



**приоритет2030<sup>+</sup>**  
лидерами становятся



ИНСТИТУТ  
СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК  
ЧЕЛОВЕКА

ПАО «Институт  
стволовых  
клеток  
человека»

# Геномное редактирование для создания животных моделей заболеваний человека

А.В. Дейкин

## Схема реализации решаемых задач

в рамках кластера проектов «Развитие генетических технологий»

Индустриальные партнёры: ПАО «Институт стволовых клеток человека», ООО «Генотаргет», ООО «Марлин Биотех», ЗАО «БИОКАДЬ», ЦВТ «Химрар», НТУ «Сириус», РОСНАНО

### ЧТО ЕСТЬ

Лаборатория молекулярной генетики человека

НИЛ клеточные, вспомогательные репродуктивные и ДНК технологии

Центр доклинический и клинических испытаний

Лаборатория клеточных культур

Экспериментально-биологическая клиника

Региональный микробиологический центр

Лаборатория геномного редактирования в биомедицине и ветеринарии

НИЦ геномной селекции

Лаборатория генетики и селекции растений

### ЧТО БУДЕТ

НИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО



Проект ориентирован на российских пациентов с генетическими заболеваниями —

**500 000 человек**

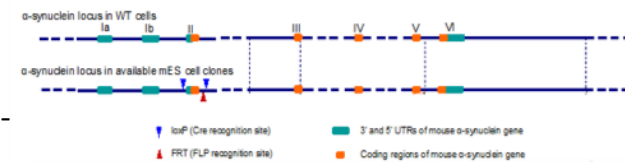
# Развитие технологий генетического моделирования в области медико-биологических исследований и генной терапии нейромышечных заболеваний (Соглашение № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021)

## ЗАДАЧИ



**1** Создать инфраструктуру и открыть лабораторию моделирования и генной терапии заболеваний человека, а также сформировать биоресурсную коллекцию – депозитарий линий мышей – моделей заболеваний человека

**2** Провести гуманизацию гена альфа-синуклеина в геноме мыши путем его точечного редактирования с помощью CRISPR технологий и создать линии с регулируемой экспрессией гена, кодирующего нормальный и модифицированный, ассоциированный с наследственной формой болезни Паркинсона, вариант альфа-синуклеина. Использовать полученные модели для изучения механизма распространения по нервной системе агрегационной патологии, индуцированной различными типами затравок агрегации альфа-синуклеина человека.



**3** Создать генетически модифицированные линии мышей, моделирующие потерю нормальной функции альфа-синуклеина, характерную для симптоматической стадии болезни Паркинсона и использовать их для оценки вклада этого механизма в патогенез болезни Паркинсона.

**4** Проведение исследований, разработка и доклинические испытания геннотерапевтических препаратов на основе плазмид и аденоассоциированных вирусов для терапии дисферлинопатии.



**5** Разработать курсы и включить в образовательные программы по генетическим технологиям студентов и аспирантов

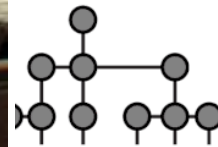


# Боковой амиотрофический склероз

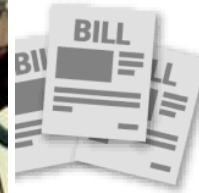


## What is ALS?

ALS is a progressive neurodegenerative disease that affects nerve cells in the brain and spinal cord. ALS usually strikes people between the ages of 40 and 70, and approximately 20,000 people in the U.S. have the disease at any given time.

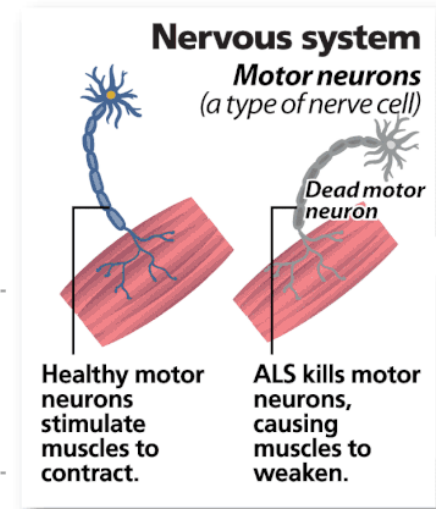


**10%** of cases are inherited, while 90% of cases occur without family history.



**\$250,000** is the estimated out-of-pocket cost for caring for a person with ALS.

Source: ALS Association



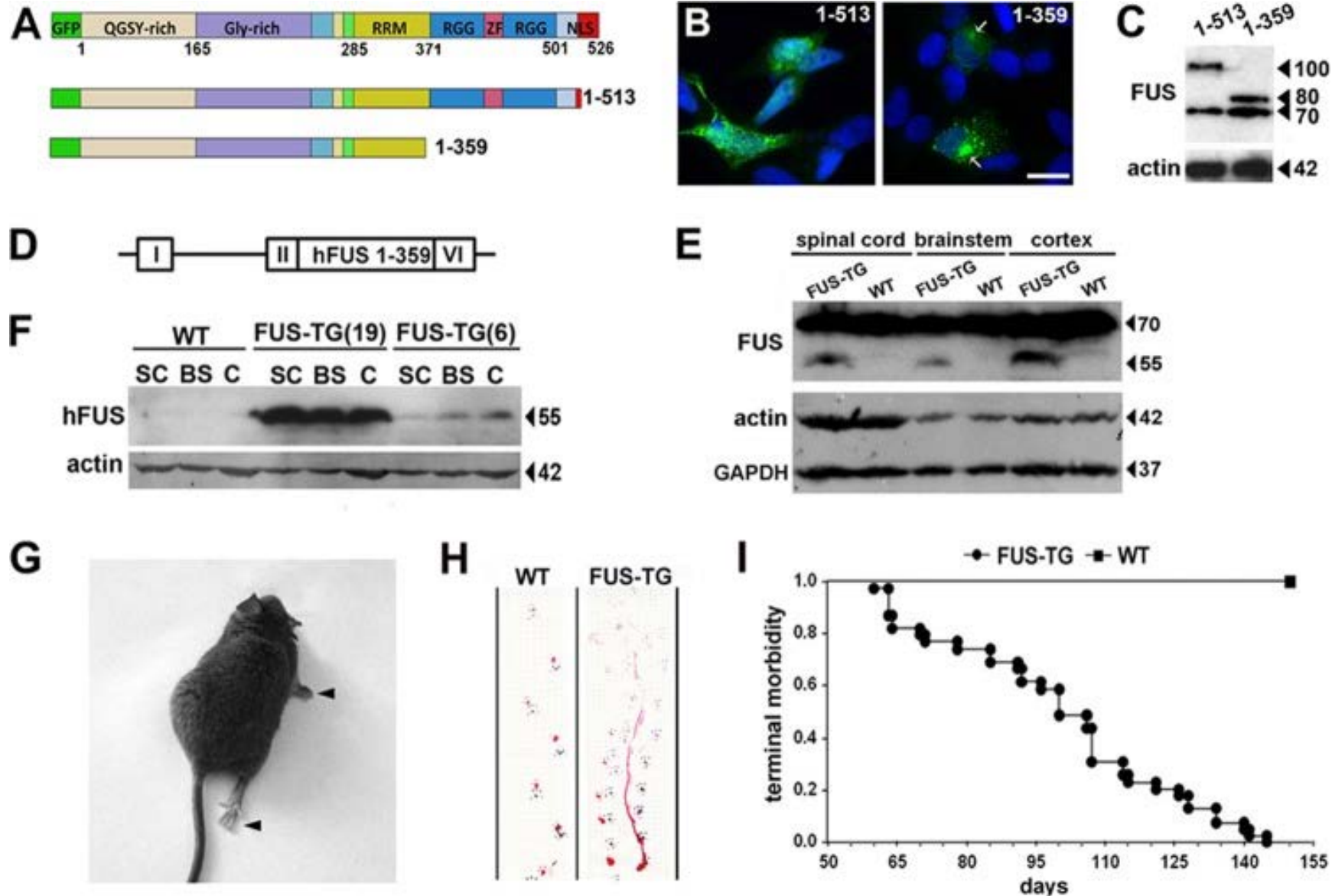
There is **NO CURE** for ALS.

