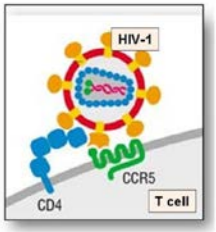
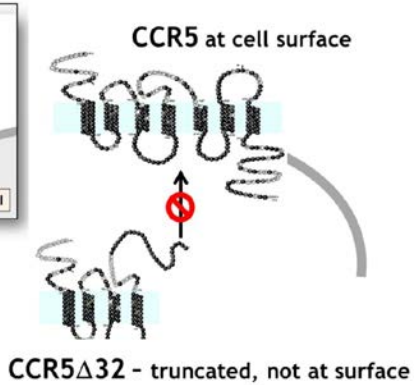
Редактирование гена CCR5 в гемопоэтических стволовых клетках с использованием CCR5-Uco-TALEN

Шакирова А.
Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П.Павлова Минздрава России

СИМПОЗИУМ «ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ»

19 Апреля, 2018
Санкт-Петербург





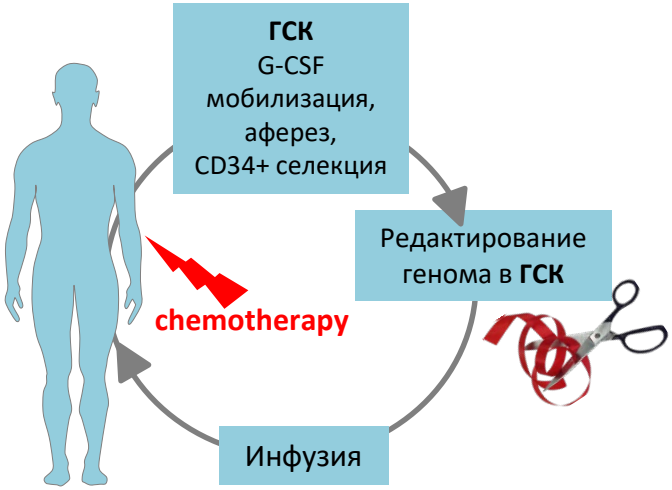
Опыт алло-ТГСК у пациентов с острыми лейкозами высокой группы риска и ВИЧ в Санкт-Петербурге

	пол	возраст	диагноз	статус заболевания	статус ВИЧ	АРВТ	Донор / CCR5	CR	РТПХ	Follow up	outcome
1	ж	50	ОМЛ	рецидив	PCR +	нет	MRD	RIC	нет	8 лет	жив
2	ж	29	ОЛЛ	ремиссия	PCR -	да	MUD wt/wt	RIC	нет	41 дет	умер ЦМВ инфекция
3	ж	26	ОЛ, смешанный фенотип	ремиссия	PCR -	да	MUD **del 32/wt**	RIC	да	5 лет	жив

B. Afanasyev , et al.
Saint-Petersburg experience of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia and human immunodeficiency virus // Cellular Therapy and Transplantation (CTT). Vol.4, No.1-2, 2015. doi: 10.18620/1866-8836-2015-4-1-2-24-30.

Искусственный “Берлинский пациент”

Нокаут CCR5 с помощью инженерных нуклеаз с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток с отредактированным геном CCR5

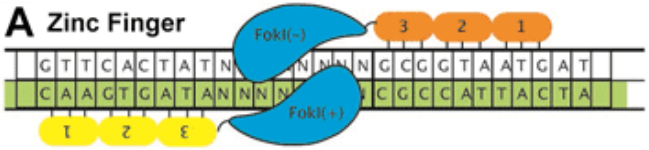


1. Zinc-finger-nucleases (ZFN)

nature biotechnology

Homology-driven genome editing in hematopoietic stem and progenitor cells using ZFN mRNA and AAV6 donors

9 ноября 2015



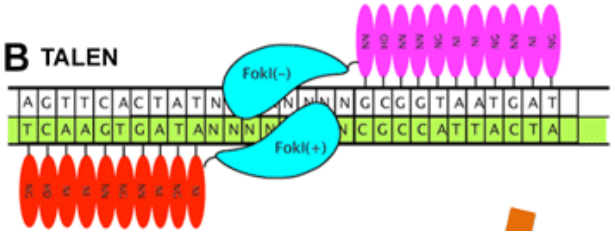
ClinicalTrials.gov
NCT02500849
Фаза I

2. TAL-effector nucleases (TALEN)

Science Translational Medicine AAAS

Efficient modification of *CCR5* in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template

30 сентября 2015



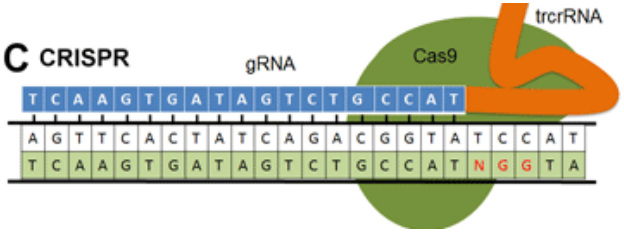
Преклинические исследования

3. CRISPR/Cas9

Cell Stem Cell

Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9

6 ноября 2014



ClinicalTrials.gov
NCT03164135
Фаза I

Addgene.com

Многолетнее сотрудничество двух Университетов и трансплантационных центров

Ведущие эксперты в области ТГСК, молекулярной биологии и клеточных технологий

Проф. Афанасьев Б.В., д.м.н.

Директор НИИ ДОГиТ им. Р.М.Горбачевой

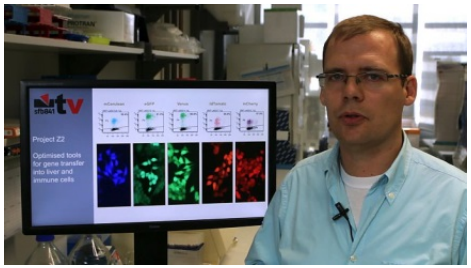
CIC 725
BMT team

Excellence in science EBMT European Group for Blood and Marrow Transplantation

Submitted: 13 April 2015, accepted 12 June 2015

Saint-Petersburg experience of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia and human immunodeficiency virus

Boris V. Afanasyev[1], Marina Popova[1], Sergey Bondarenko[1], Ilya Zyuzgin[2], Elena Babenko[1], Aleksander Alyanskiy[1], Susanne Morsch[3], Jan van Lunzen[4], Boris Fehse[5], Axel R. Zander[5], Ludmila S. Zubarovskaya[1]



Prof. Boris Feshe

Head of the Research Cell and Gene Therapy of the University Medical Center Hamburg

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Nucleic Acids Research

CIC 614
BMT team

Excellence in science EBMT European Group for Blood and Marrow Transplantation

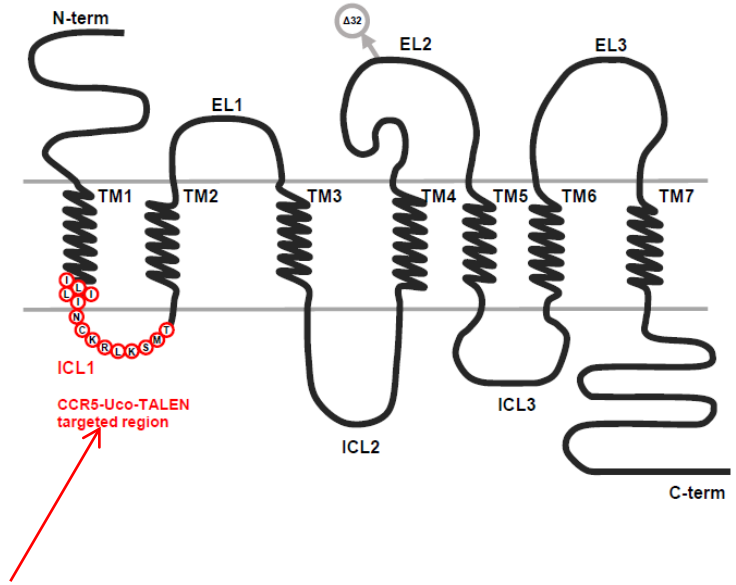
mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5

