

Этика геномного редактирования

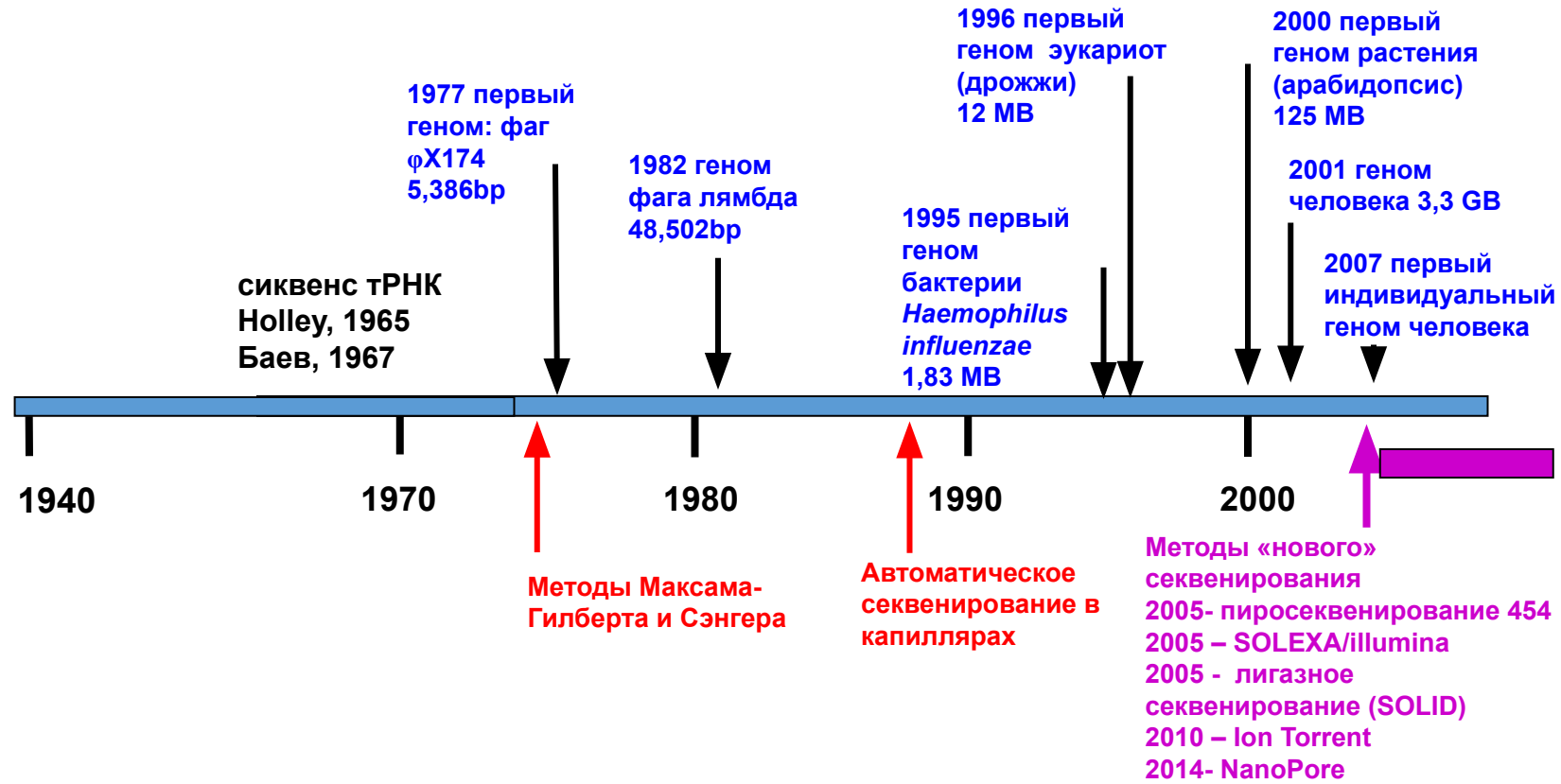
Прохорчук Егор

prokhortchouk@gmail.com

<https://t.me/prokhortchouk>

Читатели, редакторы и писатели

«Old» DNA sequencing: milestones



Читатели, редакторы и писатели

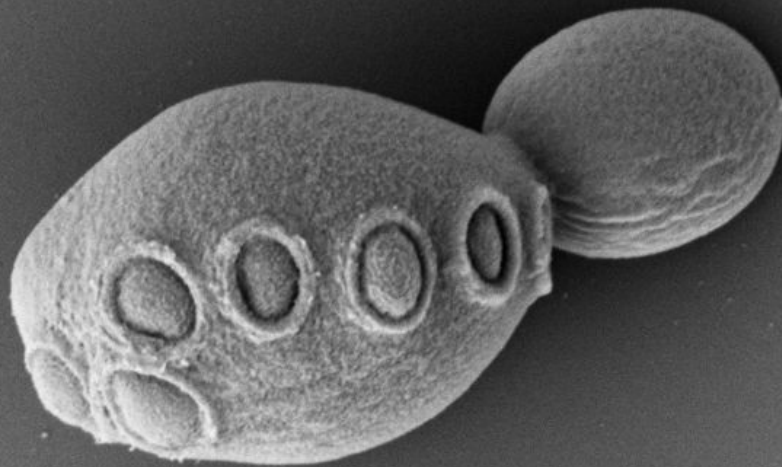
ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1192-5>

Synthetic yeast project unveils cells with 50% artificial DNA

Designer chromosomes enable new studies of genome organization and evolution

8 NOV 2023 · 11:00 AM ET · BY MITCH LESLIE



Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome

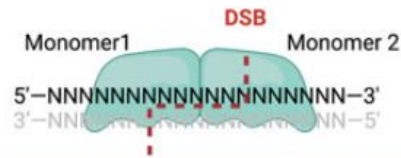
Julius Fredens^{1,4}, Kaihang Wang^{1,2,4}, Daniel de la Torre^{1,4}, Louise F. H. Funke^{1,4}, Wesley E. Robertson^{1,4}, Yonka Christova¹, Tionsun Chia¹, Wolfgang H. Schmied¹, Daniel L. Dunkelmann¹, Václav Beránek¹, Chayasith Uttamapinant^{1,3}, Andres Gonzalez Llamazares¹, Thomas S. Elliott¹ & Jason W. Chin^{1*}

Читатели, редакторы и писатели

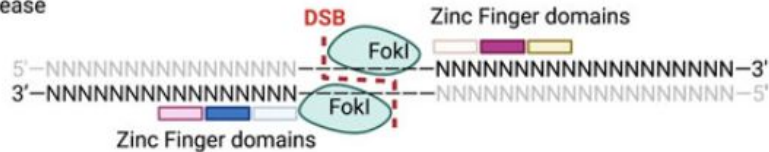
Инструменты редактирования генома – инструмент изменения генетического кода организма в целевом участке генома