**2-5 YEARS** is the average life expectancy.

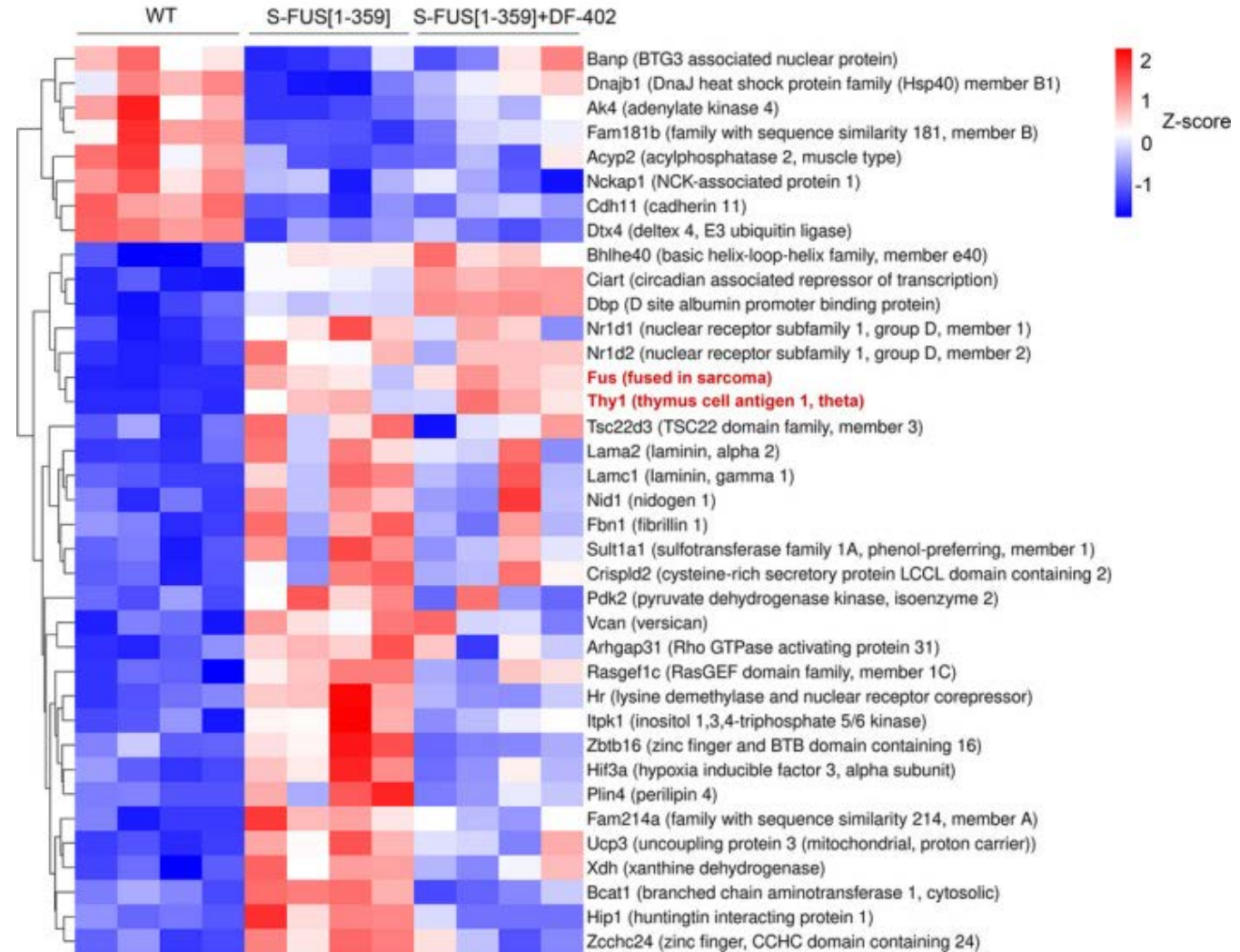
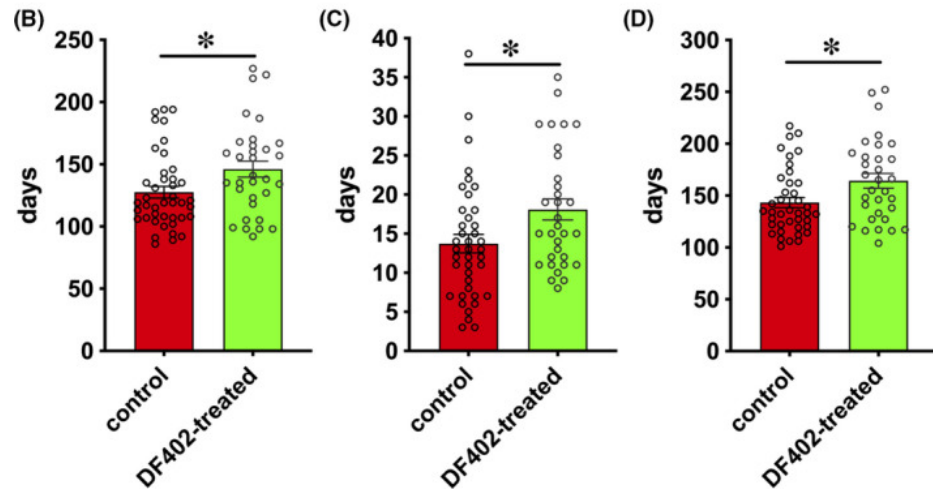
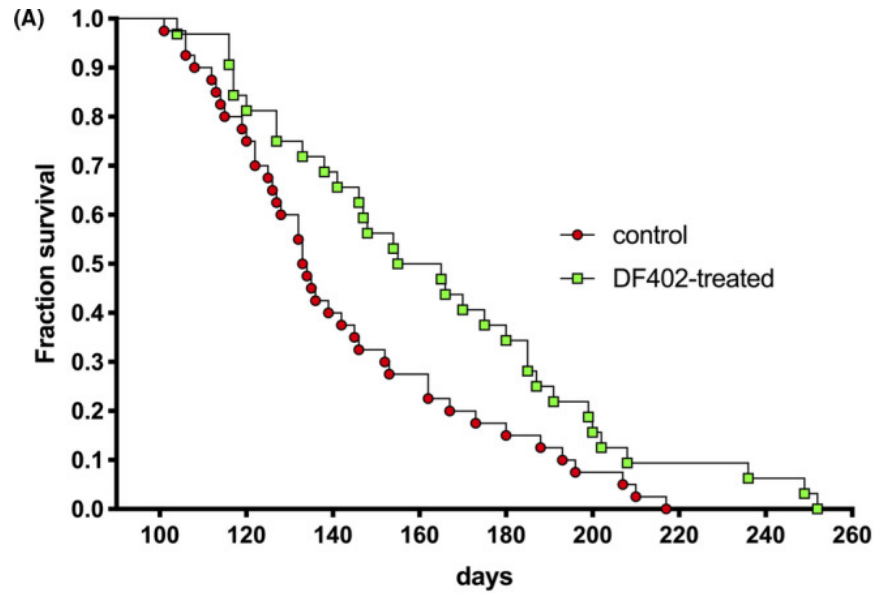
GRAPHIC BY CHRISTOPHER CHERRINGTON | *The Salt Lake Tribune*