Ulrike Mock[1], Rafał Machowicz[1,2], Ilona Hauber[3], Stefan Horn[1], Pierre Abramowski[1], Belinda Berdien[1], Joachim Hauber[3,4] and Boris Fehse[1,*]

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Разработка и применение TAL-эффекторных нуклеаз для нокаута CCR5 в Т-лимфоцитах человека

CCR5



CCR5-Uco-TALEN

Left TALEN arm: CCR5-Uco-L

NH	HD	NG	NH	NH	NG	HD	NI	NG	HD	HD	NG	HD	NI	NG	HD	HD	NG	NN
G	C	T	G	G	T	C	A	T	C	C	T	C	A	T	C	C	T	G

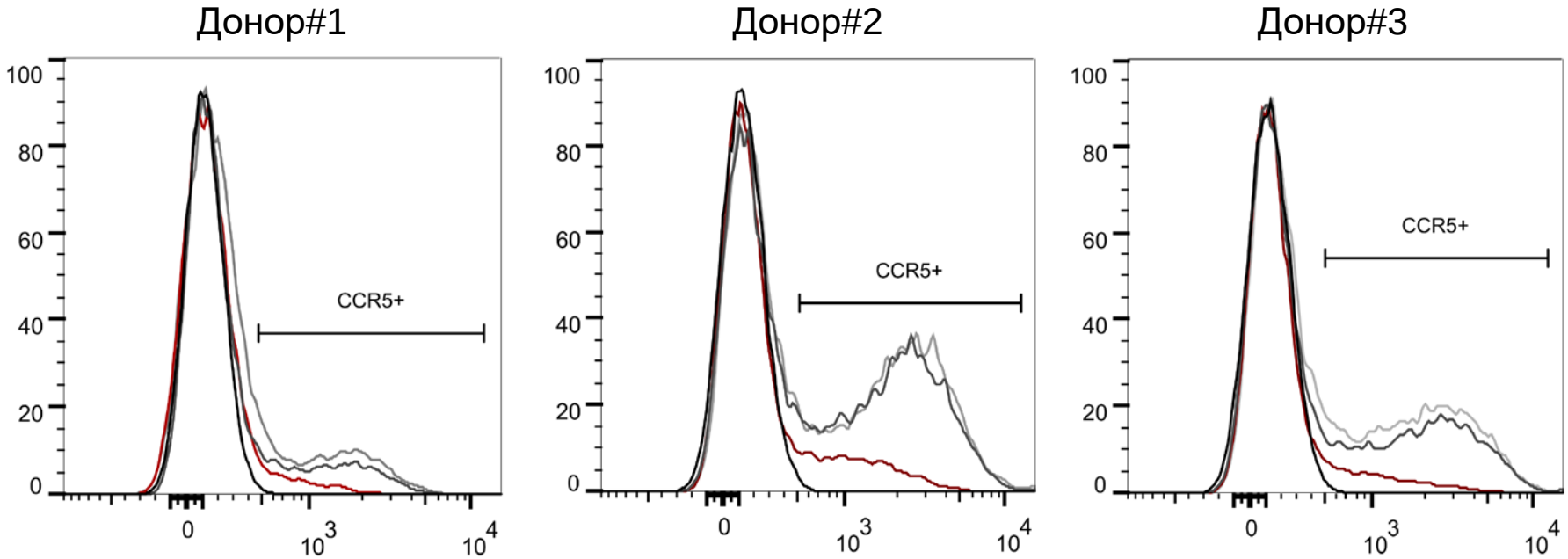
Right TALEN arm: CCR5-Uco-R

NI	NN	NI	NG	NN	NG	HD	NI	NH	NG	HD	NI	NG	NH	HD	NG	HD	NG	NG
A	G	A	T	G	T	C	A	G	T	C	A	T	G	C	T	C	T	T

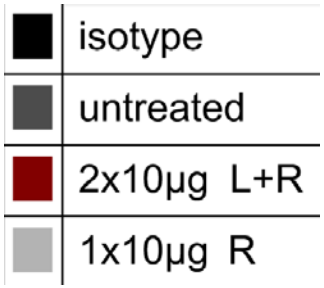
Mock et al. *Nucleic Acids Res* (2015)

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Нокаут CCR5 в первичных Т-клетках с помощью CCR5-Uco-TALEN



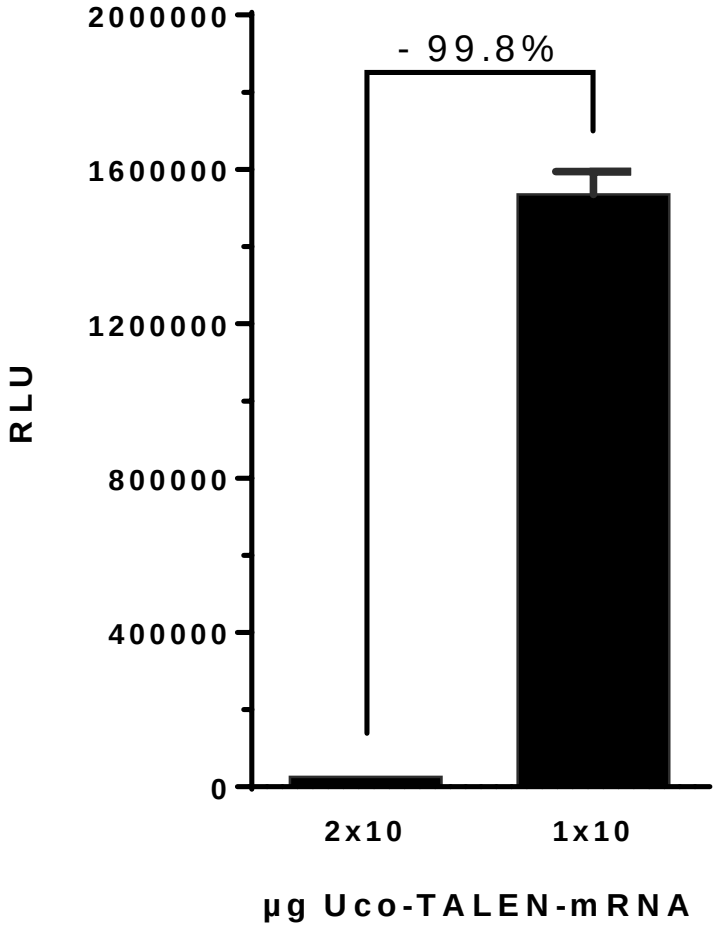
	% CCR5-позитивных клеток		
	#1	#2	#3
isotype	0.59	0.69	0.86
untreated	17	46.8	34.5
2x10µg CCR5-Uco-TALEN	6.28	18.1	11.3
1x10µg CCR5-Uco-TALEN	19.2	47.1	38.5
%CCR5 нокаута	**63%**	**63%**	**67%**

