

Лаборатория моделирования и генной терапии заболеваний человека

Результаты работ

при выполнении работ по 2 этапу реализации Исследовательской программы и Плана-графика получены следующие основные результаты:

В результате работ на втором этапе реализации проекта получены две уникальные линии мышей-моделей болезни Паркинсона с помощью редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9 технологии. В том числе получена линия мышей, несущих гуманизированный ген альфа-синуклеина обозначенная нами как [Hum_SNCAflox/delta_neo], где ген, кодирующего альфа-синуклеин мыши, заменен на ген, кодирующий нативный альфа-синуклеин человека. Вторая линия мышей, обозначенная нами как [HumT53_SNCAflox/delta_neo], у которой отредактированный ген [HumT53_SNCAflox/delta_neo] кодирует патогенный альфа-синуклеин человека (A53T). Проведенные работы обладают научной новизной, имеют большую прикладную и социальную значимость т.к. в рамках реализации Плана-графика и Исследовательской программы запланировано получение и доклинические исследования двух препаратов генной терапии миодистрофии Миоши (препаратов на основе плазмидной ДНК и аденоассоциированного вирусного вектора) и получение двух линий мышей-моделей болезни Альцгеймера.

Созданные линии мышей, обеспечивающие стабильную и физиологически значимую продукцию человеческого альфа-синуклеина вместо животного белка, могут быть использованы для исследований молекулярных механизмов патогенеза ключевых аспектов патогенеза БП, для моделирования нарушения функции альфа-синуклеина специфически в нейронах путем прижизненного вырезания гена в геноме животных в любом возрасте, для триггерной инициации патологического процесса в нервной системе мышей [HumT53_SNCAflox/delta_neo] и [Hum_SNCAflox/delta_neo] путем введения альфа-синуклеиновых олигомерных затравок и отработки методов генной терапии, основанной на модификации функции альфа-синуклеина или тестирования новых соединений для подавления прогрессии альфа-синуклеинопатии на различных ее стадиях. Проведенные работы обладают научной новизной, имеют большую прикладную и социальную значимость т.к. в рамках реализации Плана-графика и Исследовательской программы запланировано получение и доклинические исследования двух препаратов генной терапии миодистрофии Миоши (препаратов на основе плазмидной ДНК и аденоассоциированного вирусного вектора) и получение двух линий мышей-моделей болезни Альцгеймера.

На основании проведенного исследования специфической активности следует, что между экспериментальными группами AAV1, AAV2, AAV3, AAV4 и контрольными есть статистически значимые различия. И со временем положительная тенденция между экспериментальными группами и контрольными сохраняется. На основании анализа данных поведенческого тестирования можно сделать вывод о положительном эффекте препарата в дозе $5 \cdot 10^{12}$ ед. вируса с геном DYSF при внутримышечном введении мышам Vla/J с нокаутом гена DYSF, так же эффективность показала доза $1 \cdot 10^{12}$ ед. вируса при внутримышечном введении, но эффект выражен слабее. По совокупности комплекса морфологических и иммуноморфологических данных следует заключить нижеследующее.

- Доставка функционального гена DYSF в мышечные волокна реализуема и успешна при использовании аденоассоциированного вирусного вектора.

- Эффективность трансдукции при оптимальном протоколе внутримышечного введения вирусного вектора достигает 30%, а медианный уровень трансдукции превышает 15% от всех мышечных волокон в исследуемых мышцах.

- AAV 1 – площадь волокон не изменилась в сравнении с К-; доля волокон с интернализированными ядрами ниже чем у К-; доля некротизированных мышечных волокон занимает промежуточное положение между К+ и К-, статистически не отличимая от них.

- AAV 2 - доля некрозов сопоставима с К-; медианная площадь волокон ниже на 40% чем у К-, что объясняется преобладанием маленьких мышечных волокон и низкая доля волокон с интернализированными ядрами.

- AAV 3 и AAV4 – медианные площади волокон занимают промежуточное положение между К+ и К-, однако при этом статистически значимо не отличимы от К- группы и значимо отличимы от К+; имеют низкий медианный уровень некрозов, занимая по нему промежуточное положение между К+ и К-, статистически значимо не отличаясь от них. Доля волокон с интернализированными ядрами высокая, на уровне К-, что объясняется сохранением больших мышечных волокон.

