешной гуманизации обеих аллелей эндогенного *Snca* гена в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши.

2. В результате проведенного исследования определена полная нуклеотидной последовательности отредактированного локуса в геноме полученных клонов. Подтверждена корректность редактирования путем определения полной нуклеотидной последовательности отредактированного локуса в геноме полученных клонов. Установлено, что в полученном клоне 126-2-F4 эмбриональных стволовых клеток мыши произошла гуманизация обеих аллельных копий *Snca* гена. Клетки клон 126-2-F4 могут быть использованы для микроинъекций в бла-стоцисты мышей с целью получения химерных животных, а затем и линии мышей с гуманизированным *Snca* геном.

3. В результате проведенного исследования подтверждена возможность успешной делеции экзона II в клетках клона 126-2-F4 с помощью loxP/Cre рекомбинации, что приводит к инактивации *Snca* гена и прекращению продукции альфа-синуклеина. Таким образом, проведенные контрольные эксперименты на клеточных культурах подтвердили генетическую делецию

в локусе гуманизированного альфа-синуклеина в результате его Cre-рекомбинации.

4. Выполнено секвенирование нового поколения для выявления таргетных генов у пациентов с диагнозом «дисферлинопатия». Осуществлена биоинформатическая обработка полученных данных, определены мажорные мутации, осуществлена характеристика мутаций. В частности, в ходе исследования выполнено выделение ДНК представленных образцов крови 43 человек. Для проведения пробоподготовки использована методика селективного захвата участков ДНК, относящихся к кодирующим областям генов с известным клиническим значением. Для исследуемых образцов проведено полноэкзомное секвенирование на секвенаторе нового поколения Illumina NovaSeq 6000 методом парно-концевого чтения (2x75 п.о.) со средним покрытием 138X – 234X. Для каждого из пациентов определены мажорные мутации - проанализирована ДНК на предмет наличия изменений в генах, ответственных за формирования фенотипа мышечной дистрофии. Для каждого из образцов выполнено выделение ДНК. Осуществлена характеристика мутаций - выявленные изменения описаны в соответствии с международной номенклатурой, описаны изменения на уровне генома и белка, указан тип наследования и частота встречаемости мутаций (в случаях, когда возможно провести статистическую оценку), определена патогенность мутации.

5. В результате выбора и обоснования технологического подхода к генной терапии дисферлинопатии в зависимости от типа мутаций установлено, что генный трансфер является наиболее оптимальным технологическим подходом для разработки лечения дисферлинопатии. Описаны различные типы мутаций у пациентов с дисферлинопатией, однако ввиду отсутствия данных о наиболее часто встречающихся мутациях и орфанного характера заболевания применение иных методов нецелесообразно. Применение генного трансфера позволяет охватить наиболее широкий спектр пациентов вне зависимости от типа мутации. Плазмидные и AAV векторы

показали себя как наиболее безопасные и эффективные средства доставки генетического материала внутрь клетки как *ex vivo* так и *in vivo*.

6. Создана *in vitro* тест-система – модели дисферлинопатии

7. Проведена иммортализация культур клеток фибробластов пациента с дисферлинопатией. С помощью проточного цитофлуориметра-сортера BD FACS Aria III, USA получена гомогенная культура иммортализованных фибробластов. Эффективность трансдукции подтверждена вестерн-блот анализом с антителами на белок-онкосупрессор p53.

8. Проведена сборка рекомбинантных лентивирусов, несущих MyoD для миогенной дифференцировки фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина.

9. Проведена трансдукция фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина рекомбинантными лентивирусами несущими MyoD для миогенной дифференцировки. Анализ генетической дифференцировки при помощи флуоресцентной микроскопии на инвертированном флуоресцентном микроскопе исследовательского класса AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8. выявил миотубоподобную морфологию клеток, указывающий на проведение успешной генетической модификации и получение миобластов.

10. Проведен анализ эффективности миогенной дифференцировки путем иммуноблоттинга с антителами на MyoD. Вестерн-блот анализ выявил положительную реакцию с антителами на MyoD, наблюдалась полоска, соответствующая ожидаемому размеру белка MyoD (45 кДа).

11. Проведен анализ экспрессии мРНК дисферлина в миобластах, полученных путем миогенной дифференцировки. С помощью ПЦР-РВ определена незначительная экспрессия мРНК гена дисферлина после генетической дифференцировки LV-TRE-VP64 human MyoD-T2A-dsRedExpress2.

12. Разработанная тест-система для *in vitro* исследования эффективности и безопасности генетических конструкций представляет собой миобласты, искусственно полученные из пациент-специфичных фибробластов путем прямой миогенной трансдифференцировки. Клетки иммортализованы, формируют миотубы и готовы для проведения исследований мышцеспецифичных генетических конструкций.