Создающие двуцепочечные разрывы ДНК

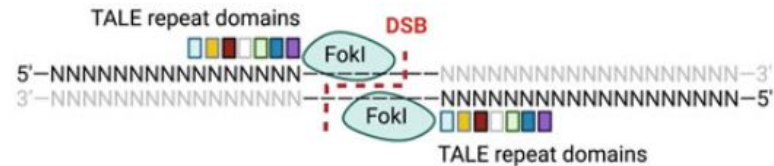
Meganuclease



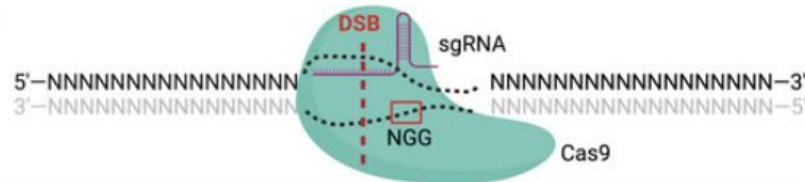
Zing finger nuclease



TALEN

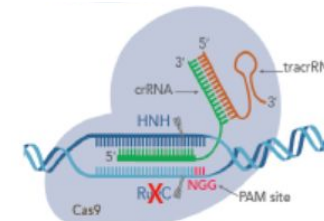


CRISPR-Cas9

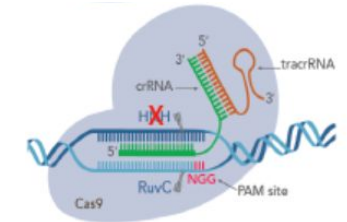


Не создающие двуцепочечные разрывы ДНК

Nickases

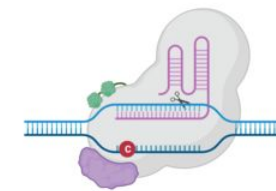


Cas9 D10A nickase
Inactivated RuvC domain
Cleaves target strand

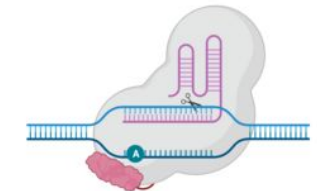


Cas9 H840A nickase
Inactivated HNH domain
Cleaves non-target strand

Base editors

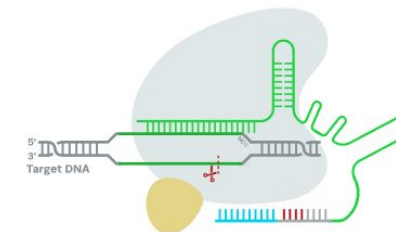


CBE



ABE

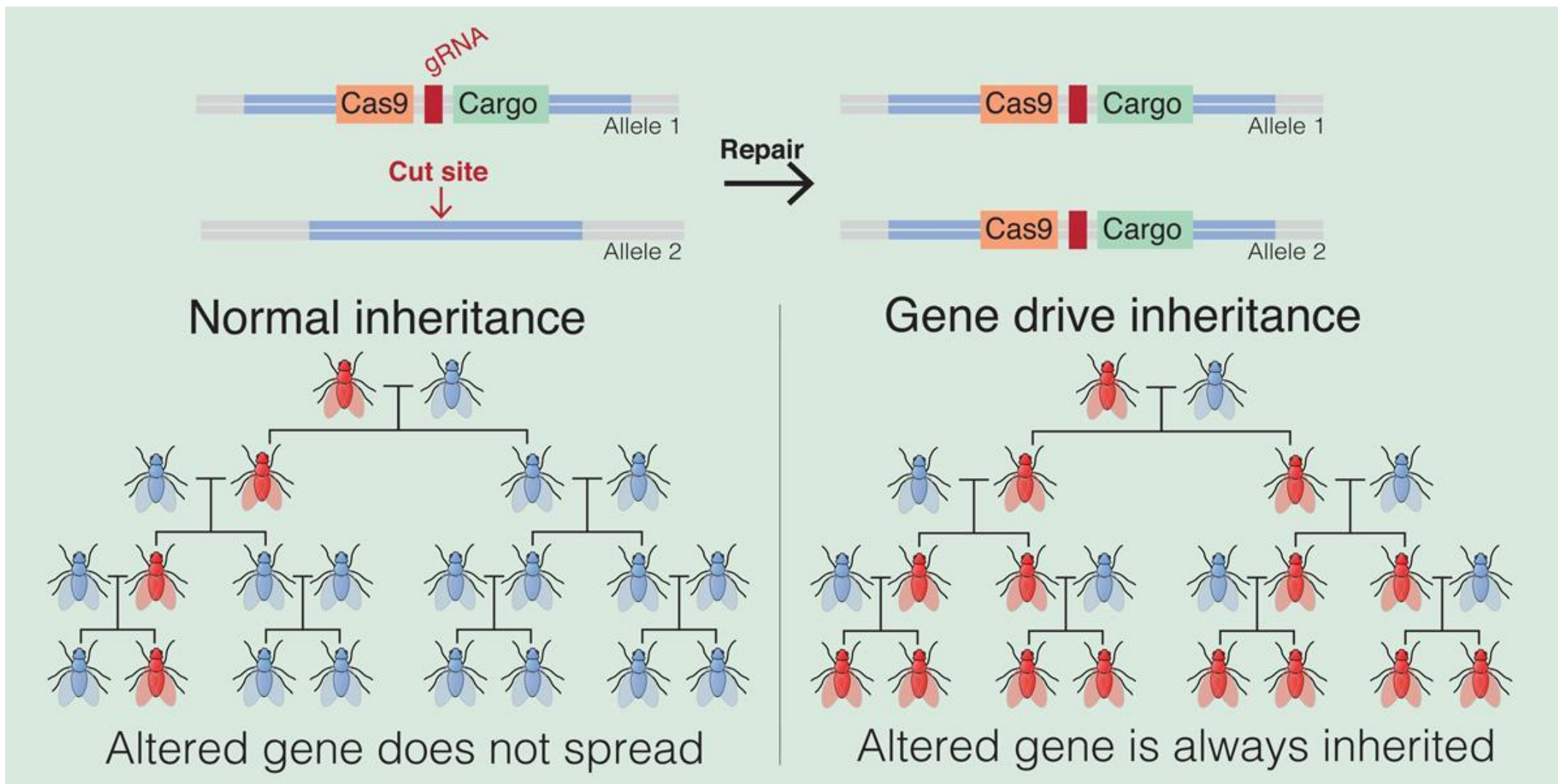
Prime editors



Что редактировать?

- Зиготу
- Соматические клетки
- Популяции

Уничтожаем комаров



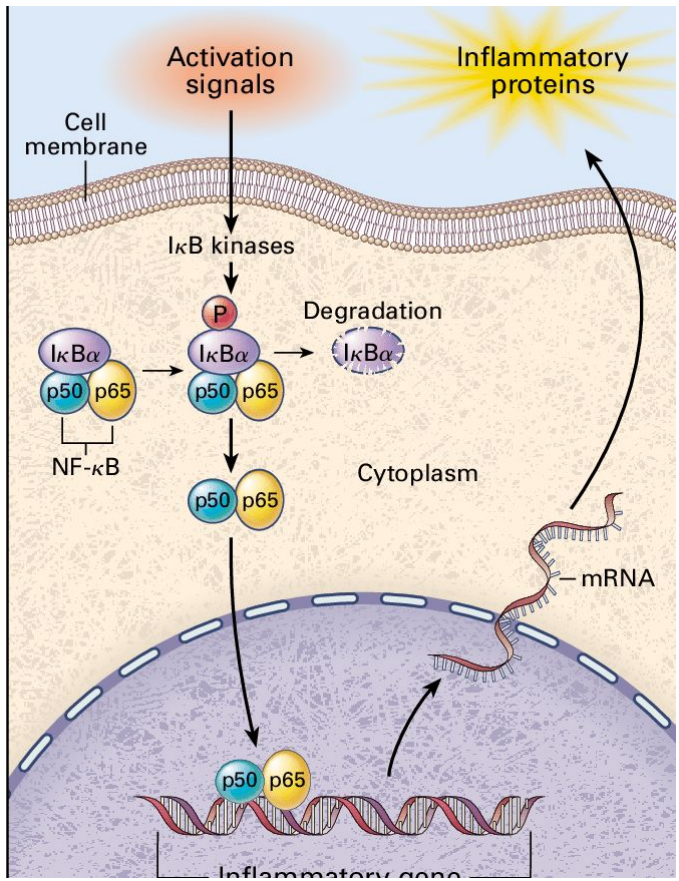
СОЗДАЕМ ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

- Моделирование моногенных заболеваний человека у лабораторных животных
- Создание животных, устойчивых к вирусам/бактериям

АЧС Африканская чума свиней



CRISP edit IκB

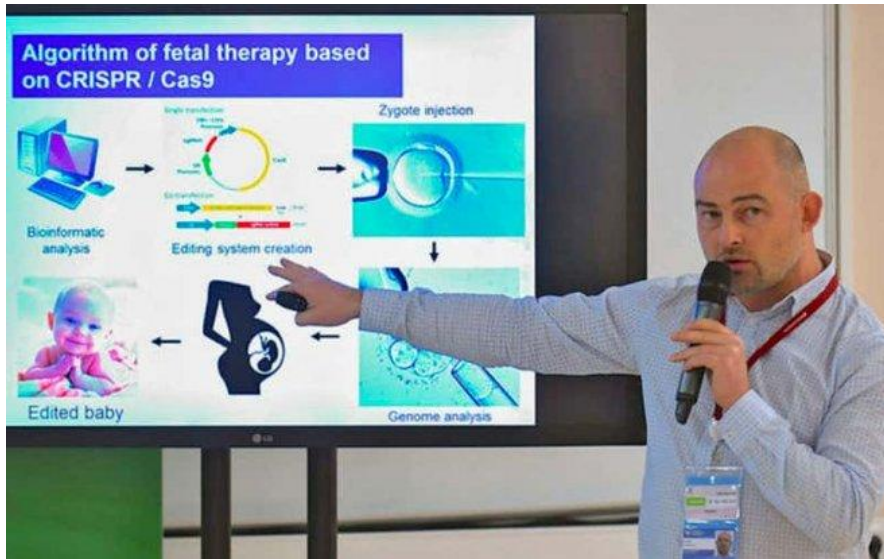
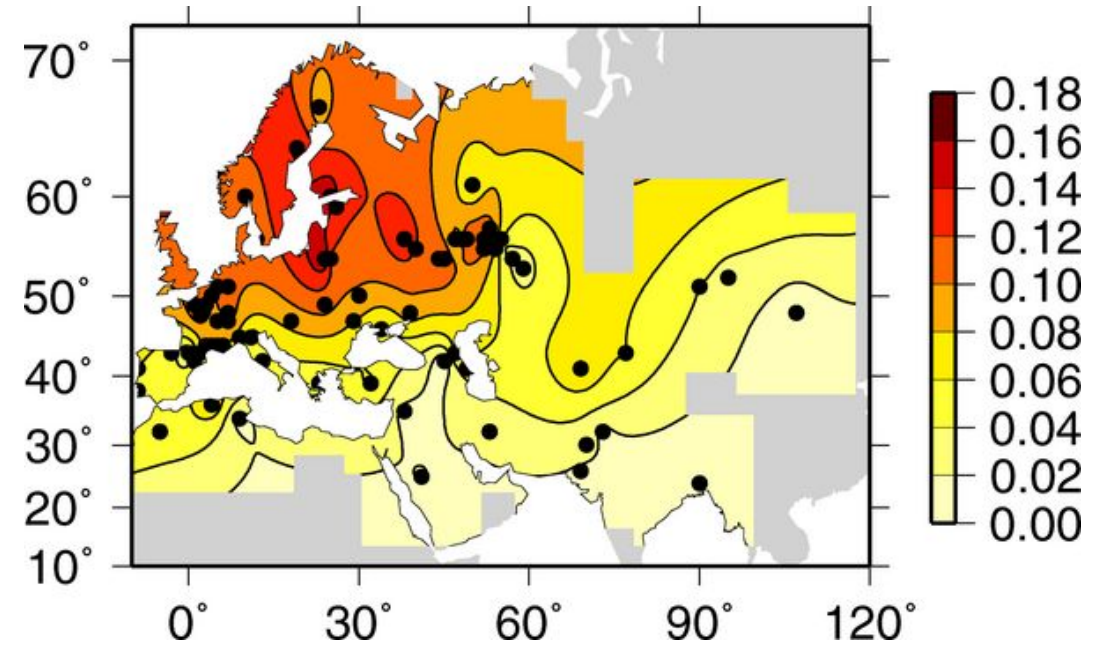


Человека нельзя

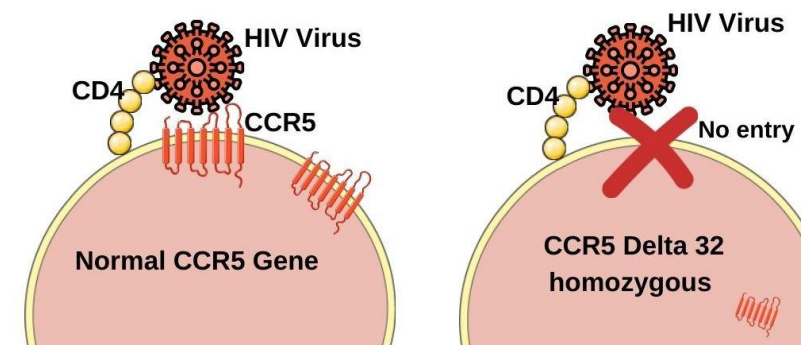


He Jiankui

РЕДАКТИРУЕМ ЗИГОТЫ



Денис Ребриков



ETHAN
HAWKE

UMA
THURMAN

JUDE
LAW



GATTACA

There is no gene for the human spirit

Allele counting to test for association between SNP
genotype and case / control status

	GG	GT	TT	Total
Cases	r_0	r_1	r_2	R
Controls	s_0	s_1	s_2	S
Total	n_0	n_1	n_2	N

Observed allele counts

	G	T	Total
Cases	$2r_0+r_1$	r_1+2r_2	$2R$
Controls	$2s_0+s_1$	s_1+2s_2	$2S$
Total	$2n_0+n_1$	n_1+2n_2	$2N$

Allele counting to test for association between SNP genotype and case / control status

	GG	GT	TT	Total
Cases	r_0	r_1	r_2	R
Controls	s_0	s_1	s_2	S
Total	n_0	n_1	n_2	N

Observed allele counts

	G	T	Total
Cases	$2r_0+r_1$	r_1+2r_2	$2R$
Controls	$2s_0+s_1$	s_1+2s_2	$2S$
Total	$2n_0+n_1$	n_1+2n_2	$2N$

Expected allele counts

	G	T
	$2R(2n_0+n_1)/(2N)$	$2R(n_1+2n_2)/(2N)$
	$2S(2n_0+n_1)/(2N)$	$2S(n_1+2n_2)/(2N)$

Allele counting to test for association between SNP genotype and case / control status

	GG	GT	TT	Total
Cases	r_0	r_1	r_2	R
Controls	s_0	s_1	s_2	S
Total	n_0	n_1	n_2	N

	Observed allele counts			Expected allele counts	
	G	T	Total	G	T
Cases	$2r_0+r_1$	r_1+2r_2	$2R$	$2R(2n_0+n_1)/(2N)$	$2R(n_1+2n_2)/(2N)$
Controls	$2s_0+s_1$	s_1+2s_2	$2S$	$2S(2n_0+n_1)/(2N)$	$2S(n_1+2n_2)/(2N)$
Total	$2n_0+n_1$	n_1+2n_2	$2N$		

Chi-square test for independence of rows and columns (null hypothesis):

$$\sum \frac{(\text{Obs} - \text{Exp})^2}{\text{Exp}} \sim \chi^2 \text{ with 1 df}$$

