

## Генная терапия наследственных заболеваний с использованием технологии CRISPR/Cas9 *in vivo*\*

Смирнихина С.А.<sup>1</sup>, Лавров А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»; e-mail: smirnikhinas@gmail.com

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Генная терапия с 1970-х годов остается чрезвычайно актуальной, но нерешенной до сих пор задачей. Появление методов геномного редактирования с использованием специфичных нуклеаз открывает новые возможности в лечении различных заболеваний, в том числе моногенных. В обзоре дана краткая характеристика метода CRISPR/Cas9, основные принципы работы, достоинства и недостатки метода, а также представлены примеры успешного применения CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций, приводящих к моногенным наследственным заболеваниям, на мышинных моделях и эмбрионах человека.

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, геномное редактирование, миодистрофия Дюшенна, модельные животные

### Введение

Геномное редактирование — новый подход, широко применяемый в генной терапии и в исследованиях по функциональной геномике. В основе метода лежит использование специфичных нуклеаз, способных вызывать сайт-специфические изменения геномов. Данная область исследований развивается стремительно, уже через 5—10 лет после открытия метода появляются работы по успешному применению их у человека. Первый метод геномного редактирования на основе нуклеаз цинковых пальцев (ZFN) появился в 1996 г. [1], а в настоящее время разработаны методы лечения различных заболеваний, которые успешно проходят 1-ю и 2-ю фазы клинических исследований. Наилучшие результаты получены при лечении пациентов от ВИЧ-инфекции [2]. В 2011 г. был разработан еще один метод, основанный на использовании эндонуклеаз эффекторов, подобных активатору транскрипции (TALEN) [3]. Широкого внедрения в клинику метод на основе TALEN пока не получил, однако уже сейчас есть опыт успешного излечения лейкоза у девочки [4]. Описанные методы геномного редактирования, несмотря на высокую специфичность и эффективность, остаются чрезвычайно затратными и трудоемкими, что сильно затрудняет их разработку и использование в неспециализированной лаборатории. Поэтому разработка в 2012 г. J. Doudna (Калифорнийский университет в Беркли, США) и E. Charpentier (Университет Умео, Швеция) [5] РНК-опосредованного метода создания двуцепочечных разрывов ДНК с использованием специфических нуклеаз — CRISPR/Cas9, и появление на его основе метода геномного редактирования буквально совершило прорыв в этой области [6]. По данным базы PubMed за три года использования технологии

опубликовано свыше 1700 статей, что может свидетельствовать о высоком интересе к этой методике. Стоит отметить, что наибольший вклад в развитие этой технологии внесли лаборатории под руководством F. Zhang из Массачусетского технологического института, США, и G. Church из Гарвардской медицинской школы, США.

Для лечения наследственных заболеваний методами геномного редактирования традиционно используют два подхода: генную (*in vivo*) и клеточную терапию (*ex vivo*). Суть генной терапии заключается во введении в живую клетку нуклеиновых кислот или их производных, которые либо изменяют структуру гена путем встраивания в ДНК клетки-хозяина, например, при лентивирусной трансдукции [7], либо восполняют недостаток мРНК гена, например, функционируя в виде плазмиды [8], либо модифицируют экспрессию гена, например, подавляя путем РНК-интерференции в случае использования малых интерферирующих РНК [9]. Клеточная терапия заключается в том, что геномное редактирование осуществляют в клетках, полученных от больного человека. Чаще всего их репрограммируют в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, которые затем редактируют, дифференцируют в необходимый тип клеток и после этого трансплантируют больному человеку, у которого они должны либо заместить собой пораженные клетки, либо создать очаг «правильно» функционирующих клеток. Работ, описывающих создание таких клеток до этапа трансплантации, опубликовано уже очень много и их освещение — это предмет отдельной статьи, например, недавно D. Nockemeyer с соавторами была опубликована обзорная статья с основными достижениями в этой области [10].

\* **Информация о конфликте интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

На сегодняшний день разработка лечения наследственных заболеваний идет как по пути использования генной терапии, так и клеточной. Основные подходы к терапии различных моногенных болезней отражены в нескольких обзорных статьях, например, в статьях M.L. Maeder и С.А. Gersbach [11] и V. Prakash с соавторами [12]. В этом обзоре мы сосредоточились на генной терапии наследственных заболеваний *in vivo* с использованием технологии CRISPR/Cas9.

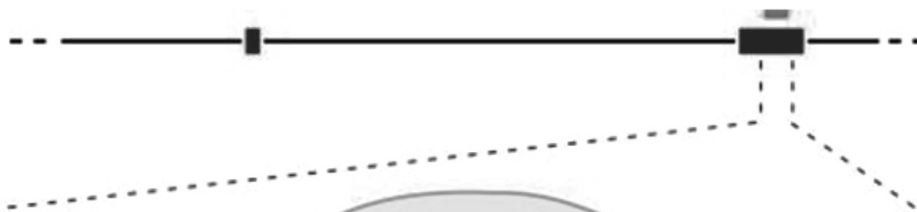
**Метод CRISPR/Cas9 и его особенности**

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) — группа регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов — была впервые обнаружена в геноме прокариот в 1987 г. [13]. Позже был обнаружен CRISPR-ассоциированный белок 9 (Cas9). Также было установлено, что локус CRISPR способен к транскрипции. Образующаяся РНК (CRISPR RNA, crRNA) связывается со вспомогательной транскрибирующей CRISPR РНК (trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA) и называется направляющей РНК (guide RNA, gRNA). Первая обеспечивает связывание с ДНК, а вторая необходима для связывания с Cas9. gRNA связывается с Cas9, после чего нуклеазный домен Cas9 производит двуцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК.