# Мыши – модель БАС



# Мыши FUS [1-359] реагируют на терапию Димебоном/Латрепирдином



# ЛИНИЯ ТРАНСТГЕННЫХ МЫШЕЙ APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B1g ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО АМИЛОИДОЗА БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

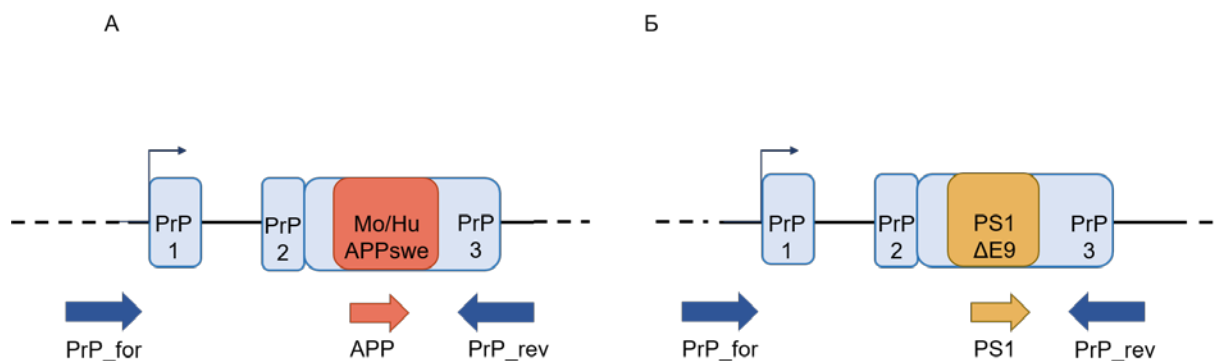


Рис 1. Схема положения праймеров для детектирования трансгенных кассет, содержащих А) кДНК гена белка предшественника амилоида со шведской мутацией (Mo/Hu APP<sup>swe</sup>) и Б) кДНК гена пресенилина 1 человека с делецией экзона 9 (PS1<sup>ΔE9</sup>) в геноме APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> мышей.

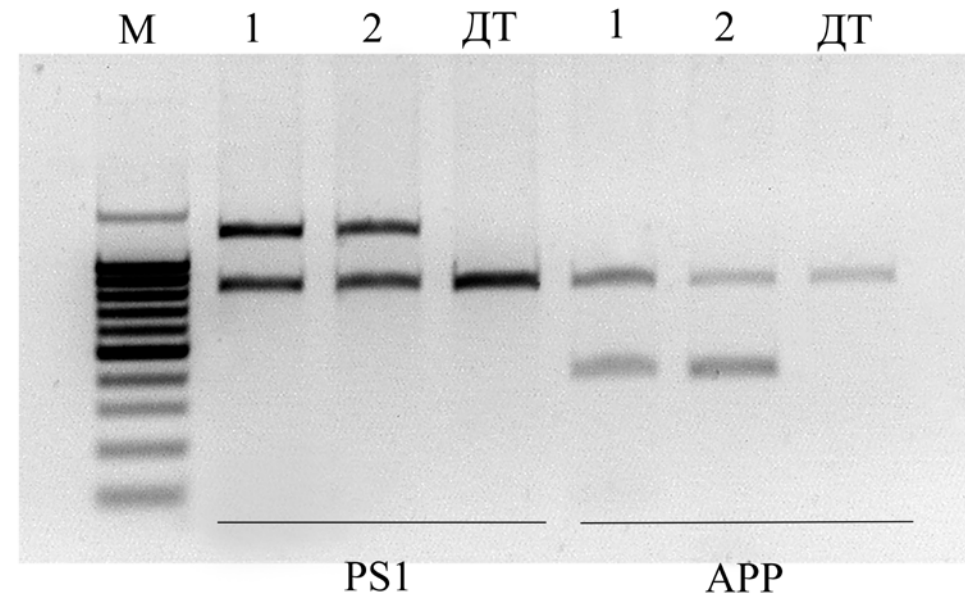


Рис. 2. Детектирование трансгенных кассет в геноме APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B1g мышей методом ПЦР. Все образцы имеют фрагмент 750 п.н. амплификации прионного белка мыши в качестве эндогенного контроля. Животные дикого типа (ДТ) имеют только фрагмент 750 п.н. У трансгенных животных APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>/B1g (1 и 2) появляется дополнительный фрагмент размером 1,3 кб после амплификации последовательности мутантного гена PSEN1 или фрагмент размером 400 п.н. после амплификации последовательности мутантного APP. Маркер 100+ п.н. (Евроген, Россия).