PLINK `--assoc` option Other options (e.g. dominant/recessive models)
--model

$$p_n := p(\phi_n = 1 \mid \mathbf{x}_n, \boldsymbol{\beta}) = \frac{1}{1 + \exp(-\boldsymbol{\beta}^\top \mathbf{x}_n)}. \quad (1)$$

which can be transformed to

$$\log \frac{p(\phi_n = 1 \mid \mathbf{x}_n, \boldsymbol{\beta})}{p(\phi_n = 0 \mid \mathbf{x}_n, \boldsymbol{\beta})} = \boldsymbol{\beta}^\top \mathbf{x}_n, \quad (2)$$

The minor allele count x_{ni} of SNP i contributes linearly to the log-odds ratio with an effect size β_i . The likelihood for N patients is

$$\mathcal{L}(\boldsymbol{\beta}) = p(\boldsymbol{\phi} \mid \mathbf{X}, \boldsymbol{\beta}) = \prod_{n=1}^N p_n^{\phi_n} (1 - p_n)^{1 - \phi_n} = \prod_{n=1}^N \frac{\exp(\phi_n \boldsymbol{\beta}^\top \mathbf{x}_n)}{1 + \exp(\boldsymbol{\beta}^\top \mathbf{x}_n)}. \quad (3)$$

Logistic regression: more flexible analysis for GWA studies

- Similar to linear regression, used for binary outcomes instead of continuous outcomes
- Let Y_i be the phenotype for individual i
 - $Y_i = 0$ for controls
 - $Y_i = 1$ for cases
- Let X_i be the genotype of individual i at a particular SNP
 - TT $X_i = 0$
 - GT $X_i = 1$
 - GG $X_i = 2$
- Add extra terms to adjust for potential confounders: e.g. ethnicity, genotyping batch, genotypes at other SNPs
 - Let $p_i = E(Y_i | X_i, C_i, D_i, \dots)$

$$\text{logit}(p_i) \sim \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 C_i + \beta_3 D_i + \dots$$

PLINK `--logistic`

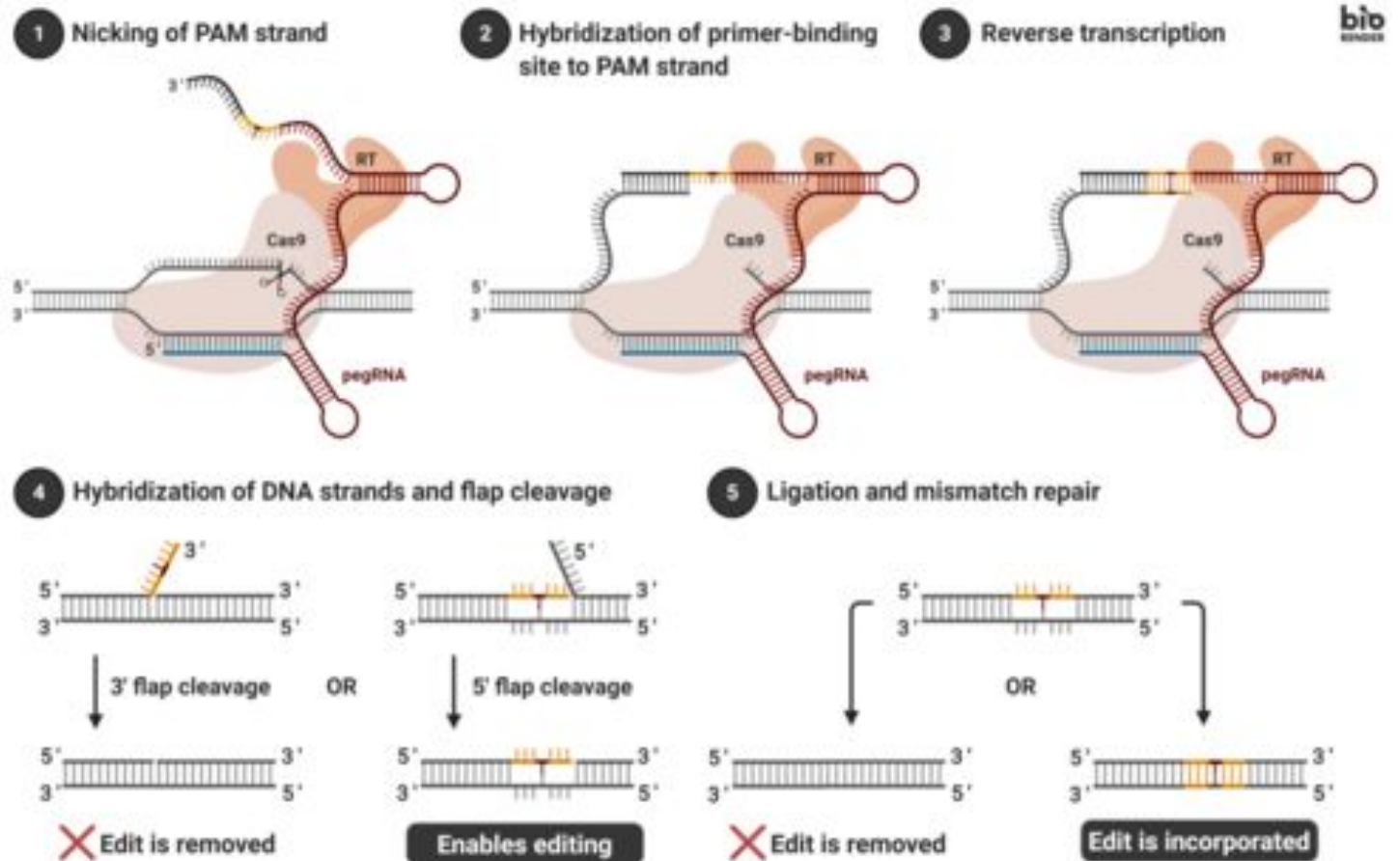
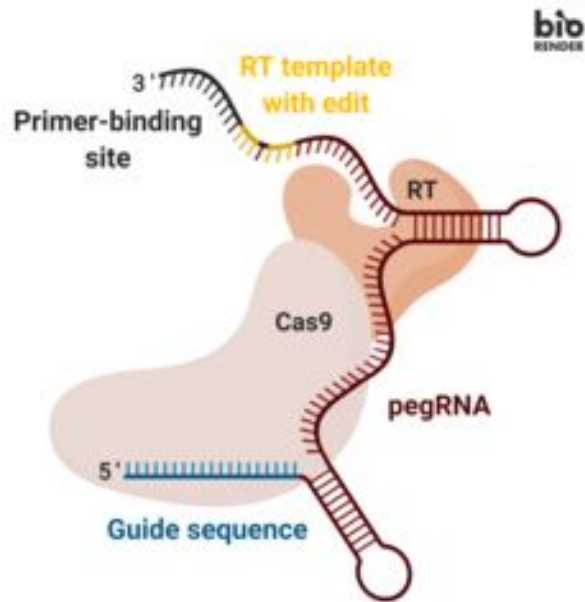
ВКЛАД ГЕНЕТИКИ НЕ ПРЕВЫШАЕТ 40% ДЛЯ ВСЕХ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

- Много генов вовлечено
- Надо учитывать влияние окружающей среды
- Раскрыть персональные данные
- Элемент случайности