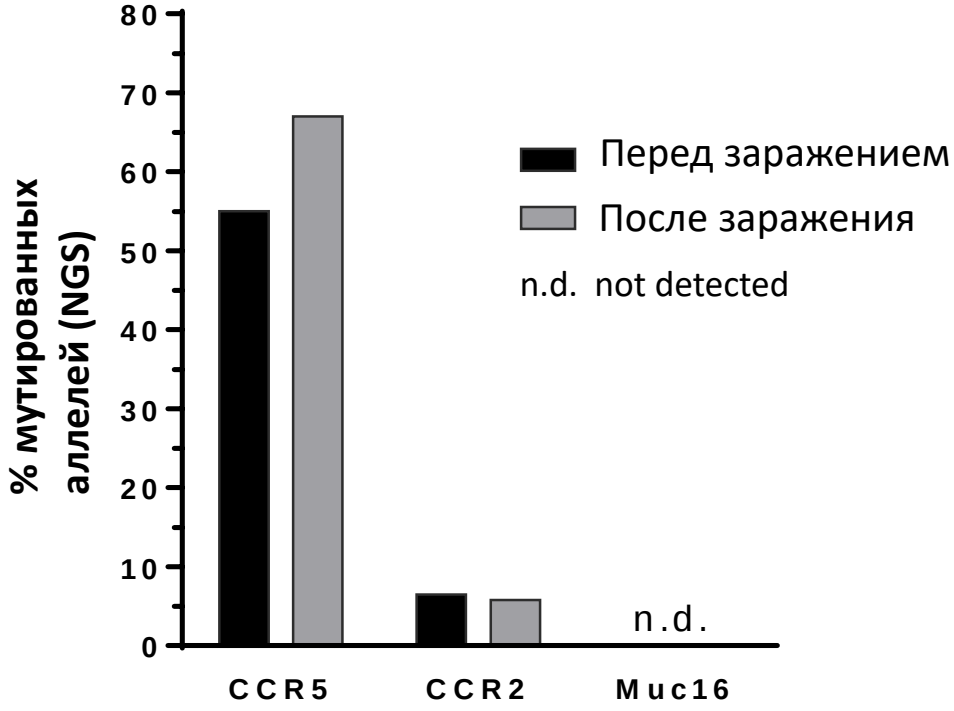


Mock et al. *Nucleic Acids Res* (2015)

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Заражение ВИЧ после нокаута CCR5 в Т-клетках человека



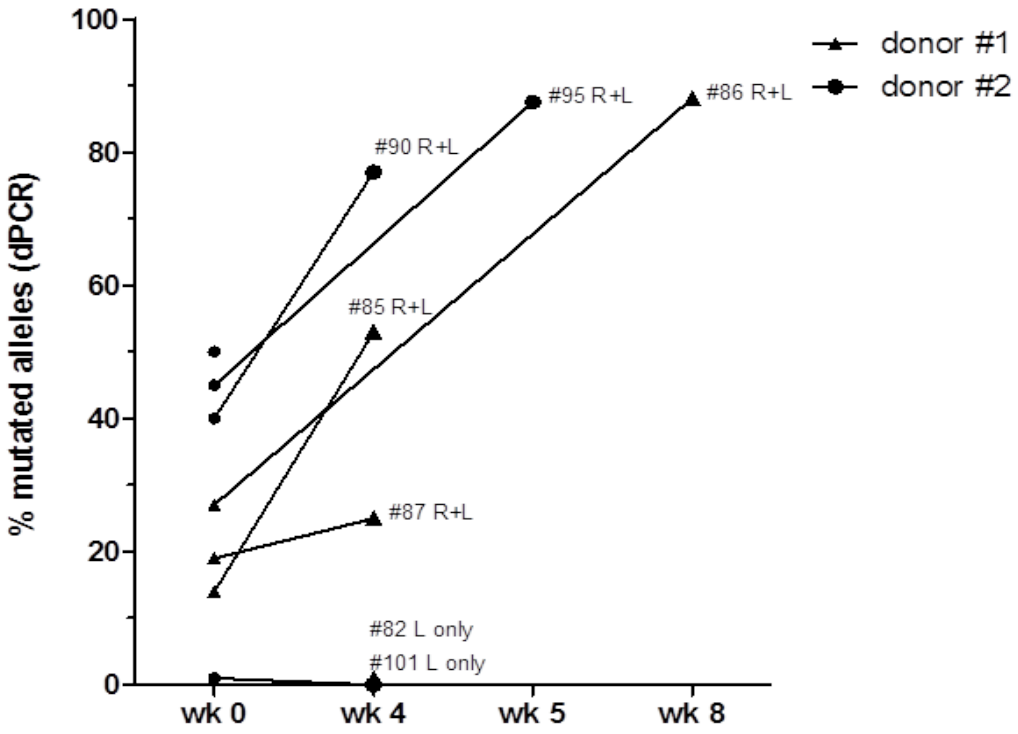


12 days incubation

Mock et al. *Nucleic Acids Res* (2015)

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Селективное преимущество отредактированных Т-клеток in-vivo

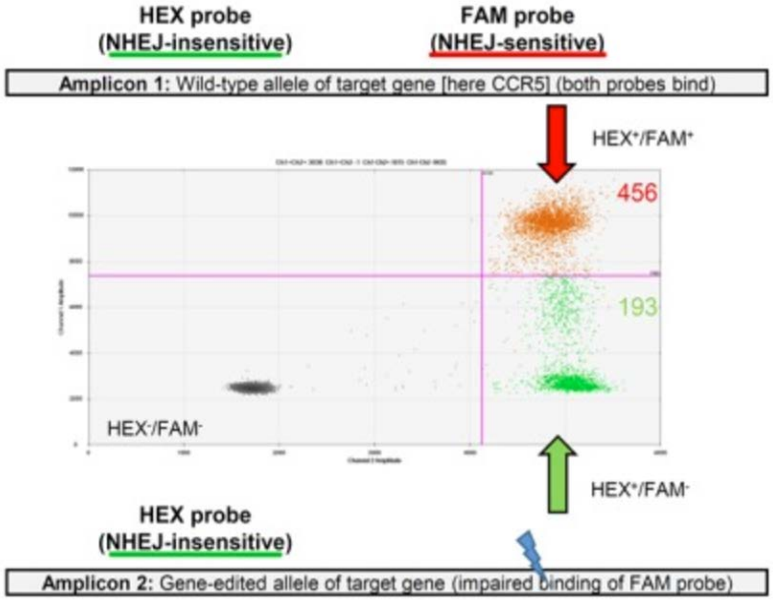


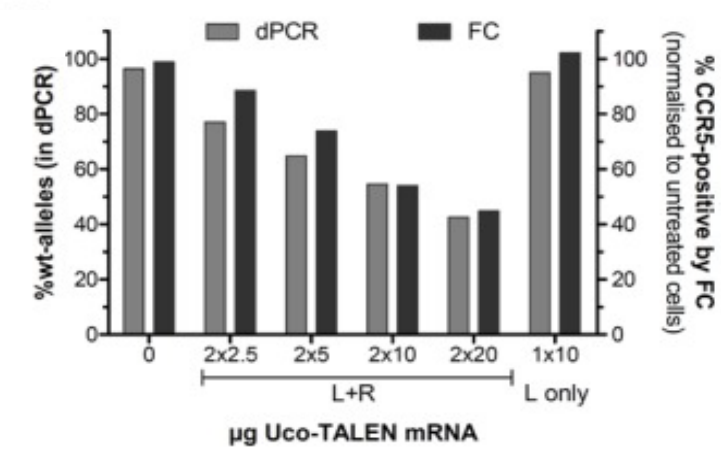
Селекция отредактированных Т-клеток человека после заражения ВИЧ в периферической крови у 4 из 5 гуманизированных мышей