- Во всех изученных образцах экспериментальных групп отмечается достижение по показателям доли некротизированных мышечных волокон, мышечных волокон с интернализированными ядрами и площади поперечного сечения мышечных волокон медианных показателей, занимающих промежуточное положение между этими же показателям у линии мышей групп контроля К+ и К-, но не отличающихся статистически значимо от них, что может объясняться коротким, 14-дневным, сроком от момента введения генетических векторов до момента забоя животных.

- При оценке количества РНК и ДНК трансгенного дисферлина в образцах экспериментальных животных, при помощи обратной транскрипция и ПЦР в реальном времени были обнаружены статистически значимые отличия между группами AAV 2 и AAV 1, а также AAV 3 и AAV 1, как на уровне ДНК, так и РНК. Однако значимых различий между группами AAV 2 и AAV 3 не обнаружено.

В результате исследования острой токсичности установлено, что кандидат в лекарственное средство с лабораторным шифром ААВ9-ДИСФ-ДВ при однократном внутривенном введении в максимально допустимом объеме 0,2 мл половозрелым мышам не вызывает развития симптомов интоксикации и гибели экспериментальных животных. При изучении субхронической токсичности установлено, что кандидат в лекарственное средство с лабораторным шифром ААВ9-ДИСФ-ДВ при однократном внутривенном введении в дозах 1×10^{12} /л, 3×10^{12} /л и 30×10^{12} /л половозрелым крысам не оказывает токсического действия на организм животных, а также не обладает местнораздражающим действием в месте его введения по прошествии 1, 3 и 6 месяцев наблюдения. Кандидат в лекарственное средство с лабораторным шифром ААВ9-ДИСФ-ДВ может быть рекомендован для представления в Министерство здравоохранения Российской Федерации с целью государственной регистрации.

При изучении субхронической токсичности установлено, что кандидат в лекарственное средство с лабораторным шифром ПЛ-ДИСФ при однократном внутримышечном введении в максимально допустимом объеме 0,5 мл половозрелым мышам не вызывает развития симптомов интоксикации и гибели экспериментальных животных.

В ходе проведения исследования влияния на формирование иммунных реакций гуморального, клеточного и фагоцитарного типа у препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора с лабораторным шифром ААВ9-ДИСФ-ДВ не выявлено признаков острой иммунотоксичности.

На основании проведенных тестов можно сделать вывод, что между экспериментальными группами рМНСК7-1, рМНСК7-2, рСМV-3, рСМV-4 и контрольными есть статистически значимые различия. Эффект препарата в поведенческих тестах наблюдается, но выражен слабо. Со временем между экспериментальными и контрольными группами тенденция сохраняется. Измерение длины тела и массы животных статистически значимых различий между экспериментальными группами животных и контрольными не выявило. По совокупности комплекса морфологических и иммуноморфологических данных следует заключить нижеследующее:

- рМНСК7 (1), рМНСК7 (2), рСМV (3), рСМV (4) – имеют промежуточный, средний по уровню доли волокон с интернализированными ядрами и доли некротизированных волокон между К+ и К-, статистически не отличимый от них. Однако рМНСК7 (2) и рСМV (3) имеют площадь сечения мышечного волокна статистически значимо меньше, чем у К- на 22% и 40% соответственно.

- Во всех изученных образцах экспериментальных групп отмечается достижение по показателям доли некротизированных мышечных волокон, мышечных волокон с интернализированными ядрами и площади поперечного сечения мышечных волокон медианных показателей, занимающих промежуточное положение между этими же показателям у линии мышей групп контроля К+ и К-, но не отличающихся статистически значимо от них, что может объясняться коротким, 14-дневным, сроком от момента введения генетических векторов до момента забоя животных.