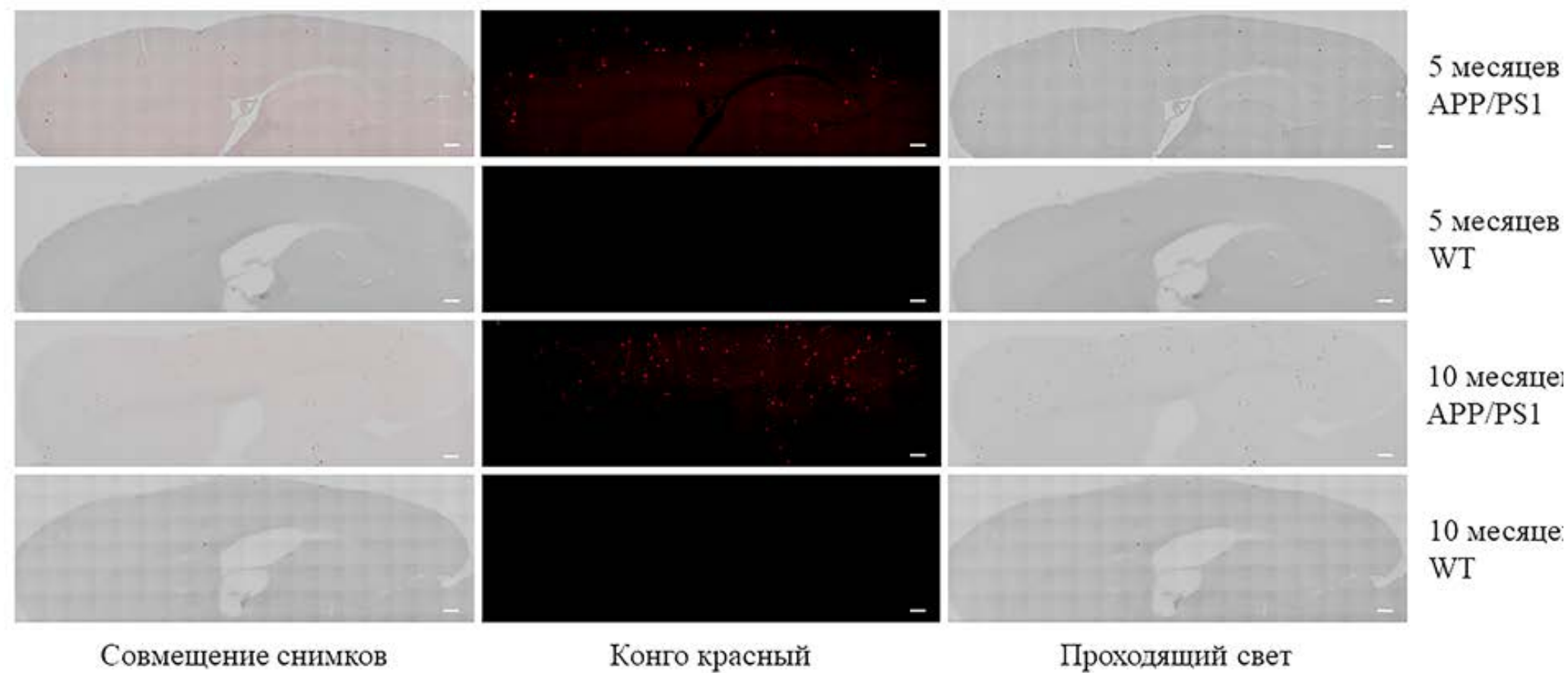


Рис. 4. Гистологический анализ включений  $A\beta$  на срезах мозга трансгенных животных `APPswe/PS1dE9/Blg` и контрольных животных дикого типа в возрасте 5,5 и 10 месяцев; окраска Конго Красным. Шкала измерений 200 мкм.



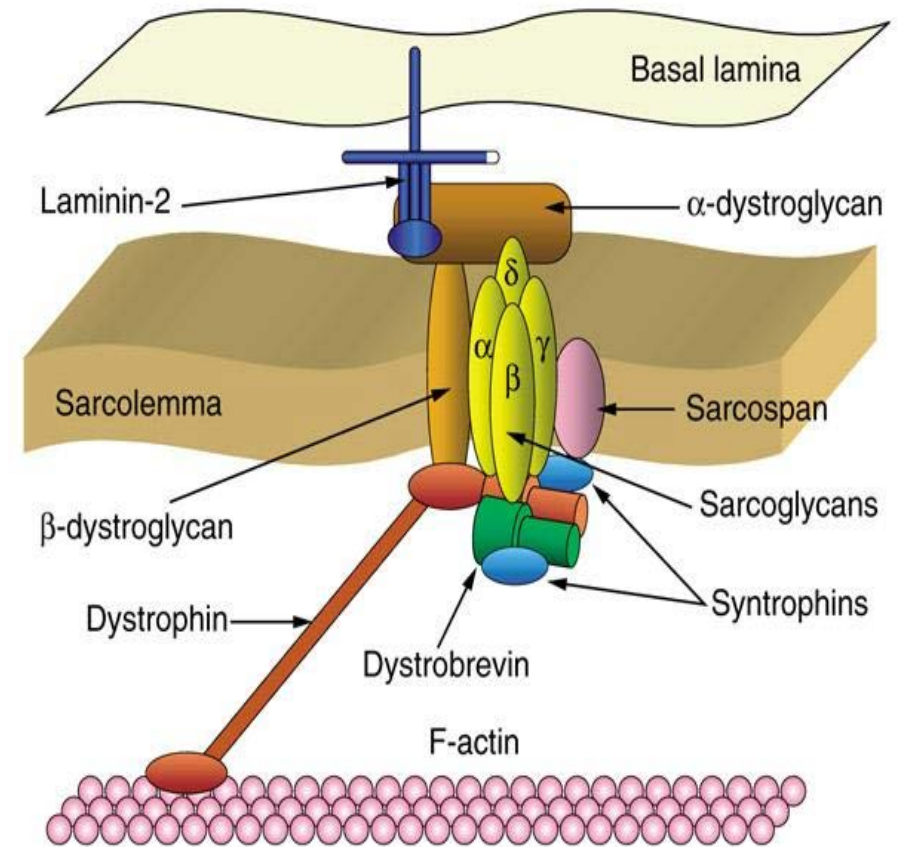
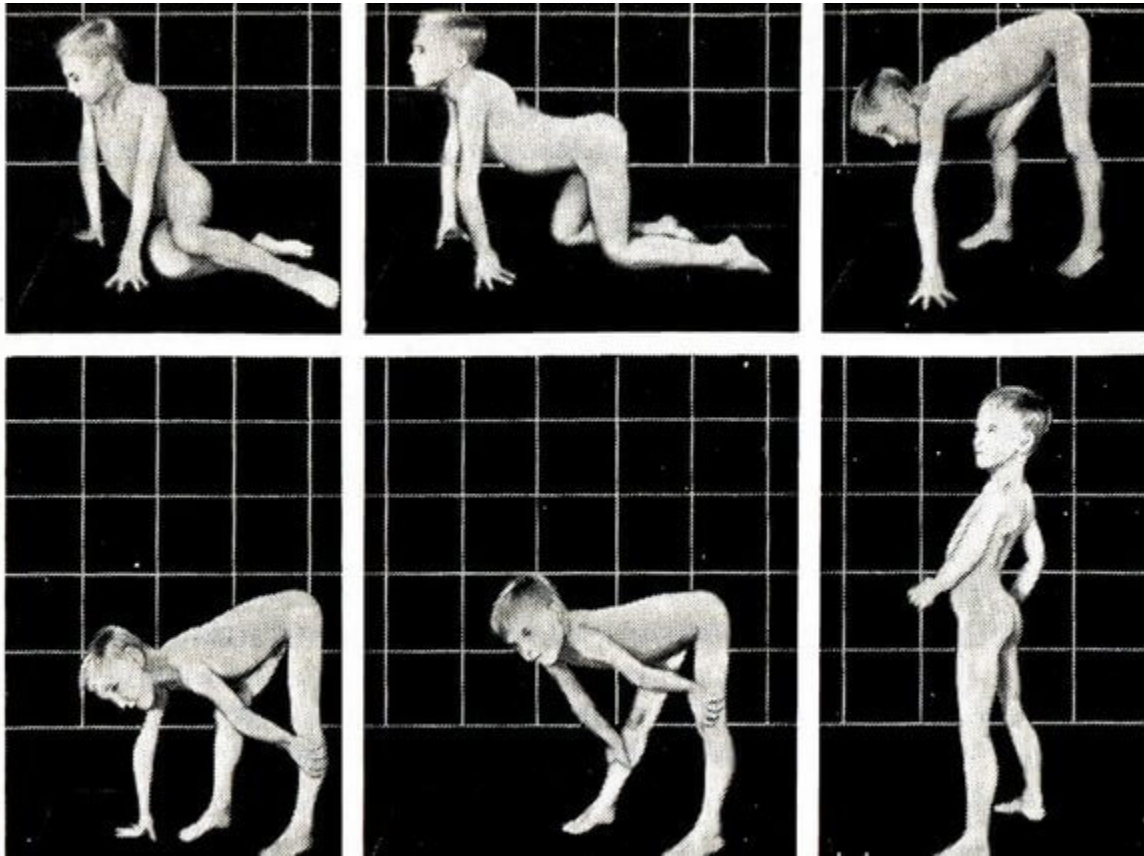
Проект РФФИ Номер 19-74-30007