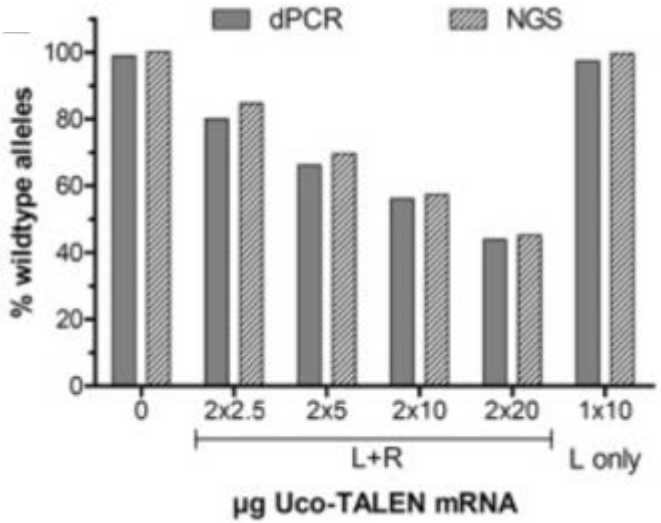
Mock et al., 2016

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Цифровая капельная ПЦР для детекции мутаций, вызванных NHEJ, в первичных Т-клетках





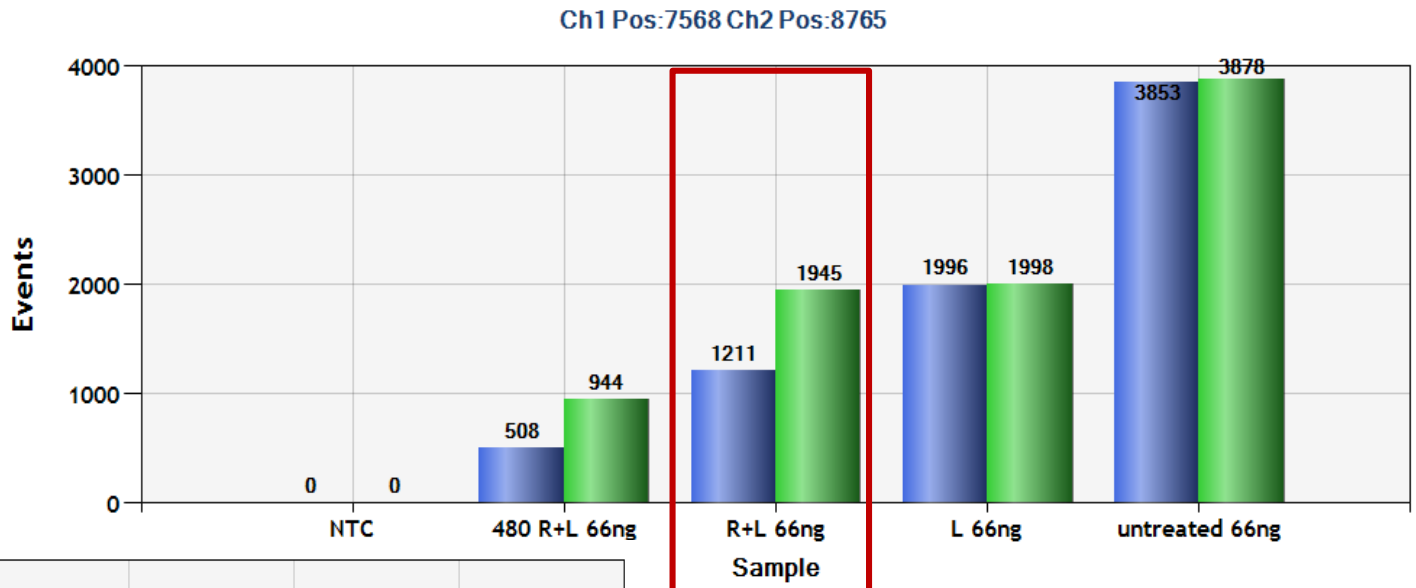


Mock et al. *Nucleic Acids Res* (2015)

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

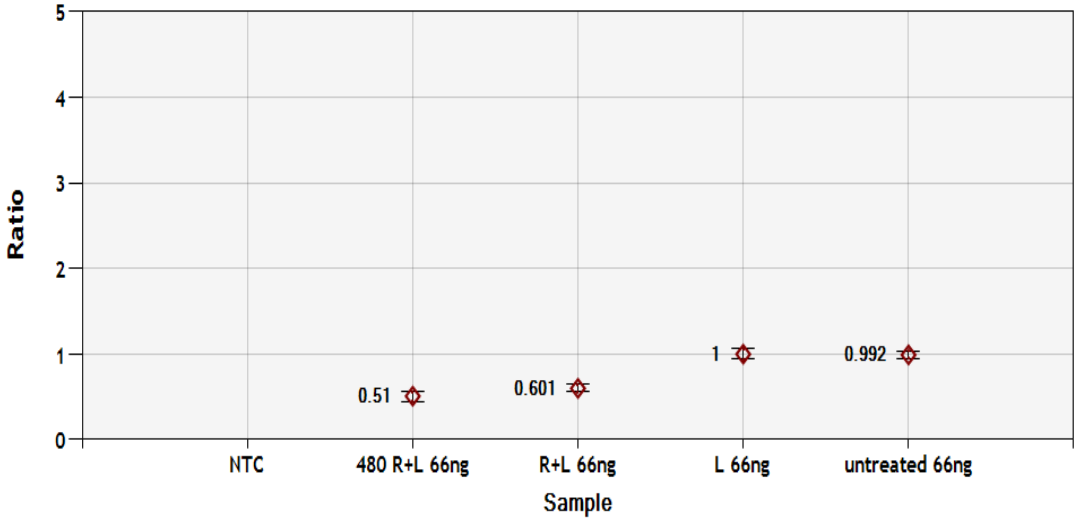
Нокаут CCR5 в первичных CD34+ клетках с помощью CCR5-Uco-TALEN

ddPCR



38%

Эффективность редактирования гена CCR5



Цель

Оптимизация протокола нокаута CCR5 в гемопоэтических стволовых клетках с помощью CCR5-Uco-TALEN

1. Выбор протокола трансфекции с наибольшими показателями выживаемости клеток и наименьшей токсичностью доставляемой мРНК TALEN

2. Оптимизация целевой специфичности CCR5-Uco-TALEN и оценка количества моно- и биаллельных модификаций CCR5

3. Оценка безопасности CCR5-Uco-TALEN : CCR2 off-target, токсичность и влияние на функциональные свойства гемопоэтических стволовых клеток