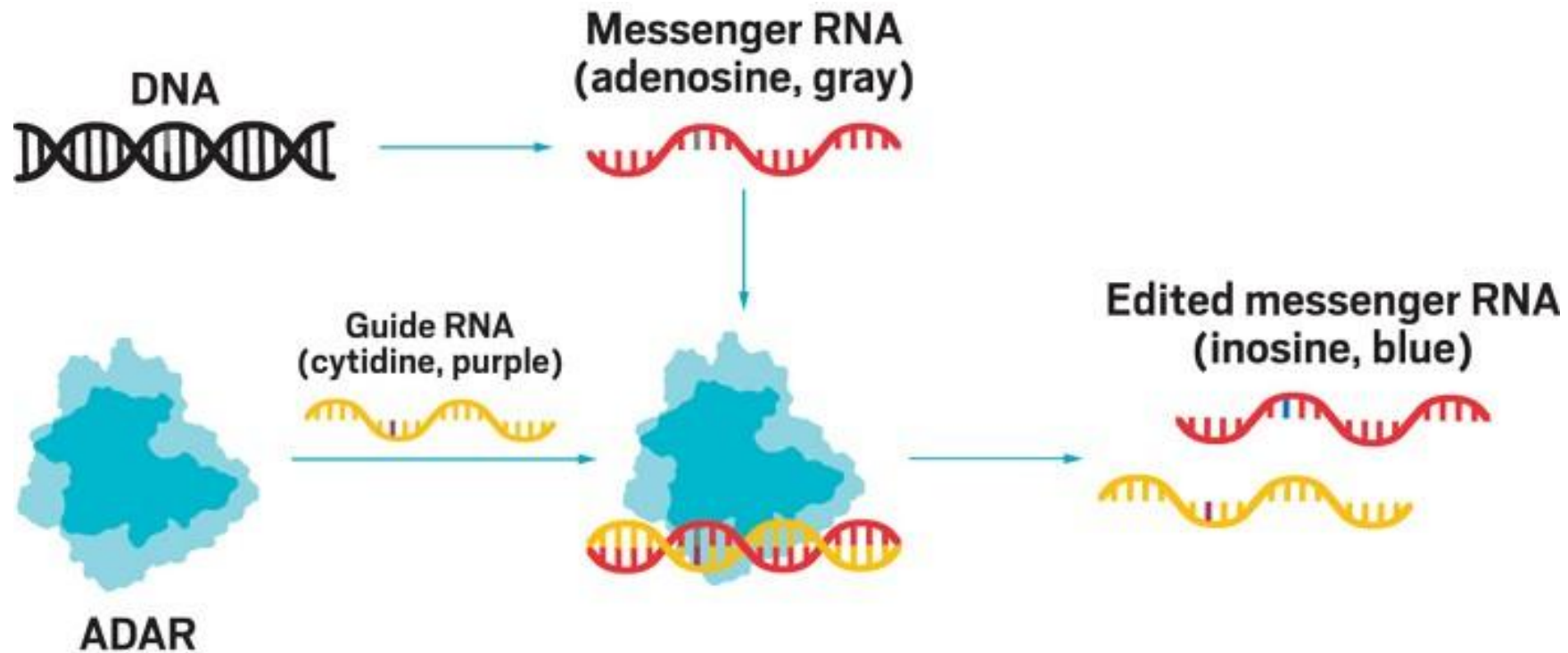
МЫ ПОКА НЕ ОЧЕНЬ ПОНИМАЕМ ЧТО РЕДАКТИРОВАТЬ, ЧТОБЫ ПОЛУЧАТЬ
ДИЗАЙНЕРСКИХ ЛЮДЕЙ

РАЗРЕДАКТИРОВАТЬ УЖЕ НЕЛЬЗЯ

Читатели, редакторы и писатели



Читатели, редакторы и писатели



Gene editing landscape

Notes

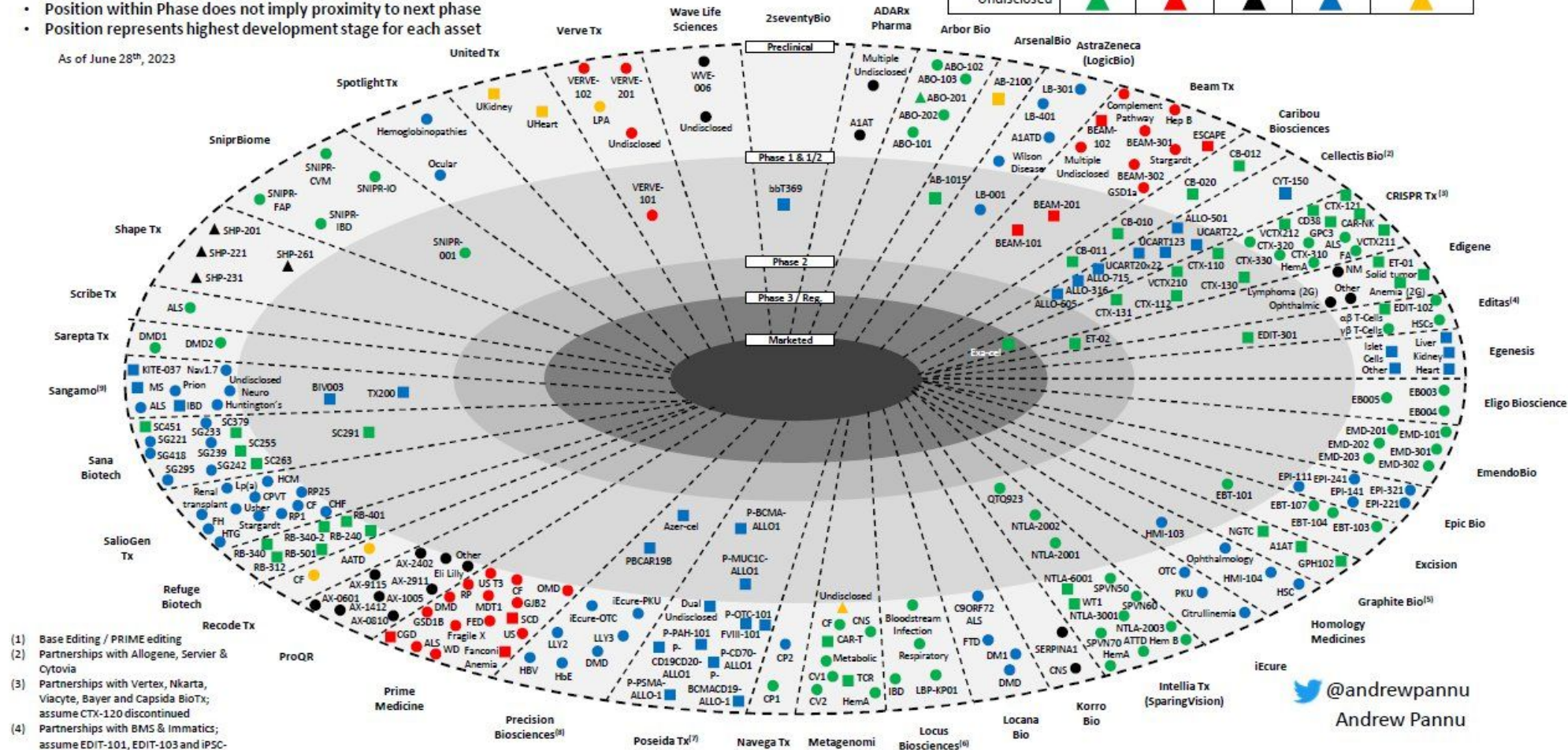
- Not Exhaustive; companies only
- Position within Phase does not imply proximity to next phase
- Position represents highest development stage for each asset

As of June 28th, 2023

Gene Editing Landscape Chart

Legend

Approach	Cas	BE / PE ⁽¹⁾	ADAR	Other / Hybrid	Undisclosed
In Vivo	●	●	●	●	●
Ex Vivo	■	■	■	■	■
Undisclosed	▲	▲	▲	▲	▲

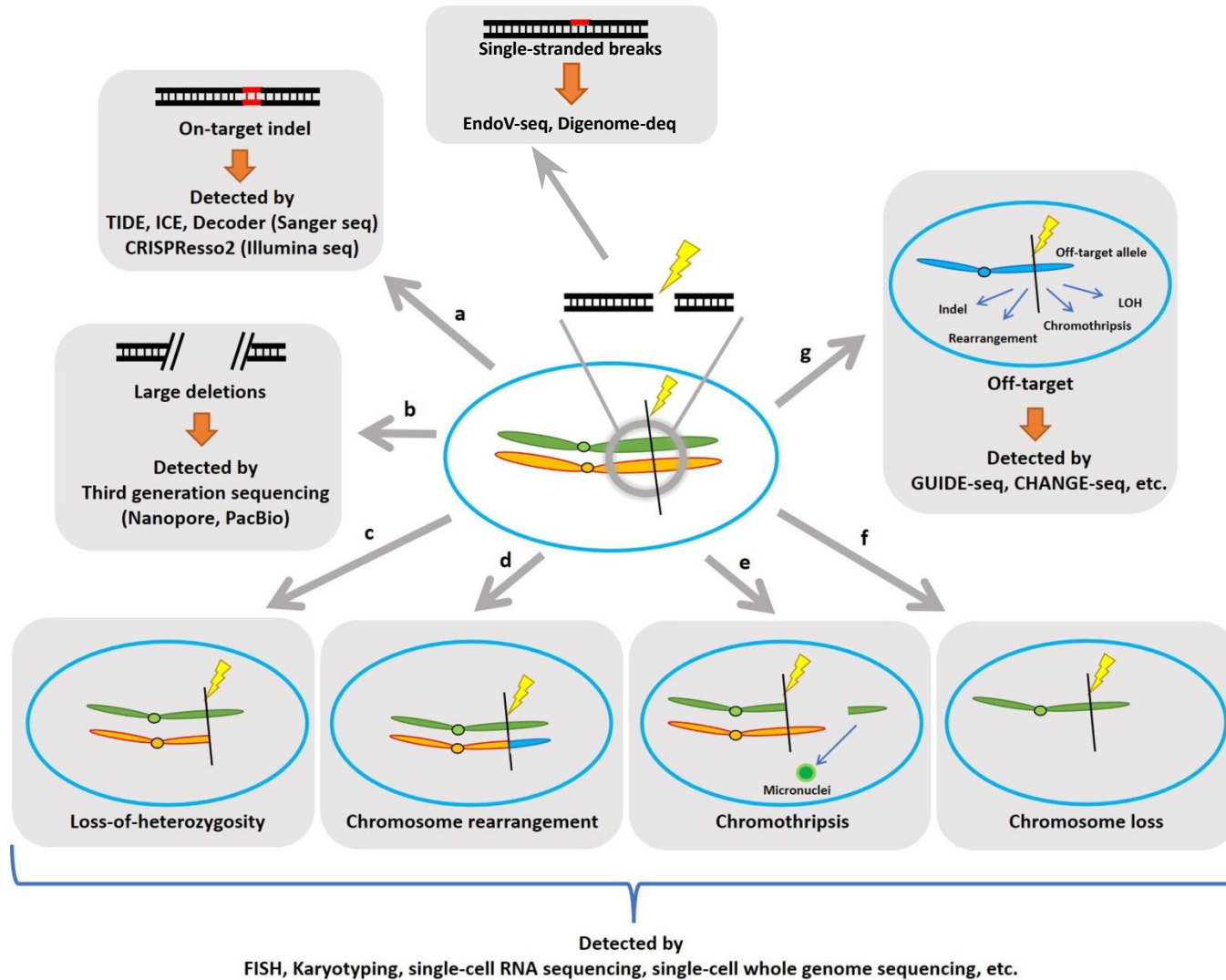


(1) Base Editing / PRIME editing
 (2) Partnerships with Allogene, Servier & Cytovia
 (3) Partnerships with Vertex, Nkarta, Viacyste, Bayer and Capsida BioTx; assume CTX-120 discontinued
 (4) Partnerships with BMS & Immatics; assume EDIT-101, EDIT-103 and iPSC-NK program discontinued
 (5) Assume nula-cel (GPH-101) terminated
 (6) Partnerships with Janssen & BARDA
 (7) Heme assets partnered with Roche
 (8) Partnerships with Novartis, Lilly & eCure
 (9) Partnerships with Gilead, Pfizer & Takeda

@andrewpannu
Andrew Pannu

Возможные исходы редактирования, обусловленные различными путями репарации разрывов

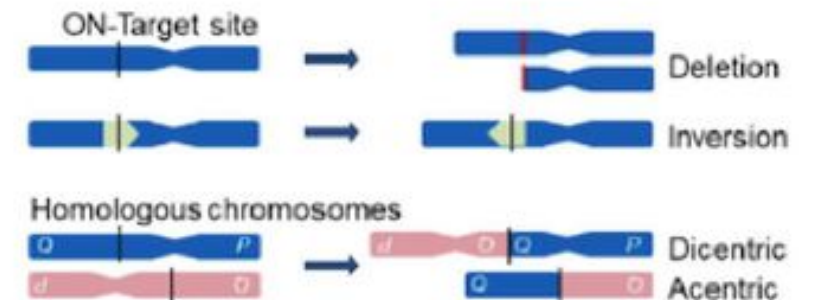
ОФФТАРГЕТЫ



OFF-Target mediated aberrations



ON-Target mediated aberrations



Риски:

- 1) Инактивация опухолевых супрессоров
- 2) Активация онкогенов
- 3) Онкогенные транслокации