Разработка новых фармакологических мишеней и взаимодействующих с ними низкомолекулярных химических соединений для лечения болезни Альцгеймера

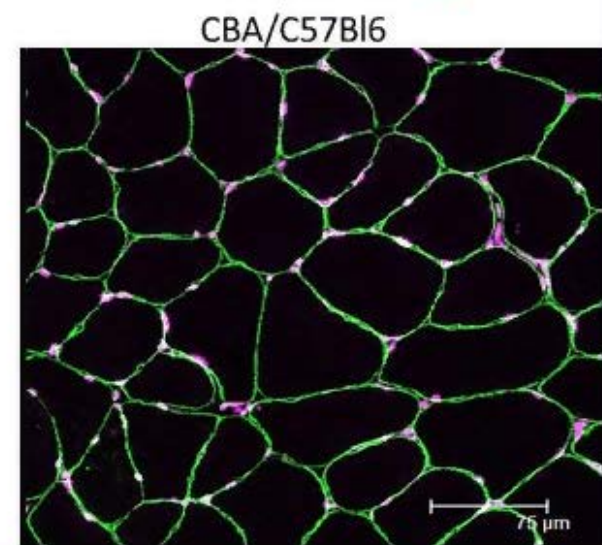
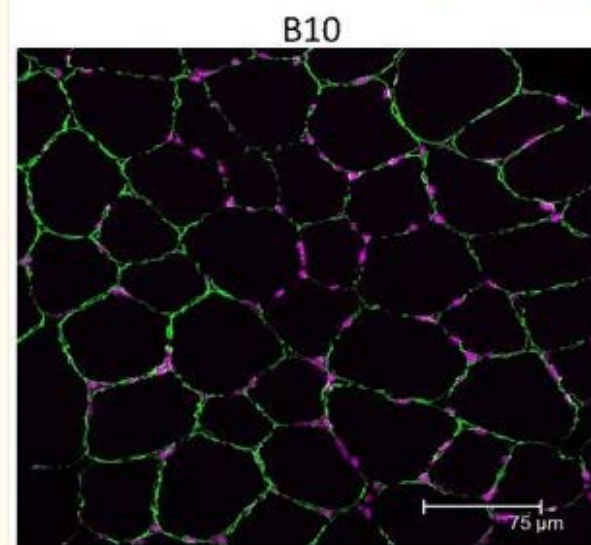
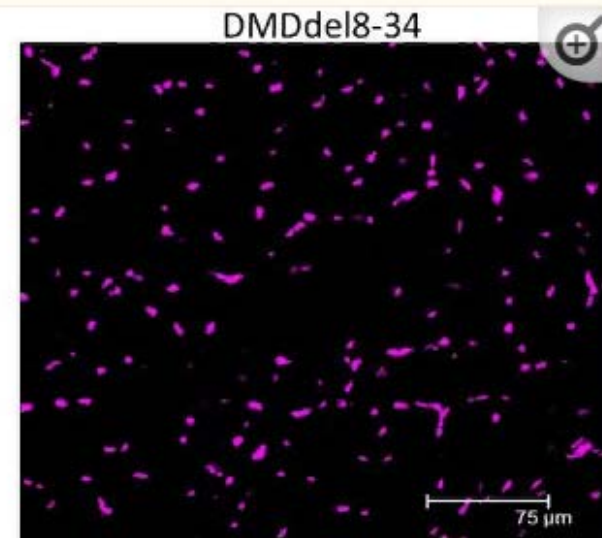
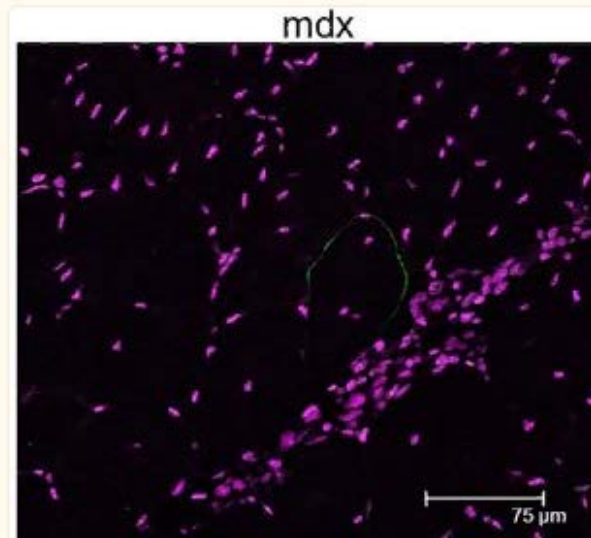
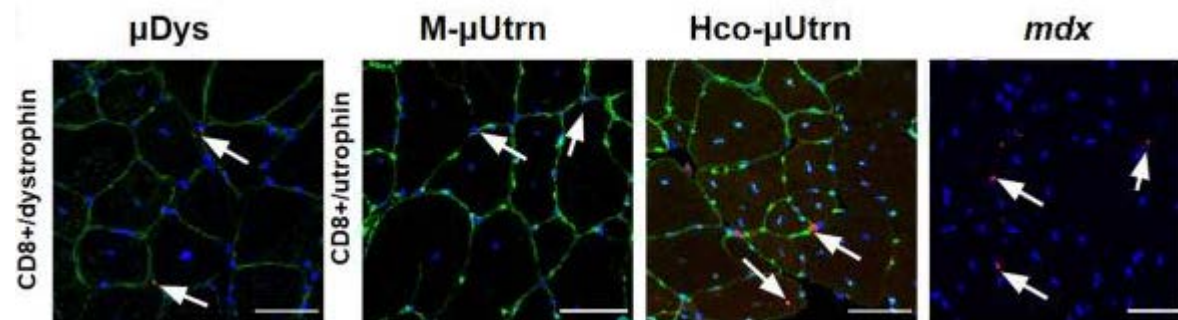
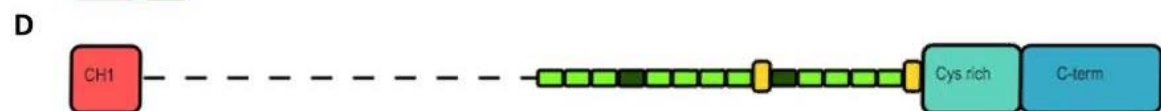
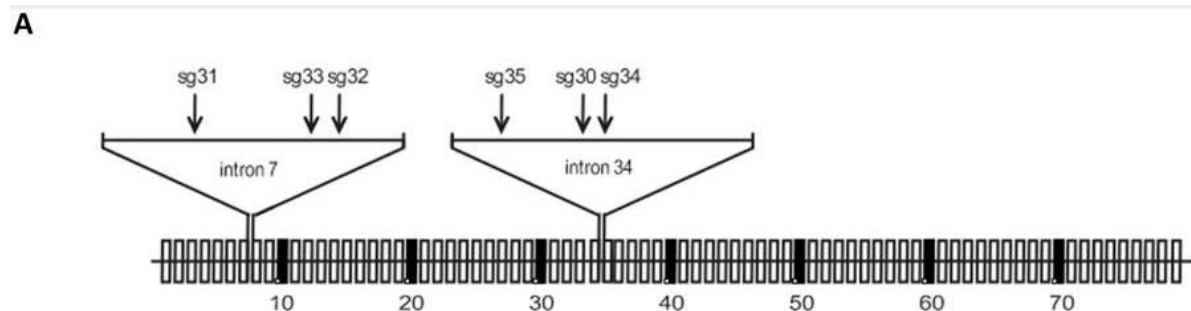
Руководитель - Макаров Александр Александрович, Доктор биологических наук