Дизайн эксперимента

Ин-витро транскрипция с плазмидной ДНК

→

MACS селекция CD34+ клеток

Активация в коктейле цитокинов 24 часа

→

Электропорация мРНК с использованием Bio-RAD XcellTM системы

Инкубация при 32°C в течение 24 h

→

Анализ

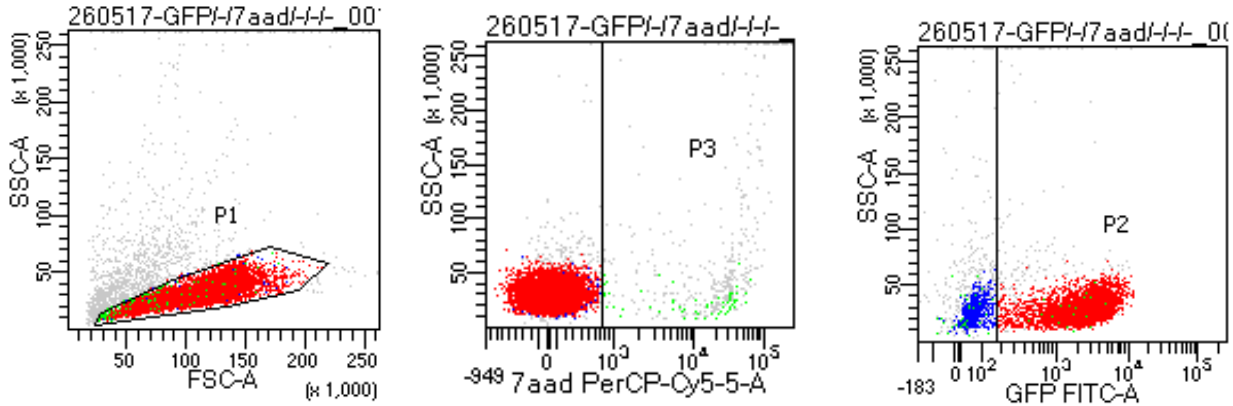
- Выживаемость клеток
- Эффективность трансфекции
- Функциональные свойства отредактированных ГСК
- Целевая и нецелевая эффективность редактирования
- Биаллельные модификации

Методы анализа

Выживаемость клеток	Окрашивание Annexin V/7AAD
Эффективность трансфекции	Измерение количества eGFP-позитивных клеток
Функциональные свойства отредактированных ГСК	Колониеобразование в метилцеллюлозе
Целевая и нецелевая эффективность редактирования	ddPCR
Биаллельные модификации	ddPCR с ДНК колоний

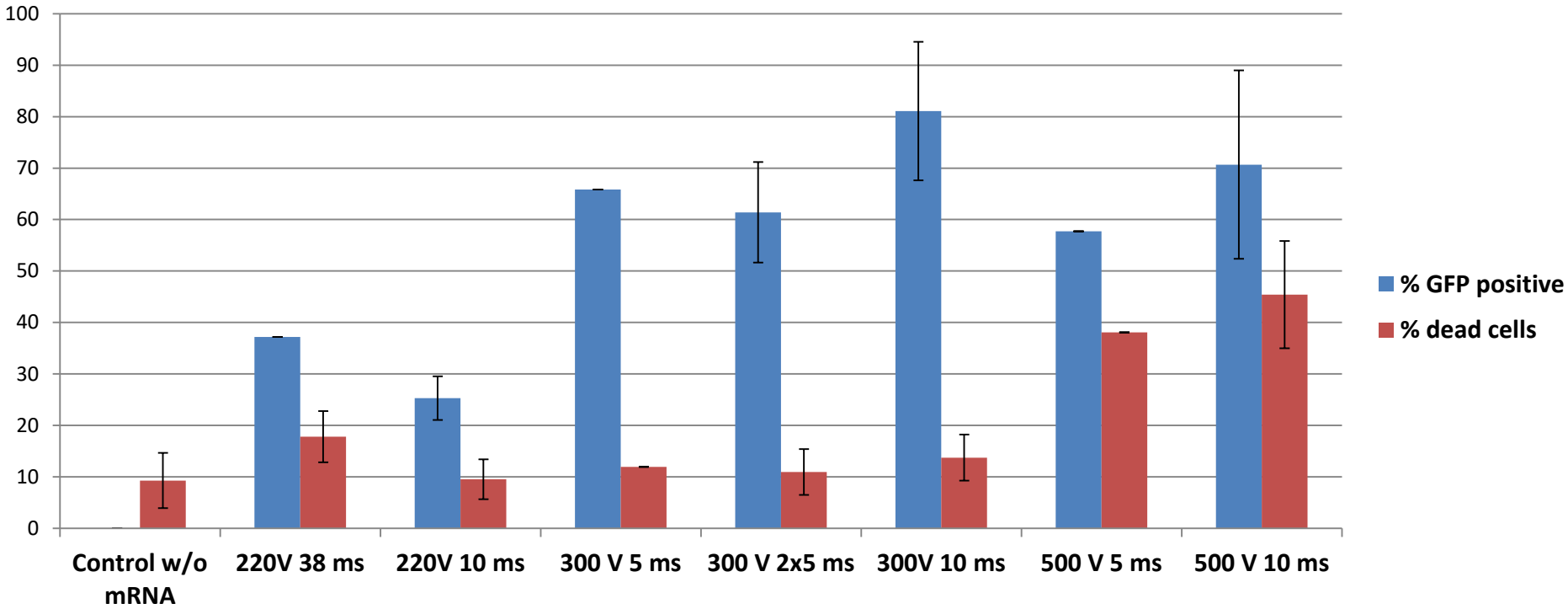
Эффективность трансфекции CD34+ клеток
*измерение eGFP после 24h при 32°C

Bio-Rad XCell



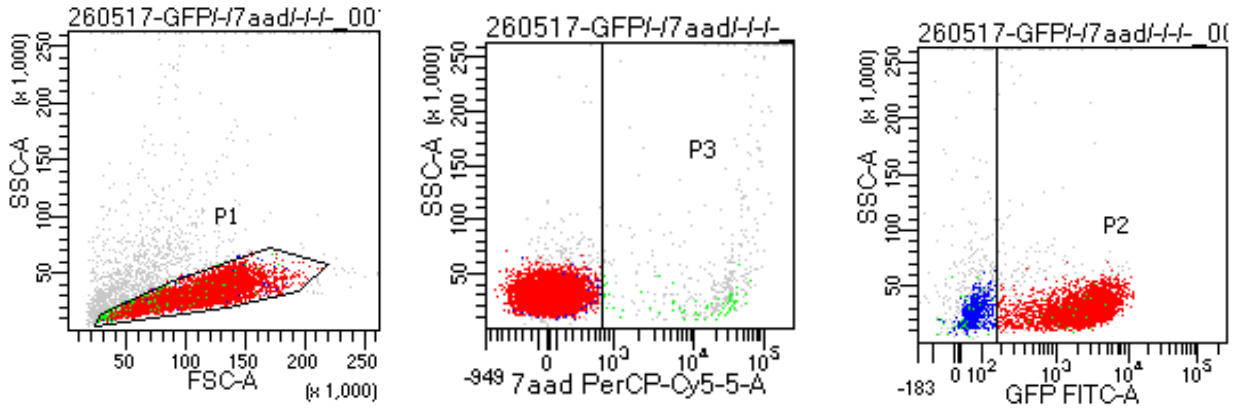
Tube: GFP/-/7aad/-/-/-_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	21,449	####	100.0
P1	19,031	88.7	88.7
P2	16,347	85.9	76.2
P3	243	1.3	1.1