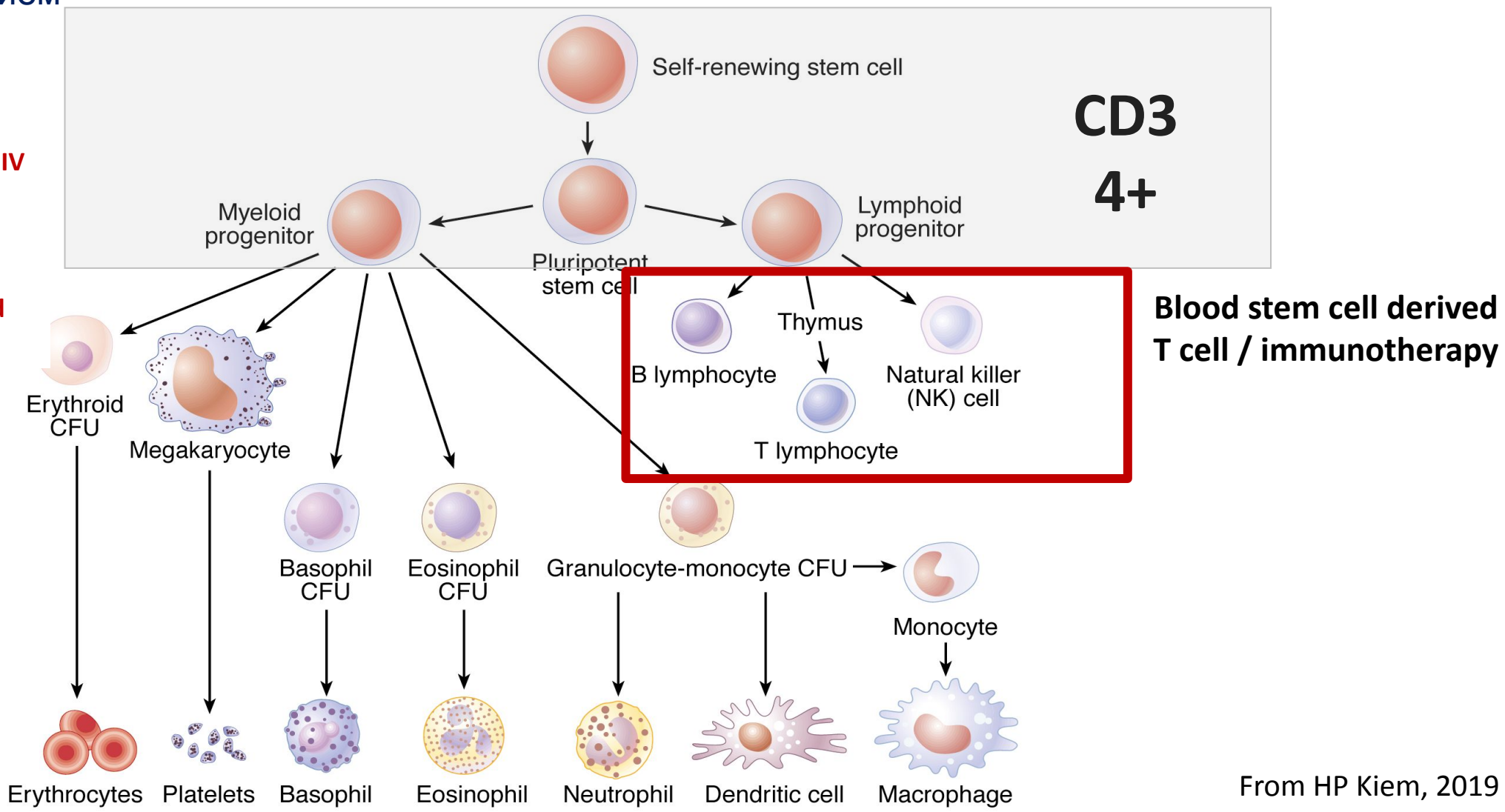
Генная терапия – какие клетки модифицировать?

Критерии:

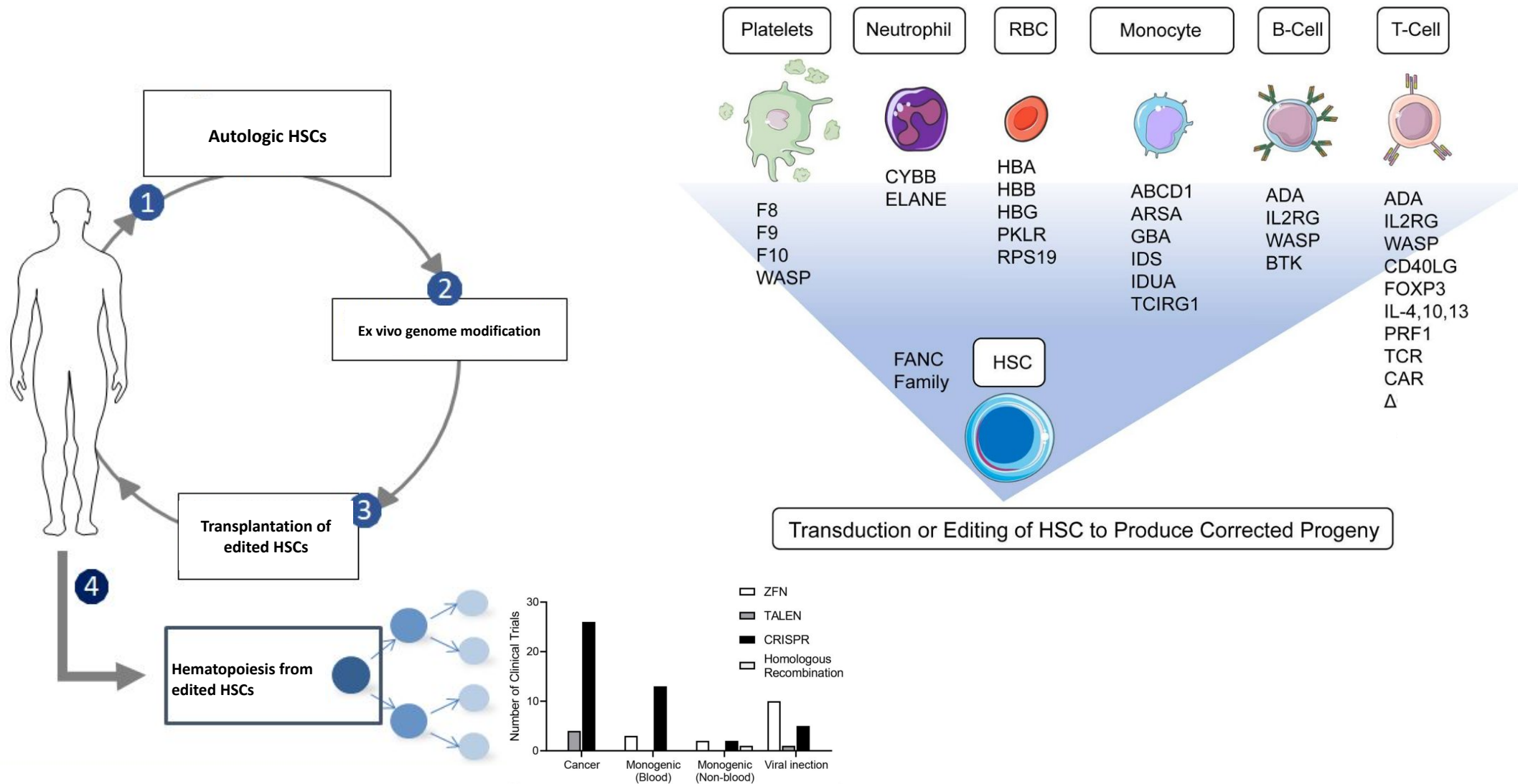
- Соматические клетки (излечение болезни только у пациента, а не у потомков пациента)
- Возможность проведения генетической модификации *ex vivo* или наличие уникальных маркеров, позволяющих таргетно доставлять генетический материал в клетки *in vivo*
- Восприимчивость клеток к генетической модификации
- Удобство культивирования
- Опыт клинической трансляции

Согласно теории А. А. Максимова, стволовые клетки («*Stammzelle*» – по автору), способны к самоподдержанию, полипотентности и мобильности, находятся в тесной связи с микроокружением

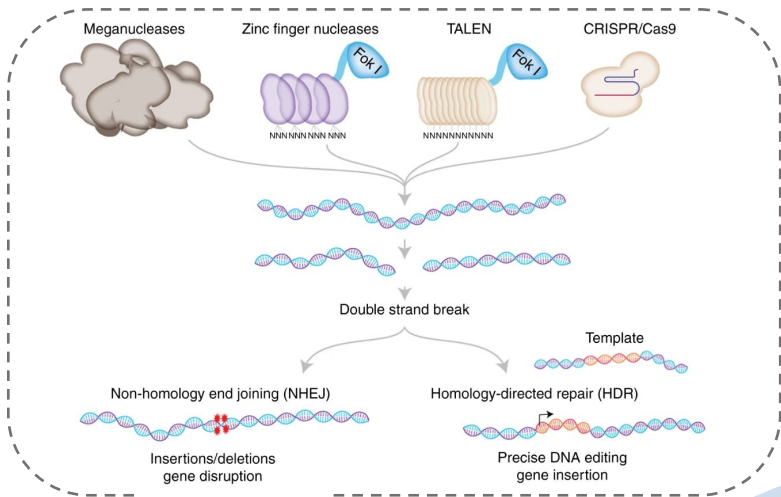
- Correcting genetic defect
- Making cells resistant to HIV
- Protecting cells from chemotherapy
- Generation of HSC-derived CAR cells



Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), выделенные из костного мозга, могут быть модифицированы *ex vivo* и переданы обратно реципиенту для получения функциональных, окончательно дифференцированных клеток



Основные этапы доклинической разработки клеточных продуктов на основе ГСК с модифицированным геномом



SOPs для GMP-совместимого производства продукта в клиническом масштабе

In vivo безопасность

In vitro безопасность:

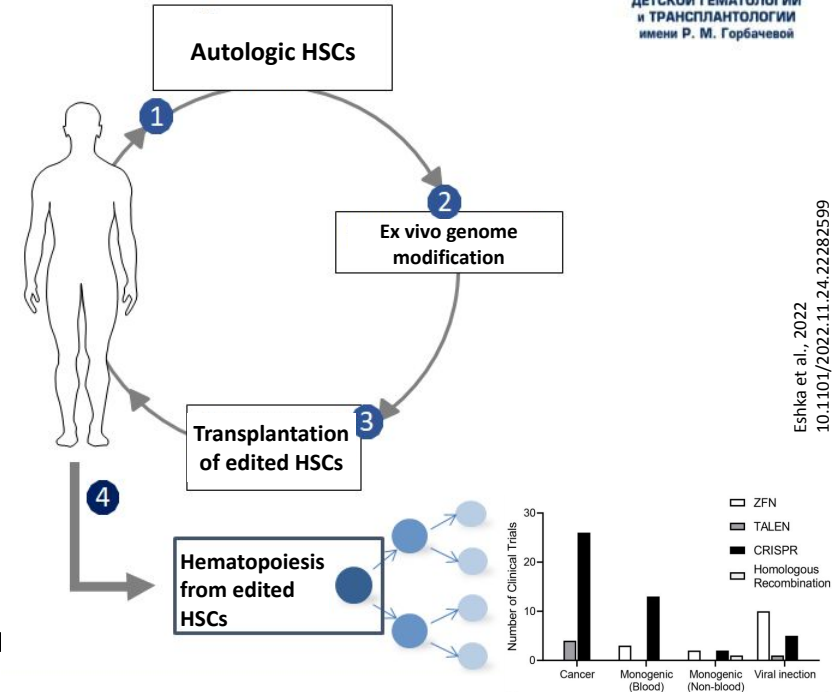
РОС и оптимизация целевой эффективности

1. Цитотоксичность
2. Формирование колоний
3. **Внецелевая активность**

Клиническая фаза

Риск-адаптированный подход:

1. Приживление и мультилинейная дифференцировка
2. Репопулирующая способность, самообновление
3. Приживление и редактирование медленно репопулирующих стволовых клеток (LT-HSC)
4. Генотоксичность и туморогенность.