13. В ходе наработки препаративных количеств препарата были собраны и очищены два вирусных вектора для препарата ААВ9-ДИСФ-ДВ: ААВ9-DYSF-DV5' и ААВ9-DYSF-DV3', пригодные для *in vivo* тестов. Титр вирусных частиц в препарате был определен методом количественной ПЦР в реальном времени. Содержание примеси бактериальных эндотоксинов не превышает 0,96 ЕЭ/мл для ААВ9-DYSF-DV5' (вектор 1) и 0,48 ЕЭ/мл для ААВ9-DYSF-DV3' (вектор 2). Содержание примесей бычьего сывороточного альбумина (БСА), белков клеток-производителей линии НЕК293 и микоплазмы не обнаружено в векторе 1 и векторе 2. Разрабатываемый препарат ААВ9-ДИСФ-ДВ является двухвекторным и получен в объеме 19,61 мл путем смешивания 9,77 мл для ААВ9-DYSF-DV5' и 9,84 мл для ААВ9-DYSF-DV3'.

14. С целью реализации исследовательской программы и Плана-графика выполнения работ в рамках Соглашения о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 для исследования специфической активности сформирована популяция, включающая дисферлин-дефицитных мышей с генотипом 6.A-Dysf<sup>prmd</sup>/GeneJ, Stock No: 012767, Jackson Laboratory, возрастом 10-11 месяцев. Сформированы экспериментальные группы для начала исследования специфической активности препарата ААВ9-ДИСФ-ДВ.

15. С целью реализации исследовательской программы и Плана-графика выполнения работ в рамках Соглашения о субсидии № № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 подготовлена популяция животных для отдельных исследований токсикологической биобезопасности ААВ9-ДИСФ-ДВ из следующих экспериментальных животных: - белые лабораторные мыши – 60

мышей (масса 18-22 грамма, соотношение самок и самцов – 50/50) - крысы линии Wistar – 174 самца + 120 самок (масса 180 – 220 граммов)

16. При выполнении работ в 2021 году начато исследование специфической активности лекарственного средства на основе адено-ассоциированного вирусного вектора ААВ9-ДИСФ-ДВ на модельных животных с дисферлинопатией генотипом 6.A-Dysf<prmd>/GeneJ, Stock No: 012767. Первичные результаты могут свидетельствовать о том, что препарат эффективен у дисферлиндефицитных животных в проведенных тестах, а его внутривенное введение а также комбинированное внутривенное введение ААВ9-ДИСФ-ДВ в объеме 100 мкл + ПЛ-ДИСФ- рМНСК7 (ПЛ1- препарат на основе плазмидной ДНК с промотором рМНСК7) внутримышечно в правую Musculus tibialis anterior + ПЛ-ДИСФ-рCMV (ПЛ2 - препарат на основе плазмидной ДНК с промотором рCMV) внутримышечно в левую Musculus tibialis anterior приводит к статистически значимым изменениям, характеризующим эффективную коррекцию фенотипических проявлений дисферлинопатии.

17. В ходе работ выполнена наработка препаративных количеств, оценка качества и формулирование препарата ПЛ-ДИСФ. Подготовлены бактериальные стоки для дальнейшего хранения. Количество очищенной и готовой к применению в дальнейших ин vivo исследованиях плазмиды составило 5 мг.

18. С целью реализации исследовательской программы и Плана-графика выполнения работ в рамках Соглашения о субсидии № № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 для исследования специфической активности сформирована популяция, включающая дисферлин-дефицитных мышей с генотипом 6.A-Dysf<prmd>/GeneJ, Stock No: 012767, Jackson Laboratory, возрастом 10-11 месяцев. Сформированы экспериментальные группы для начала исследования специфической активности препарата ПЛ-ДИСФ с вариативными промоторами.

19. С целью реализации исследовательской программы и Плана-графика выполнения работ в рамках Соглашения о субсидии № № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 подготовлена популяция животных для отдельных исследований токсикологической безопасности препарата на основе плазмидной ДНК ПЛ-ДИСФ из следующих экспериментальных животных: - белые лабораторные мыши – 60 мышей (масса 18-22 грамма, соотношение самок и самцов – 50/50); - крысы линии Wistar – 174 самца + 120 самок (масса 180 – 220 граммов)

20. При выполнении работ в 2021 году начато исследование специфической активности лекарственных средств на основе плазмидной ДНК ПЛ-ДИСФ- рМНСК7 (шифр ПЛ1- препарат на основе плазмидной ДНК с промотором рМНСК7) в объеме 100 мкл (по 50 мкл в правую и левую Musculus tibialis anterior) и ПЛ-ДИСФ-рСМV (ПЛ2 - препарат на основе плазмидной ДНК с промотором рСМV) в объеме 100 мкл (по 50 мкл в правую и левую Musculus tibialis anterior) на модельных животных с дисферлинопатией генотипом 6.A-Dysf<prmd>/GeneJ, Stock No: 012767. Первичные результаты могут свидетельствовать о том, что препарат эффективен у дисферлиндефицитных животных в проведенном тесте вертикальный шест. Сравнение эффективности препаратов на основе аденоассоциированного вирусного вектора и плазмидной ДНК с указанными промоторами запланировано на следующий этап реализации Соглашения и будет проведено по совокупности данных, характеризующих эффективную коррекцию фенотипических проявлений дисферлинопатии и данных иммуногистохимических, молекулярно-биологических и генетических исследований.