- В ходе проведения ПЦР в реальном времени для оценки распределения и количества ДНК трансгенного дисферлина в образцах экспериментальных животных. Были обнаружены статистически достоверные различия между положительным контролем и экспериментальными группами. рСМV-3, рСМV-4, рМНСК7-1, рМНСК7-2. В результате исследования субхронической токсичности установлено, что Кандидат в лекарственное средство с лабораторным шифром ПЛ-ДИСФ при однократном внутримышечном введении в дозах 100, 200 и 500 мкг на животное половозрелым крысам не оказывает токсического действия на организм животных, а также не обладает местно-раздражающим действием в месте его введения по прошествии 1, 3 и 6 месяцев наблюдения. При изучении острой токсичности показано, что кандидат в лекарственное средство с лабораторным шифром ПЛ-ДИСФ при однократном внутримышечном введении в максимально допустимом объеме 0,5 мл половозрелым мышам не вызывает развития симптомов интоксикации и гибели экспериментальных животных. Кандидат в лекарственное средство с лабораторным шифром ПЛ-ДИСФ может быть рекомендован для представления в Министерство здравоохранения Российской Федерации с целью государственной регистрации.

В ходе исследования выполнено выделение ДНК представленных биологических образцов от 12 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 проанализирована ДНК на предмет наличия изменений в генах, ответственных за

формирования фенотипа мышечной дистрофии. Для каждого из образцов выполнено выделение ДНК. 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.

В ходе работы было выполнено создание клеточных тест-систем на основе фибробластов от пациентов с дисферлинопатией. Клеточные тест-системы будут в дальнейшем использоваться для отработки методов генной терапии *in vitro*, а также для проведения этапа доклинических исследований. Все полученные клетки биоматериалы были заморожены в соответствии с описанным протоколом и заложены в биобанк для длительного хранения.

В ходе проведения исследования влияния на формирование иммунных реакций гуморального, клеточного и фагоцитарного типа препарата на основе плазмидной ДНК с лабораторным шифром ПЛ-ДИСФ, у экспериментальных животных не выявлено признаков острой иммунотоксичности.

В ходе выполнения исследовательской программы заключены договоры с ведущими организациями проводящими генетические исследования с целью реализации совместных научных исследований в области биомедицины и генной терапии. С ООО "Марлин биотех" планируется проведение работ по разработке новых геннотерапевтических подходов и отработке производственных процессов, с ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН - разработка новых подходов к генному редактированию модельных мышей и отработка производства плазмид, с ИФАВ РАН - гистологическая, поведенческая и молекулярно-биологическая характеристика модельных мышей и формирование экспериментальных групп для доклинических исследований, ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора - разработка новых подходов к генному редактированию модельных мышей молекулярно-биологическая характеристика модельных мышей. В 2022 году разработана программа совместных исследований сети лабораторий по тематике проекта.

В отчётный период с целью развития кадрового потенциала проводились мероприятия по стажировке действующих членов коллектива в ведущих образовательных организациях России ведущих работы в области генетических технологий для освоения и совершенствования исследовательских компетенций и направление сотрудников для участия в научно-практической конференции для популяризации исследовательской программы и установления сети международного сетевого сотрудничества.

Проведена подготовка к участию и обеспечено участие членов научного коллектива в международных научных конференциях различного уровня.

Стажировки 30 сотрудников лаборатории в ведущих образовательных организациях высшего образования и научных организациях России. Курсы ДПО для 30 исследователей в возрасте до 39 лет в ведущих образовательных организациях высшего образования и научных организациях России.

Проведён набор студентов, сформированы группы слушателей по программе «Молекулярная биология» (400 слушателей). Проведён набор в ординатуру 10 ординаторов, начато обучение по программе ординатуры 31.08.30 Генетика.

Проведён набор в аспирантуру, начато обучение 5 аспирантов по программе аспирантуры 1.5.3 Молекулярная биология и 5 аспирантов по программе аспирантуры «Патологическая анатомия» (биологические науки, медицинские науки).

Также, на 2 этапе проведена научная конференция по теме проекта с международным участием, с участием 201 человека, 23 иностранных участника.

На втором этапе реализации проекта приказом No07/22 от 04/09/2022 создана биоресурсная коллекция - депозитарий линий генетически модифицированных соматических, половых клеток и животных.

В рамках данной работы сформировано Положение о депозитарии и Правила функционирования депозитария.

Депозитарий располагается на площадке экспериментально-биологической клиники НИУ «БелГУ» и на момент завершения работ по 2 этапу (31.12.2022) включает в себя биологический материал 12 линий животных-моделей заболеваний человека

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

https://www.bsu.edu.ru/bsu/structure/detail.php?ID=10619&IBLOCK_ID=78