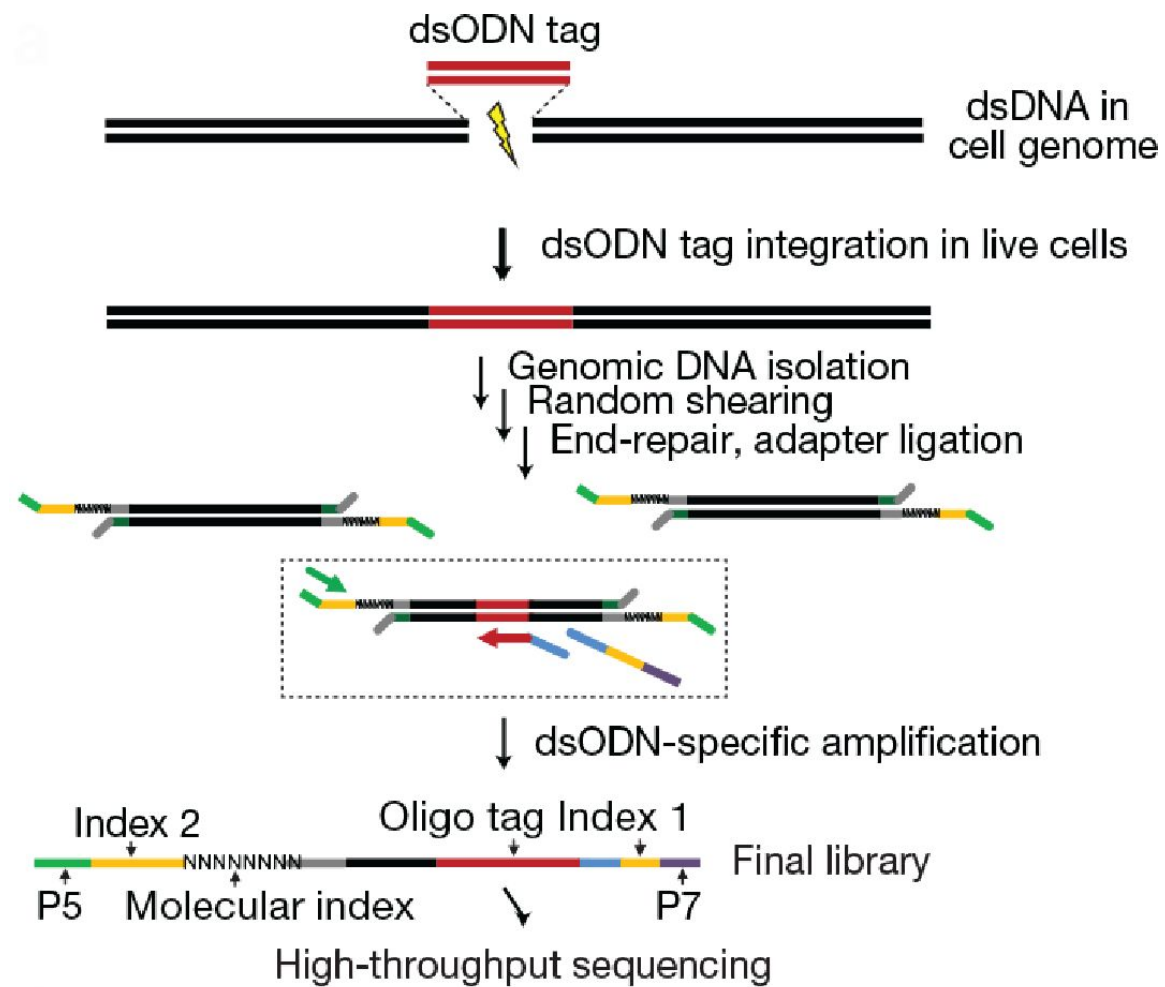


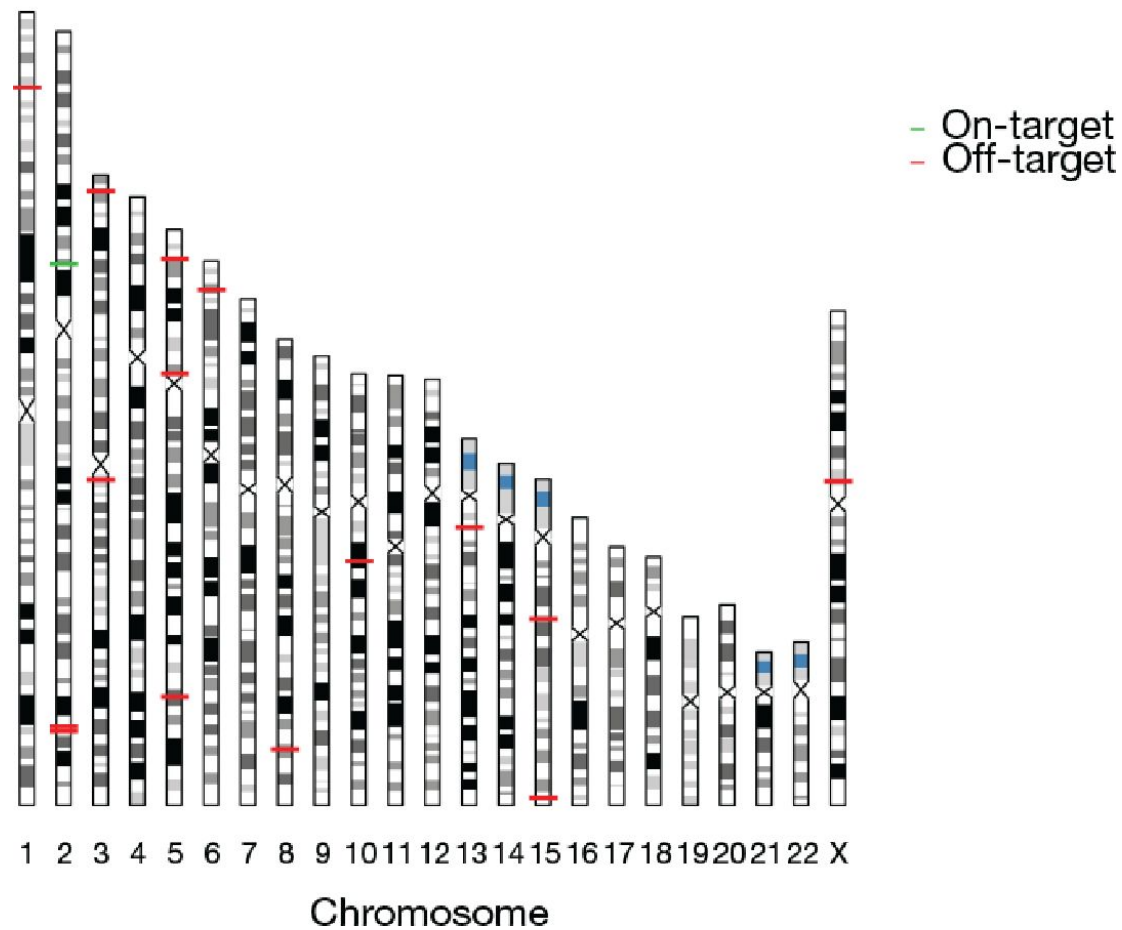
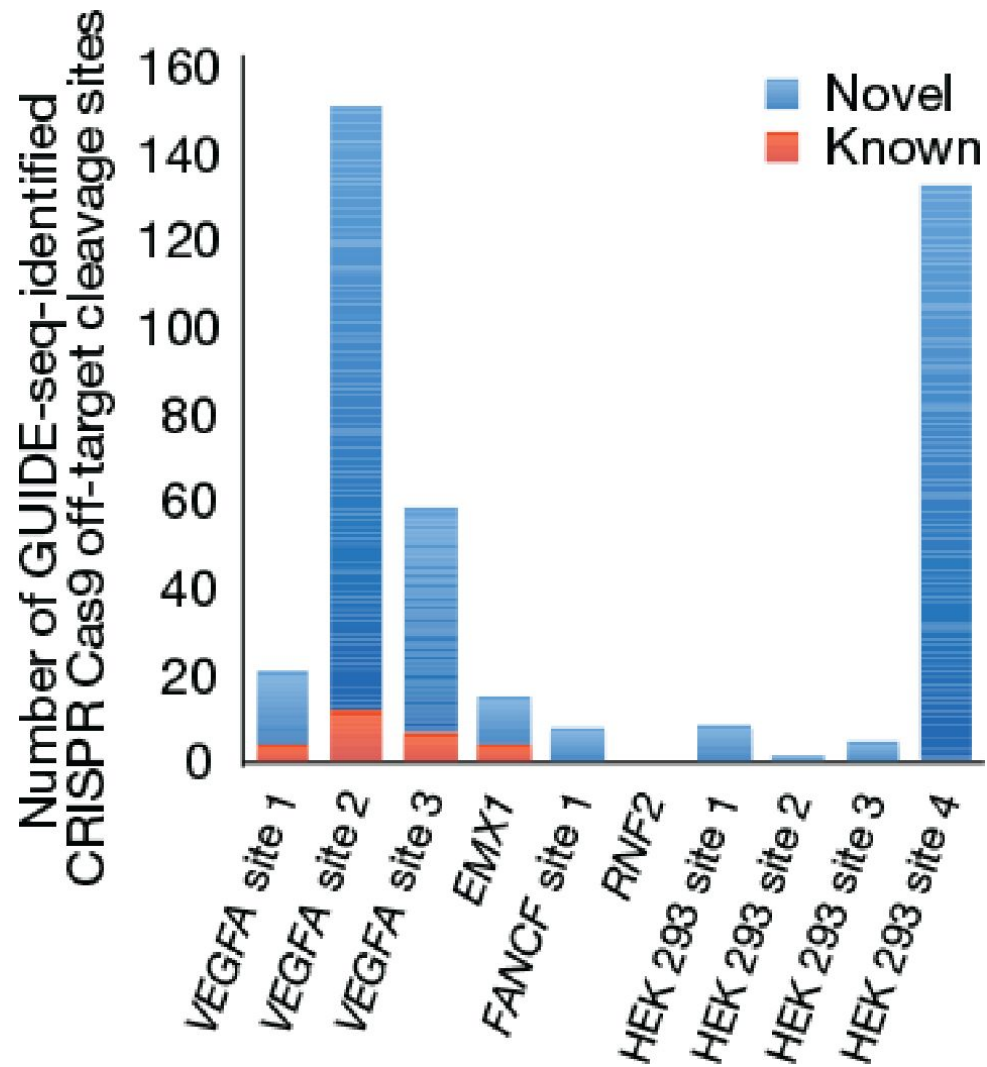
Human hematopoietic stem cells (HSC, CD34+)