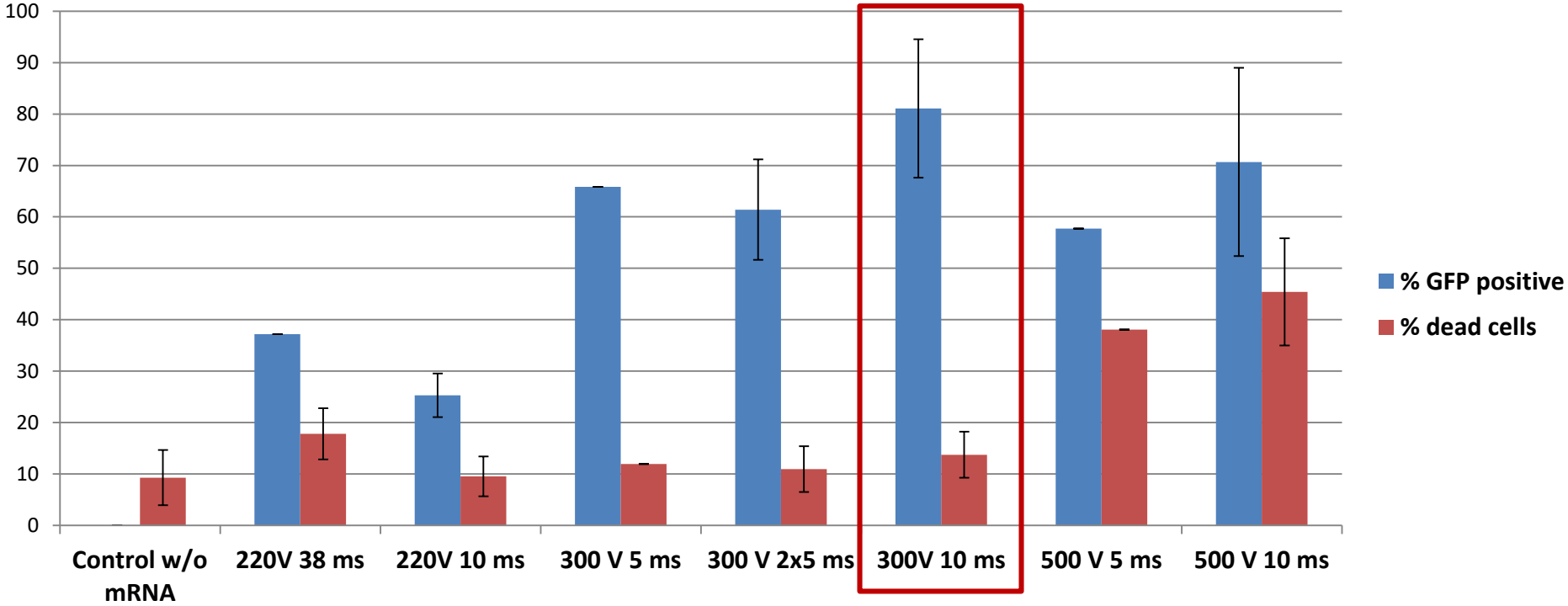
Эффективность трансфекции CD34+ клеток
*измерение eGFP после 24h при 32°C

Bio-Rad XCell



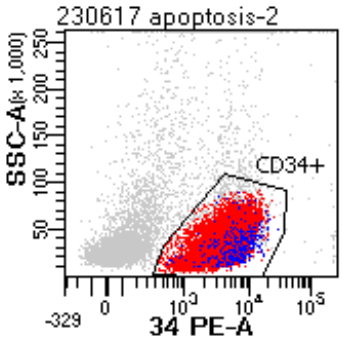
Tube: GFP/-/7aad/-/-/-_001

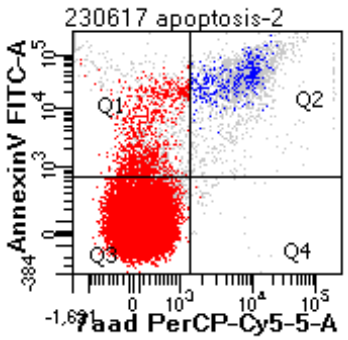
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	21,449	####	100.0
P1	19,031	88.7	88.7
P2	16,347	85.9	76.2
P3	243	1.3	1.1



Количество апоптотических событий в зависимости от концентрации мРНК

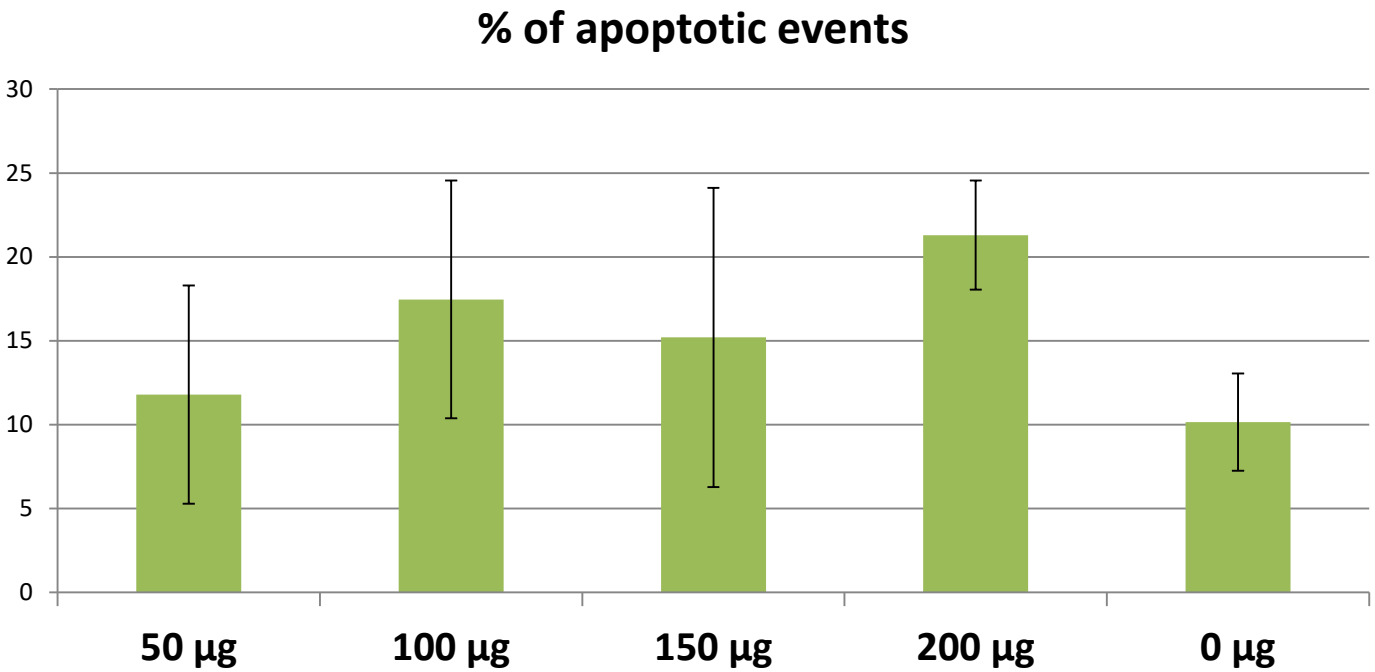
Окрашивание Annexin V/CD34/7AAD staining