21. Разработаны генотерапевтические препараты на основе аденоассоциированного и плазмидного векторов для лечения дисферлинопатии. Сконструирован плазмидный вектор генотерапевтического препарата для лечения дисферлинопатии. Осуществлена предварительная проверка безопасности и эффективности препаратов. Полученные в ходе

настоящего исследования результаты свидетельствуют, что введение двухвекторной системы, созданной на основе ААВ 9 серотипа с кодон-оптимизированной кДНК дисферлина оказывает гистопротекторный эффект на скелетную мышечную ткань мышей с дисферлинопатией, способствуя восстановлению гистологической структуры скелетной мышцы. Данный эффект обусловлен активацией репаративного рабдомиогенеза под влиянием дисферлина, что проявляется статистически значимым снижением доли некротизированных МВ и повышением регенераторной способности скелетных мышц (увеличением доли ЦЯМВ, снижением средней площади поперечного сечения за счет уменьшения степени гипертрофии МВ). На всех срезах мышц после системного введения геннотерапевтической конструкции был определен продукт иммунофлюоресцентной реакции, что с высокой долей вероятности свидетельствует о выработке целевого белка продолжительностью как минимум до 12 недели в результате ААВ-трансфекции и его транспортировке в сарколемму. Таким образом, системное введение геннотерапевтической конструкции на основе ААВ 9 серотипа способствует восстановлению структуры скелетной мышечной ткани.

22. Закупка оборудования и материалов для выполнения работ по проекту проведено в полном соответствии с пунктом 1.2.15 Плана-графика работ, выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021).

23. Стажировки 5 сотрудников лаборатории в возрасте до 39 лет в ведущих научных и образовательных организациях России проведены в полном соответствии с пунктом 1.3.1 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических

исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 проведены

24. В соответствии с пунктом 1.1.1 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие техно-логий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 создана лаборатория моделирования и генной терапии заболеваний человека.

25. В соответствии с 1.1.2 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 заключены 4 договора о сетевом сотрудничестве с ведущими лабораториями, на базе которых проводятся генетические исследования.

26. В соответствии с 1.1.3 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 Создан интернет портал лаборатории и информационная инфраструктура для накопления и анализа результатов выполнения работ.

27. В соответствии с 1.1.4 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 на 1 этапе за счет внебюджетных источников проведены работы по обеспечению функционирования лаборатории, в т.ч. строительные-монтажные, ремонтно-



восстановительные, пуско-наладочные работы. В том числе, для выполнения работ по реализации Плана-графика и Исследовательской программы выделены, отремонтированы и введены в эксплуатацию лабораторные помещения Регионального микробиологического центра и Центра клеточных технологий НИУ «БелГУ» общей площадью 646,9 м<sup>2</sup> с возможностью дальнейшего расширения. Также проведена разработка проектно-сметной документации в части архитектурных и планировочных решений нового лабораторного корпуса для выполнения работ в рамках настоящего Соглашения и расширения лаборатории моделирования и генной терапии заболеваний человека на этапе 2 проекта.

28. В соответствии с 1.3.2 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 на 1 этапе Разработка-на образовательная программа «Молекулярная биология» для студентов медицинского института НИУ «БелГУ».

29. В соответствии с 1.3.3 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 на 1 этапе Разработка-на сетевая образовательная программа ординатуры по направлению «Генетика».

30. В соответствии с 1.3.6 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 на 1 этапе проведена научная конференция по теме проекта с международным

участием, с участием 201 человека, 22 иностранными участниками и докладами на русском и английском языках

31. В соответствии с 1.3.7 Плана-графика работ выполняемых в рамках реализации исследовательской программы по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» (Приложение №9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 на 1 этапе за счет внебюджетных источников разработана программа и курс лекций по молекулярной биологии и молекулярной фармакологии.

32. Исследования на 1 этапе реализации Исследовательской программы и Плана-графика работ, выполняемых в рамках Соглашения о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021 по теме «Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейро-мышечных заболеваний» проведены в полном объеме и в полном соответствии с требованиями Приложения №9 к Соглашению.

33. Проведенные работы обладают научной новизной, имеют большую прикладную и социальную значимость т.к. в рамках реализации Плана-графика и Исследовательской программы запланировано получение новой линии трансгенных мышечей для изучения новых механизмов патогенеза и путей генной и фармакологической терапии нейромышечных заболеваний, а также, получение и доклинические исследования двух препаратов генной терапии миодистрофии Миоши (препаратов на основе плазмидной ДНК и адено-ассоциированного вирусного вектора).

34. Сведения о ходе выполнения проекта размещены на официальной интернет странице НИУ «БелГУ» по адресу

[https://bsuedu.ru/bsu/info/structure/detail.php?ID=10619&IBLOCK\\_ID=78#rez](https://bsuedu.ru/bsu/info/structure/detail.php?ID=10619&IBLOCK_ID=78#rez)