Иммунодефицитная мышь

Guideseq



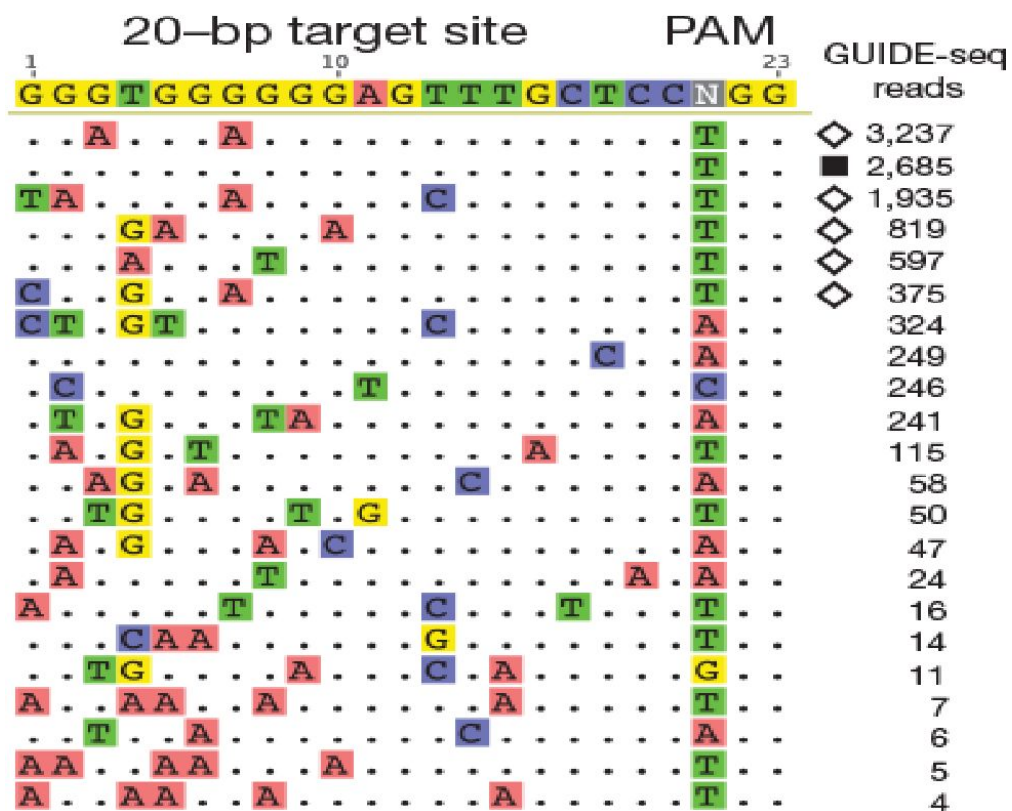


OFF-TARGET
ON-TARGET

Guideseq

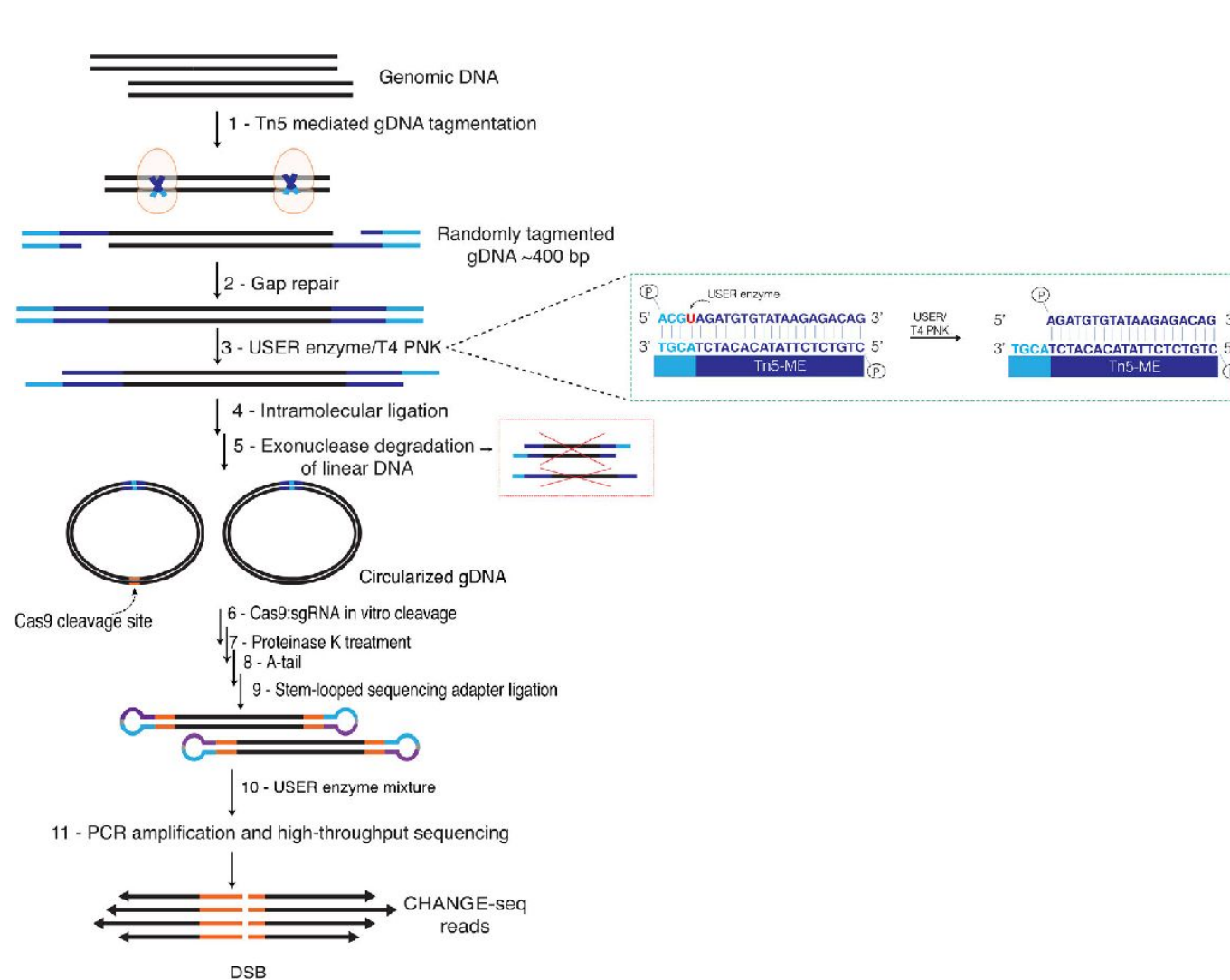
- Intended target site
- ◇ Known off-target site

VEGFA site 1

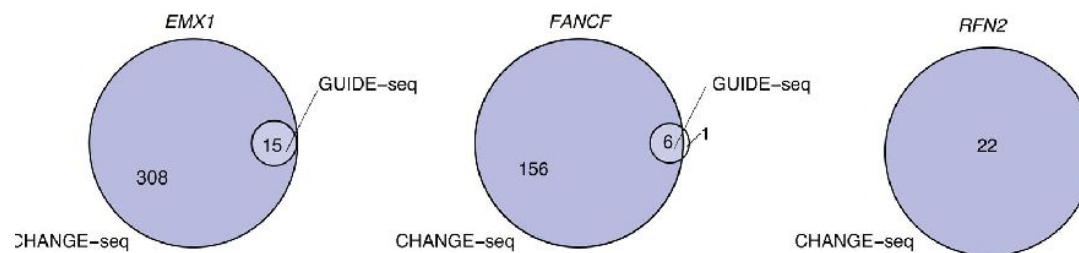
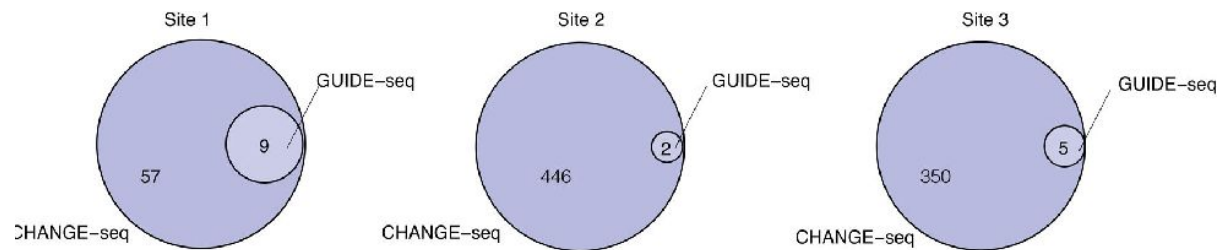