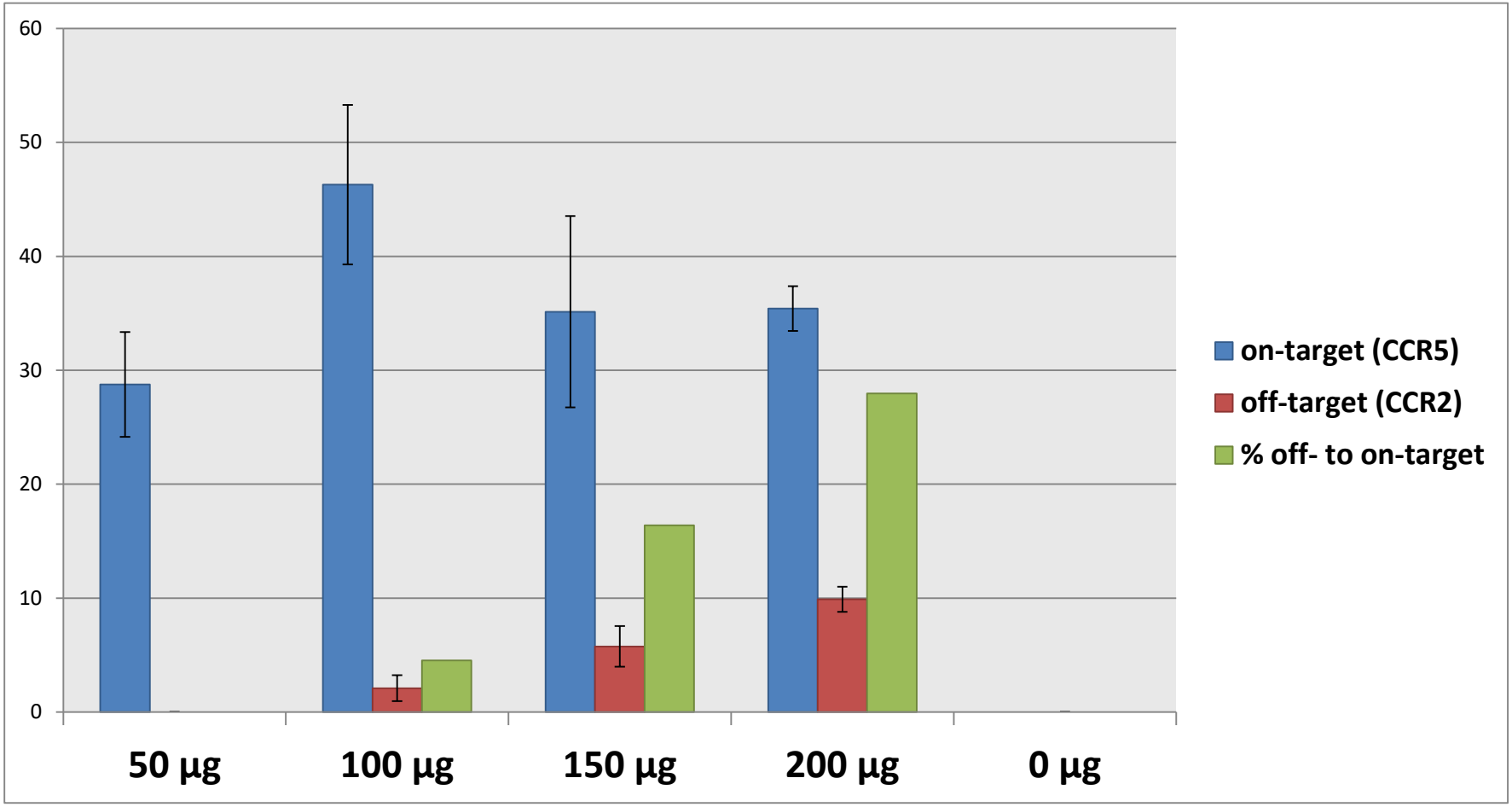
Tube: 2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	31,733	####	100.0
P1	25,527	80.4	80.4
CD34+	25,314	99.2	79.8
Q1	990	3.9	3.1
Q2	334	1.3	1.1
Q3	23,988	94.8	75.6
Q4	2	0.0	0.0



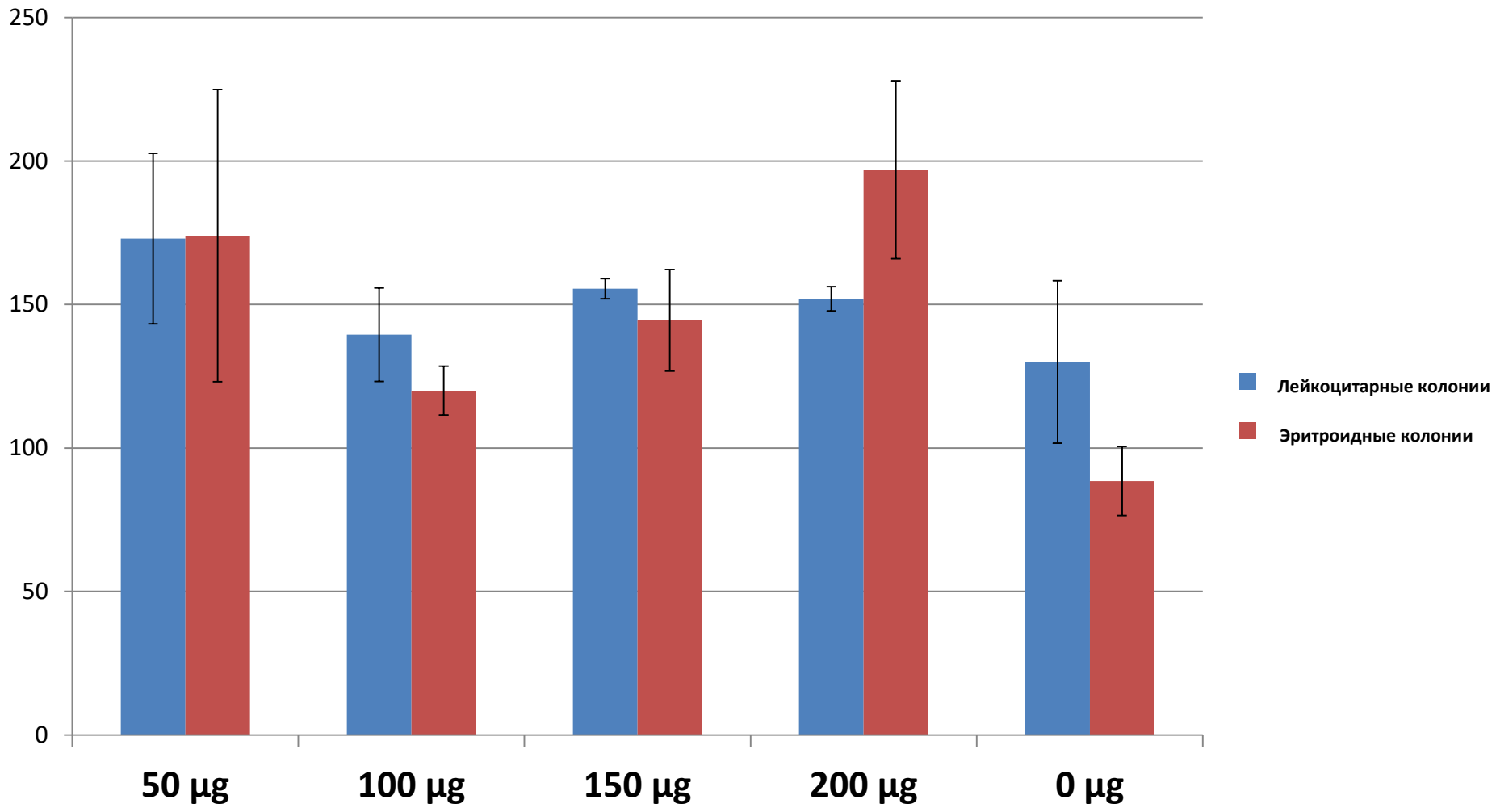
Эффективность редактирования CCR5 и доля нецелевого редактирования CCR2 в зависимости от концентрации мРНК CCR5-Uco-TALEN