- Учитывая особую роль ацетилхолиновых рецепторов в патогенезе БА и полученные нами предварительные данные о том, что  $\alpha 4\beta 2nAChR$  взаимодействует с изоформами бета-амилоида через свой сайт 35-NAEE-38, мы проверили способность синтетического аналога этого сайта выступать в качестве конкурентного ингибитора образования амилоидной матрицы с участием  $\alpha 4\beta 2nAChR$ . Методами молекулярного моделирования и поверхностного плазмонного резонанса определено, что тетрапептид Ac-NAEE-NH<sub>2</sub> специфически связывается с участком 11-EVNH-14 A $\beta$ , а на рецепторах  $\alpha 4\beta 2nAChR$ , экспрессированных в ооцитах лягушки, было показано, что тетрапептид Ac-NAEE-NH<sub>2</sub> способен восстанавливать активность рецептора после инкубации с A $\beta$ . Инкубация с Ac-NAEE-NH<sub>2</sub> также снижала вызванные A $\beta$  токи утечки, что свидетельствует о восстановлении механизмов, регулирующих ионную проницаемость рецептора.
- Для дальнейшей всесторонней проверки роли участка 35-NAEE-38  $\alpha 4\beta 2nAChR$  в формировании амилоидных матриц *in vivo* нами в 2020 году методом генного редактирования получена генетически модифицированная линия мышей с заменой участка NAEE на NAAA.
- Также на этапе 2021 г. были подготовлены представительные экспериментальные группы оверэкспрессирующих человеческий A $\beta$  трансгенных мышей, у которых в гене CHRNA4, кодирующем субъединицу  $\alpha 4$  никотинового ацетилхолинового рецептора подтипа  $\alpha 4\beta 2$ , вместо участка NAEE, отвечающего за специфическое связывание с участком EVNH A $\beta$ , вставлен фрагмент NAAA, исключающий образование специфических нековалентных комплексов этого рецептора с молекулами A $\beta$ . Подготовленные в 2021 г. животные будут использоваться на следующем этапе выполнения Проекта для выявления *in vivo* роли комплекса isoD7-A $\beta$ (1-42) и никотинового ацетилхолинового рецептора в качестве амилоидной матрицы при развитии БА.