■

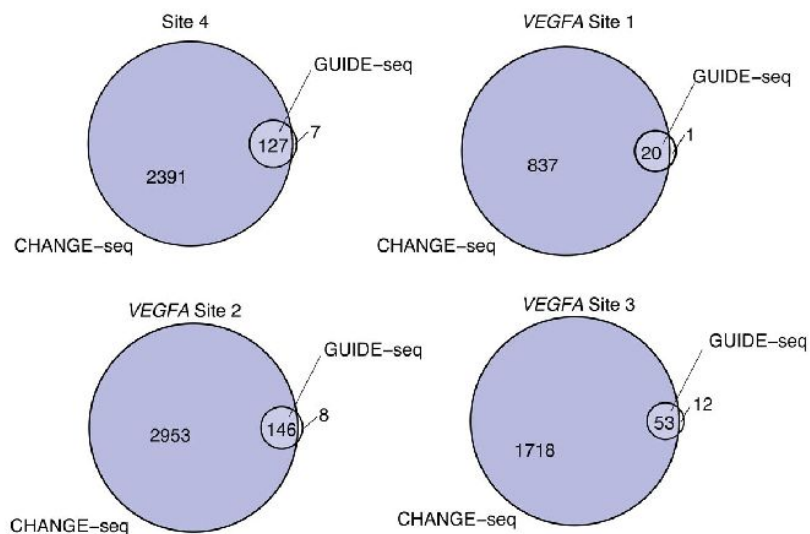
ChangeSeq



ChangeSeq
 Vs
 Guideseq

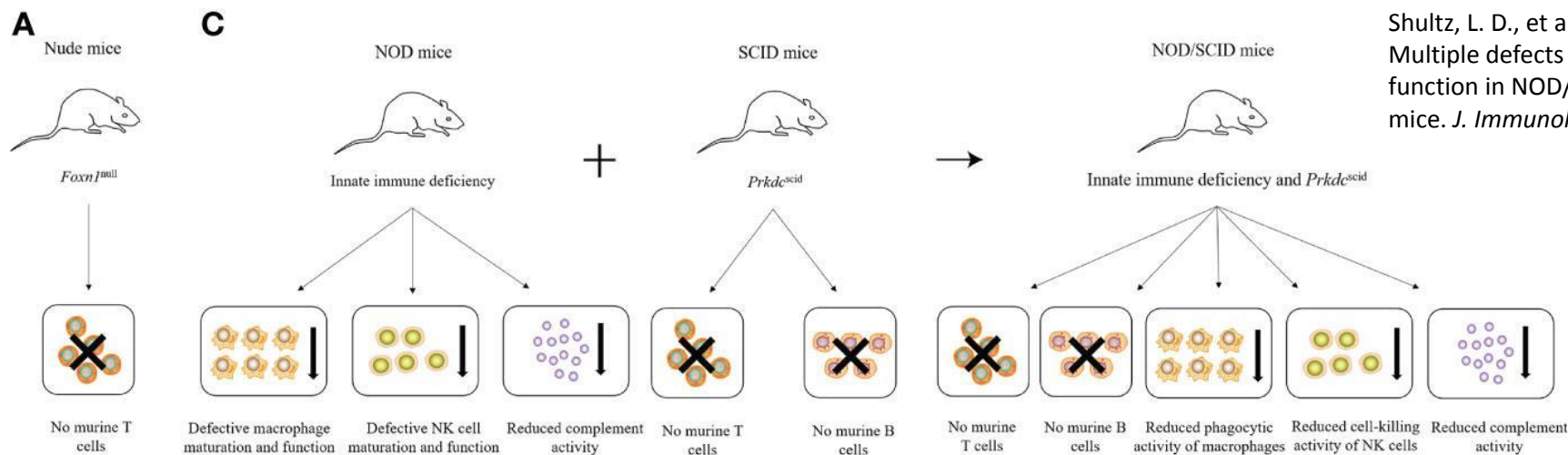


Standard

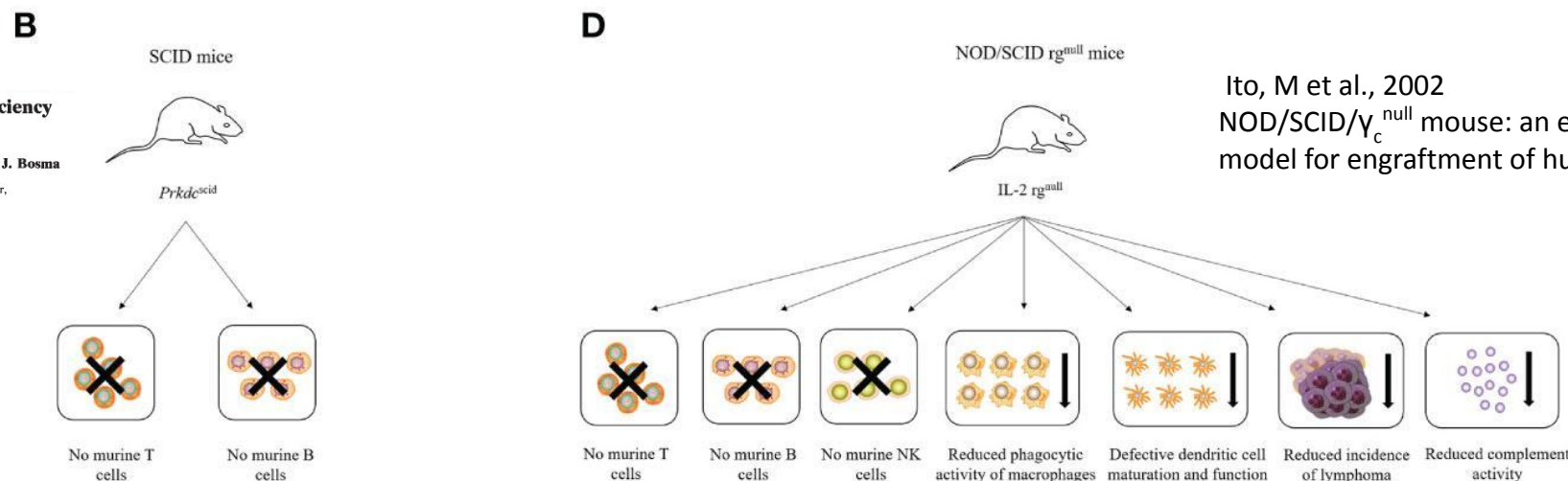


Repetitive

ISAACSON I. H. and CATTANACH B. M.: Report. Mouse News Letter 27 (1962), 31.



Shultz, L. D., et al. 1995.
Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-*scid* mice. *J. Immunol.* 154: 180–191.



Ito, M et al., 2002
NOD/SCID/ γ_c ^{null} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182.

A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse

Gayle C. Bosma, R. Philip Custer & Melvin J. Bosma
Institute for Cancer Research, Fox Chase Cancer Center,
Philadelphia, Pennsylvania 19111, USA

1983, Nature

Stem Cell Reports Report



OPEN ACCESS

Nonirradiated NOD,B6.SCID $Il2rg^{-/-}$ $Kit^{W41/W41}$ (NBSGW) Mice Support Multilineage Engraftment of Human Hematopoietic Cells

Brian E. McIntosh,¹ Matthew E. Brown,² Bret M. Duffin,¹ John P. Maufort,¹ David T. Vereide,^{1,3} Igor I. Slukvin,^{4,5} and James A. Thomson^{1,6,7,*}

¹Morgridge Institute for Research, Madison, WI 53715, USA

²Department of Surgery, University of Wisconsin, Madison, WI 53715, USA

³Biotechnology Center, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA

⁴Wisconsin National Primate Research Center, University of Wisconsin, Madison, WI 53715, USA

⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Wisconsin, Madison, WI 53715, USA

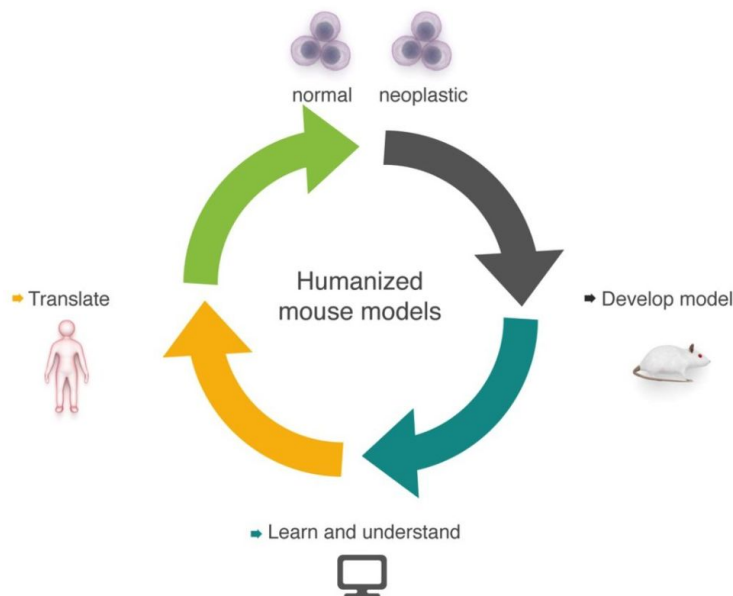
⁶Department of Cell and Regenerative Biology, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, WI 53706, USA

⁷Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of California, Santa Barbara, Santa Barbara, CA 93106, USA

*Correspondence: jthomson@morgridgeinstitute.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.005>

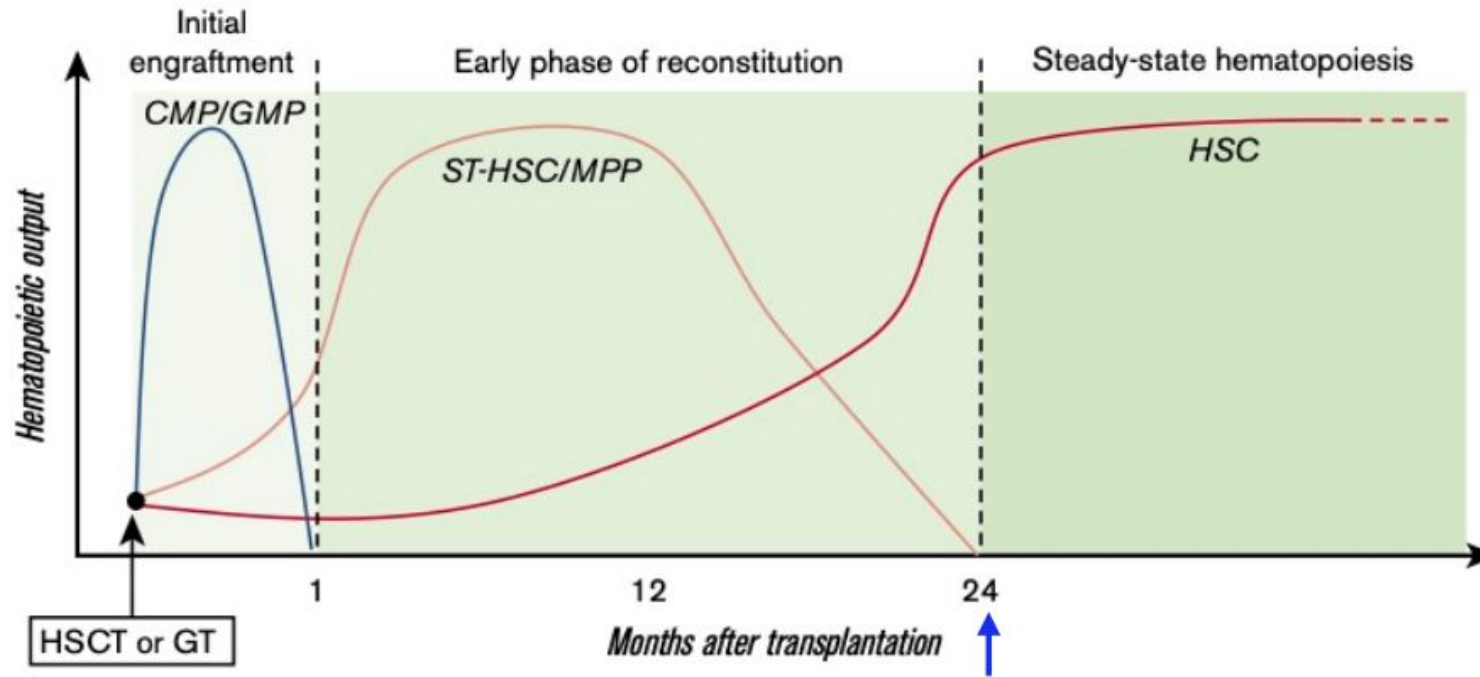
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).



1. Нарушение конкурентоспособности ГСК реципиента
2. Увеличение пространства для донорских ГСК человека
3. Увеличение выработки эритроидных предшественников человека из-за важной роли KIT в поддержании эритропоэза
4. Мутация W41 не компрометирует фертильность линии

Сколько наблюдать за животными

Human hematopoiesis after transplantation



Comparable timepoint in mouse is ~16 weeks



Prime Editing in Hematopoietic Diseases and Beyond:
Efficacy and Safety

Jacob Stewart-Ornstein, PhD
Director, Off-Target Biology
Prime Medicine



Преимущества и ограничения in vivo модели NBSGW при доклинической разработке клеточных продуктов на основе ГСК с редактированием генома

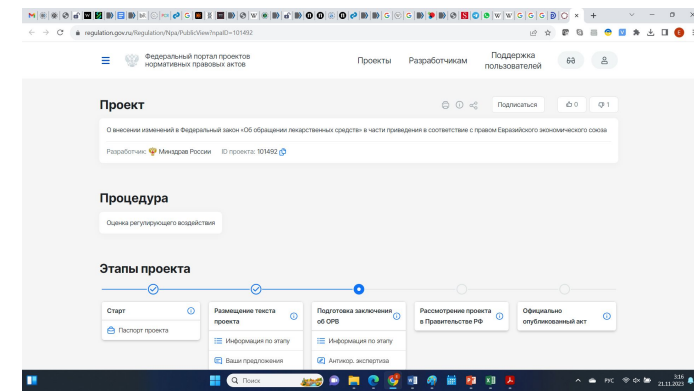


	Преимущества
-	Поддерживает приживление клеток человека на высоком уровне без кондиционирования
-	Возможна оптимизация дизайна доклинических исследований
-	Поддерживает серийную трансплантацию ГСК человека

	Ограничения
-	Новая модель
-	Клеточный состав костного мозга после восстановления установлен не окончательно, состав гемопоэтической среды не полностью повторяет гемопоэз человека
-	Не поддерживают циркуляцию зрелых эритроцитов человека
-	Слабо изучена динамика восстановления Т-лимфоцитов человека
-	Ограничено долгосрочное поддержание клеток человека
-	менее агрессивные новообразования HSC/HSPC неэффективно развиваются на моделях ксенотрансплантата у

Выводы

- Зиготы человека редактировать нельзя- высокий оффтаргет
- Зиготы человека редактировать нельзя- не решен этический вопрос
- Зиготы животных редактировать можно, но осторожно
- Соматические клетки редактировать можно, но надо провести два уровня оценки безопасности перед клиническим использованием- оффтаргеты и ин виво туморогенез
- Hospital exemption. Поправки в №61-ФЗ



ГДЕ В РОССИИ ЭТО ДЕЛАЮТ

- Читатели, секвенирование. Много, где: **ФИЦ Биотехнологии**,
- Change Seq: **Александр Мазур**, ЗАО Геноаналитика
- Писатели: **Вадим Говорун**, Институт Синтетической Биологии
- Редакторы зигот мышей: **Петр Сергиев**, МГУ им М.В. Ломоносова
- Редакторы ГСК: **Марина Попова**, госпиталь Раисы Горбачевой