Результаты ddPCR



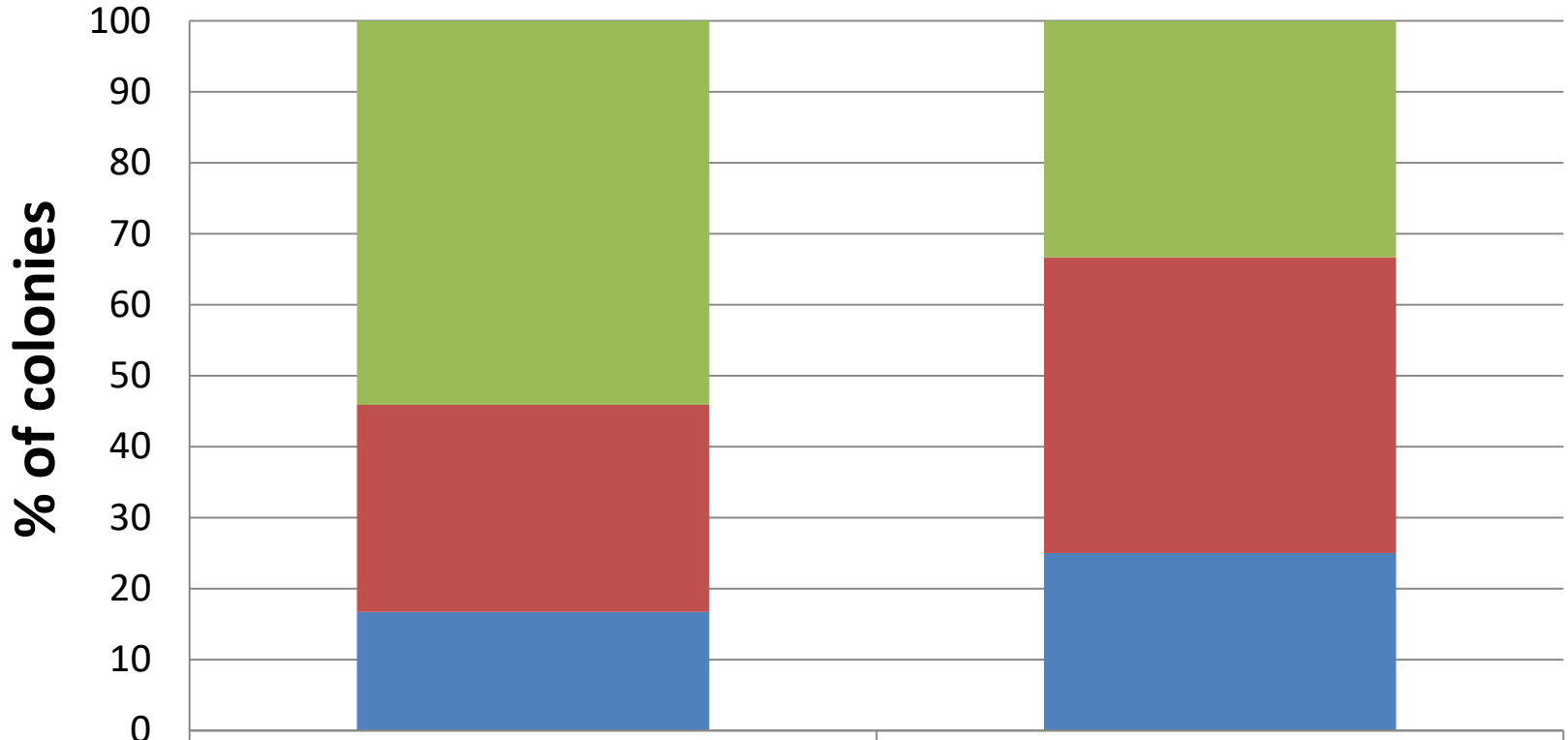
Функциональные свойства отредактированных ГСК

Колониеобразование в метилцеллюлозе



Отношение моно- и биаллельных модификаций в зависимости от концентрации мРНК

ddPCR ДНК колоний



	100 mkg/ml, %	200 mkg/ml, %
no editing	54,2	33,3
monoallelic	29,2	41,7
biallelic	16,7	25

Выводы

- Эффективность редактирования CCR5 в гемопоэтических стволовых клетках была обогащена до 46±7%
- Частота внецелевой активности CCR5-Uco-TALEN была прямо ассоциирована с концентрацией мРНК [0% - 10%]
- Процедура нокаута CCR5 с помощью CCR5-Uco-TALEN не влияла на выживаемость и функциональные свойства ГСК
- Был отработан оптимальный протокол редактирования гена CCR5 в ГСК, а так же определены предпочтительные концентрации мРНК для дальнейших преклинических исследований

Благодарность

CIC725
Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П.Павлова Минздрава России

Research Department Cell and Gene Therapy, Department of Stem Cell Transplantation,
University Medical Center Hamburg-Eppendorf

Особая благодарность
Проф. Афанасьеву Б.В.
Prof. Boris Fehse
Prof. Gerard Wagemaker

Участники программы ВИЧ и редактирование генома
Ильдар Бархатов
Владислав Сергеев
Кирилл Лепик
Альберт Муслимов
Оксана Айзсилниекс
Александр Ткаченко
Наталья Михайлова
Анастасия Некрасова
Марина Попова

Работа поддержана фундаментальным грантом Сколково

Comparative analysis of different systems for the CCR5 gene editing in HSC

	Transfection conditions	On-target CCR5, %	Method	Biallelic editing, %	Off-target, %	Method	% off- to on-target	reference
ZFN SB-728-T	**mRNA, Electroporation concentration 50-150 mkg/ml**	40-60%	NGS+Cel1 assay	39-72%	20-30%	NGS	43	DiGiusto et al., 2016
Crispr/Cas9, dual gRNA	**Plazmid DNA, Electroporati on**	42%	NGS	26,8±7,1%	0,88%	NGS	2,1	Mandal et al., 2014
Crispr/Cas9, dual gRNA	**Plazmid DNA, Electroporation 100 mkg/ml Cas9 + 50mkg/ml gRNA**	27±5,4% 45%	T7EI assay Colonies sequencing	44%	0%	NGS, K562 cells	0	Xu et al., 2016
CCR5-Uco-TALEN	**mRNA, Electroporation concentration 50-200 mkg/ml**	46±7%	ddPCR	16-25%	0-10%	ddPCR	11,3	CIC 725 unpublished data, 2017