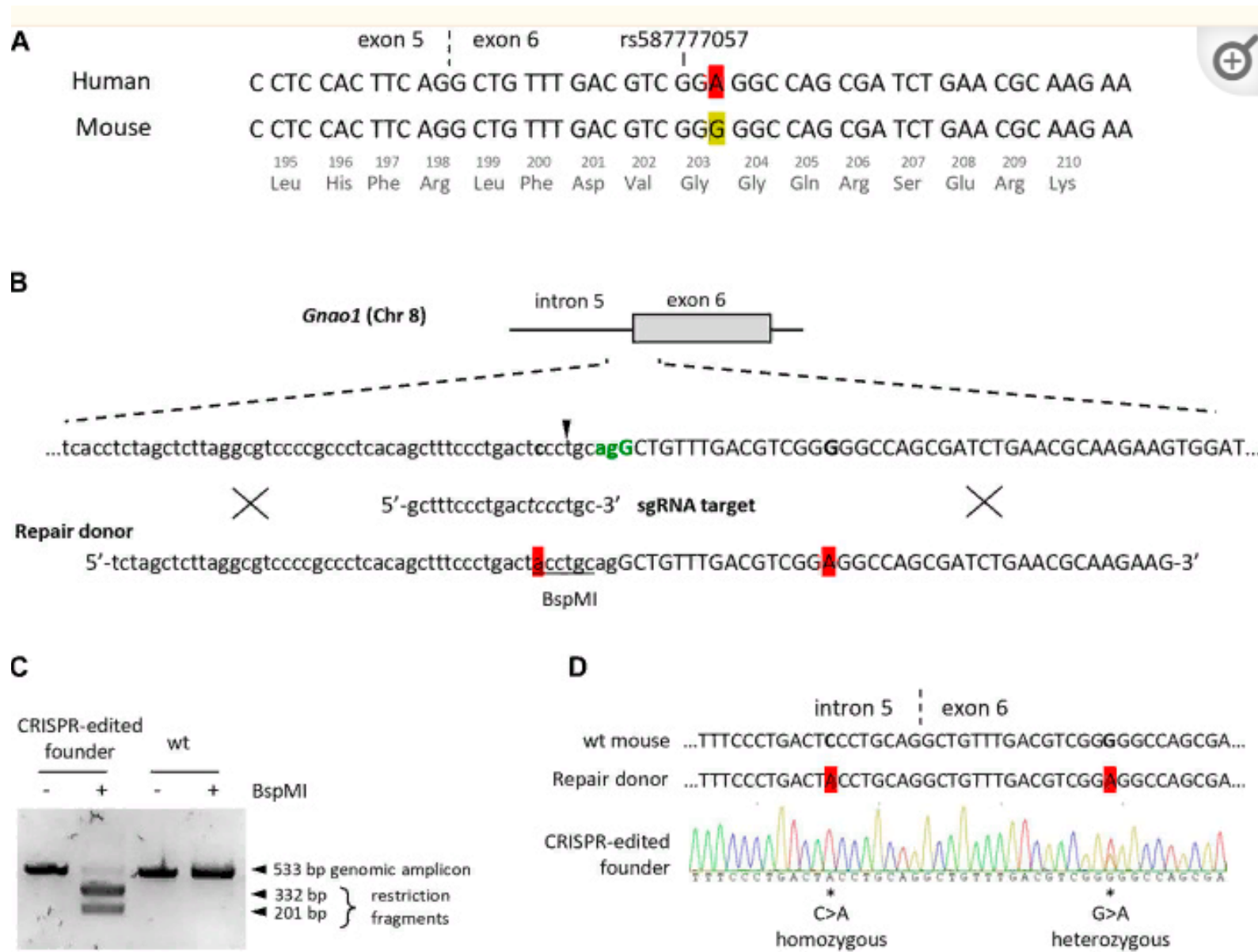
# Дистрофия Дюшенна

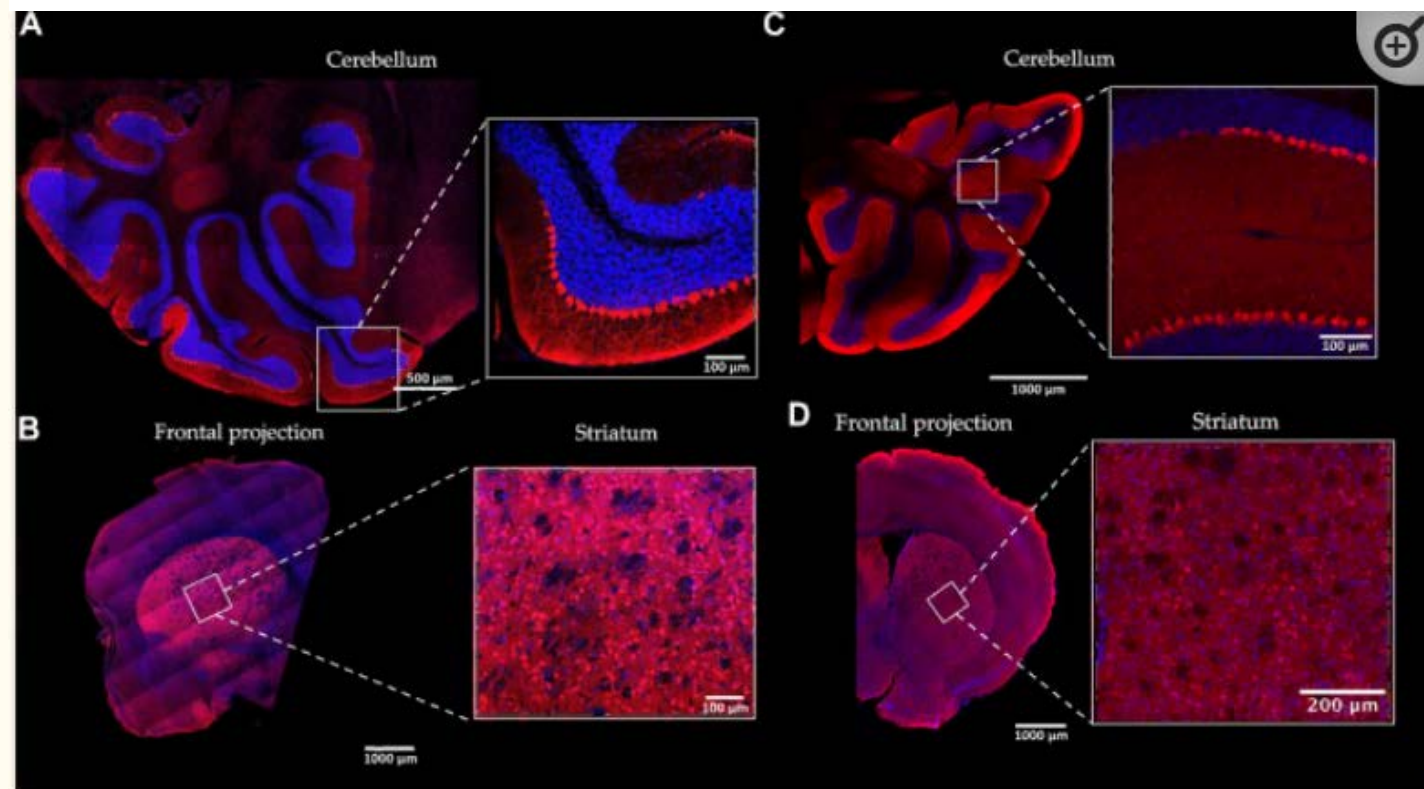
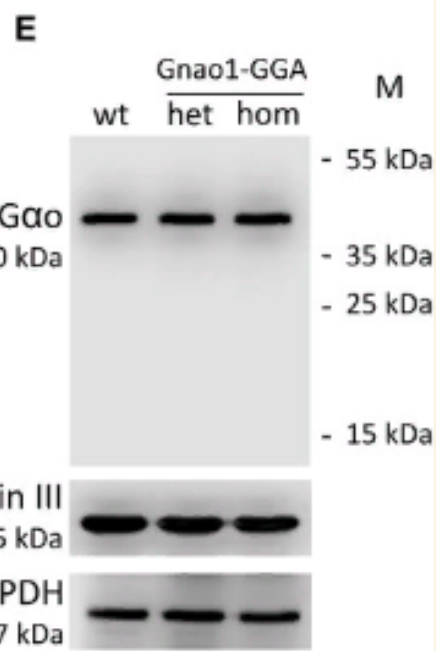
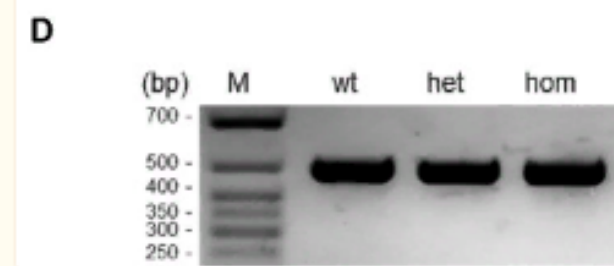
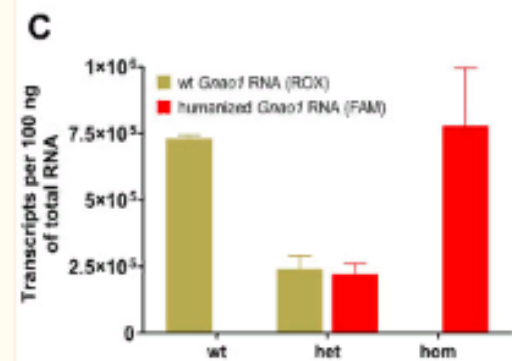
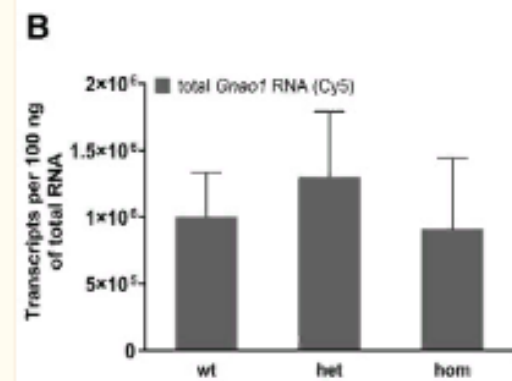
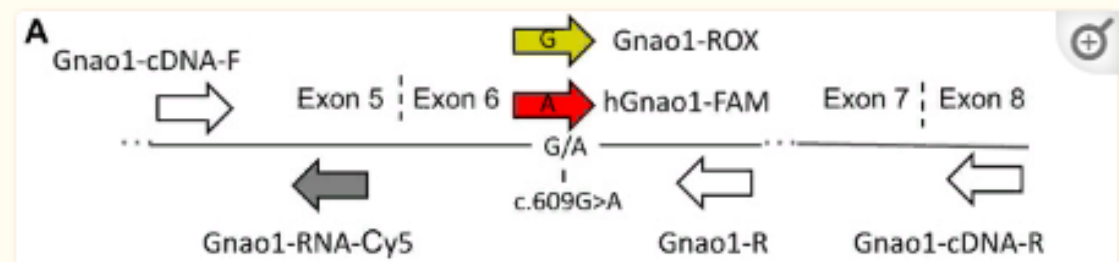


# Моделирование и генная терапия дистрофии Дюшенна



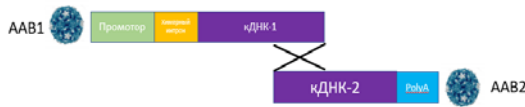
# Модель для тестирования генной терапии атипичной эпилепсии



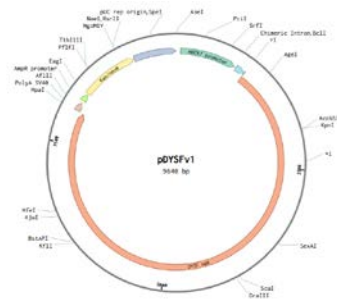
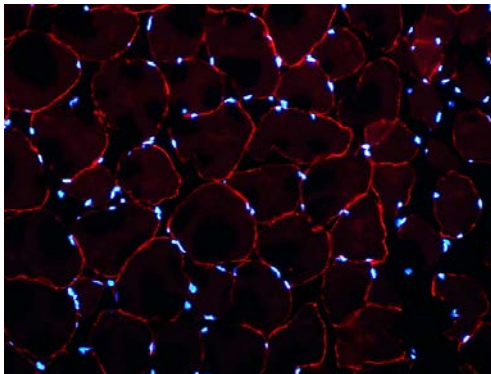


# Моделирование и генная терапия дистрофии Миоши

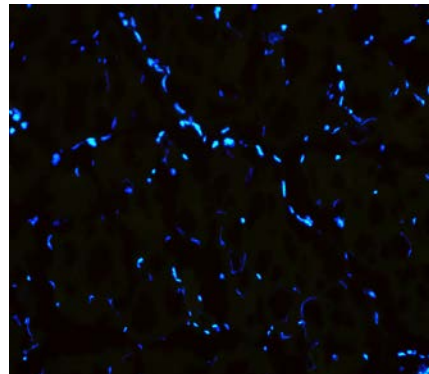
Произведена фармацевтическая разработка и фармацевтические исследования **2 новых препаратов** генной терапии дисферлинопатии (миопатии Миоши)



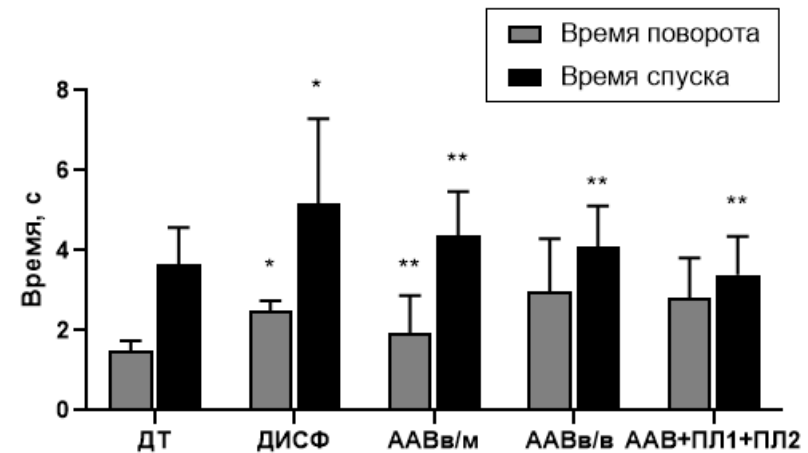
Препарат на основе аденоассоциированного вируса :  
Двухвекторная система: размер кДНК дисферлина превышает ёмкость ААВ, использованы 2 вектора, несущие 2 части кДНК с пересекающейся последовательностью



Препарат на основе плазмидной ДНК, несущей полноразмерный ген дисферлина под специфическим промотором



- Завершены исследования специфической активности (эффективности) ААВ9-ДИСФ-ДВ и ПЛ-ДИСФ
- Завершаются доклинические исследования токсикологической безопасности разработанных препаратов (острой и субхронической токсичности)
- Начато исследование иммунотоксичности препаратов ААВ9-ДИСФ-ДВ и ПЛ-ДИСФ



# Моделирование и генная терапия рестриктивной кардиомиопатии