Для удобства работы с системой CRISPR/Cas9 эти РНК удалось объединить в единую направляющую РНК (single guide RNA, sgRNA), которая состоит из двух

фрагментов: 20—22 нуклеотида с 5' конца, комплементарные нужному участку ДНК, и «хвост», состоящий из примерно 80 нуклеотидов, необходимый для связывания с нуклеазой Cas9 (рис. 1). sgRNA подбирается таким образом, чтобы связываться с ДНК рядом с местом расположения PAM-последовательности (последовательность смежная с протоспейсером), которая необходима для связывания Cas9 с ДНК. Для каждого ортолога Cas9 существует своя PAM-последовательность, например, для наиболее часто используемого SpCas9 это 5'-NGG, для SaCas9 — 5'-NNGRRT. При связывании sgRNA с последовательностью ДНК, а Cas9 с PAM-последовательностью в ДНК, Cas9 осуществляет ДЦР ДНК за 3 нуклеотида от PAM-последовательности с 5'- конца. ДЦР запускает репарацию одним из двух способов: негомологичным соединением концов (НГСК, NHEJ) или направленной гомологичной репарацией (НГР, HDR) (рис. 2). В первом случае концы ДНК по сторонам от разрыва сшиваются, при этом в месте сшивания обычно формируются случайные инсерции или делеции нескольких нуклеотидов (indel). Если indel не кратен трем, то происходит сдвиг рамки считывания, и возможно образование преждевременного стоп-кодона. Во втором случае при наличии донорной ДНК (двухцепочечной ДНК или одноцепочечных олигонуклеотидов (ssODN)) происходит направленная гомологичная репарация и замещение дефекта. НГСК чаще всего происходит в дифференцированных неделящихся клетках, тогда как НГР — в делящихся [14].

Геномный локус



Целевая ДНК



sgRNA

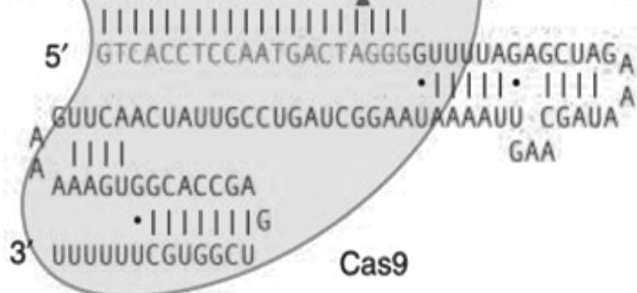


Рис. 1. Схема работы Cas9 нуклеазы. Объяснение в тексте. Target — цель, bp — пары нуклеотидов. Из статьи F.A. Ran с соавт. с модификациями [14].

Несмотря на существенную простоту использования технологии CRISPR/Cas9, основным ее недостатком является относительно высокая частота неспецифической активности, в отличие от TALEN и ZFN. Эта неспецифичность обусловлена длиной sgRNA, комплементарной таргетной последовательности ДНК, а также наличием псевдогенов и высокогомологичных участков в геноме, к которым может присоединиться sgRNA [6]. Существует пять основных стратегий уменьшения неспецифической активности Cas9:

1) тщательный специфический подбор sgRNA, минимизирующий связывание sgRNA с нецелевой последовательностью ДНК [15];

2) подбор оптимального соотношения Cas9 и sgRNA [16];

3) повышение специфичности действия Cas9 путем внесения в него модификаций, снижающих силу электростатического взаимодействия нуклеазы и ДНК, таким образом, повышая значимость связи между ДНК и sgRNA [17];

4) конвертация Cas9 в никазу Cas9n — фермент, разрезающий только одну цепь ДНК. Совместное использование двух Cas9n с двумя sgRNA обеспечивает целевой ДЦР [18];

5) создание белка, объединяющего инактивированную нуклеазу Cas9 и активную нуклеазу FokI — никазу fCas9. Совместное использование двух fCas9 с двумя sgRNA увеличивает специфичность в 140 раз [19].

Для доставки Cas9, sgRNA и донорной ДНК в клетки используют традиционные подходы переноса генов: невирусные (электропорация и липофекция) и вирусную трансдукцию (особенно для исследований *in vivo*). В последнем случае можно использовать аденовирусы, но

чаще всего используют аденоассоциированные вирусы (ААВ), преимуществами которых являются:

1) большая эффективность трансдукции;

2) стабильная длительная трансдукция без встраивания вирусной ДНК в геном клетки-хозяина;

3) возможность подбора определенного серотипа вируса, имеющего тропность к определенной ткани;

4) отсутствие выраженного иммунного ответа [20].

Однако использование ААВ накладывает определенные ограничения — пакующая способность вируса не превышает 4,5 т.п.н., тогда как размер наиболее часто используемой нуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) около 4,2 т.п.н., что не позволяет поместить в одну вирусную частицу все компоненты CRISPR/Cas9. Поэтому с 2015 г. ученые стали широко использовать нуклеазу Cas9 из *Staphylococcus aureus* (SaCas9), которая более чем на 1 т.п.н. короче, а ее эффективность разрезания ДНК сопоставима с SpCas9 [21].

По состоянию на июнь 2016 г. опубликована лишь одна работа [22] об использовании CRISPR/Cas9 в лечении наследственных заболеваний (бета-талассемия) у человека *in vivo*, проведенная на эмбрионах, она будет рассмотрена ниже. Остальные исследования сейчас проходят доклинические исследования на модельных животных [23—30]. Безусловно, проверка разработанных методов лечения на модельных животных *in vivo* может дать представление о безопасности и эффективности этих методов для дальнейшего применения у человека, в то время как исследования *in vitro* могут только показывать возможность создания методики. Однако исследования на мышинных моделях имеют ряд особенностей. Во-первых, в таких экспериментах зачастую компоненты CRISPR/Cas9 системы вводят непосредственно в зи-

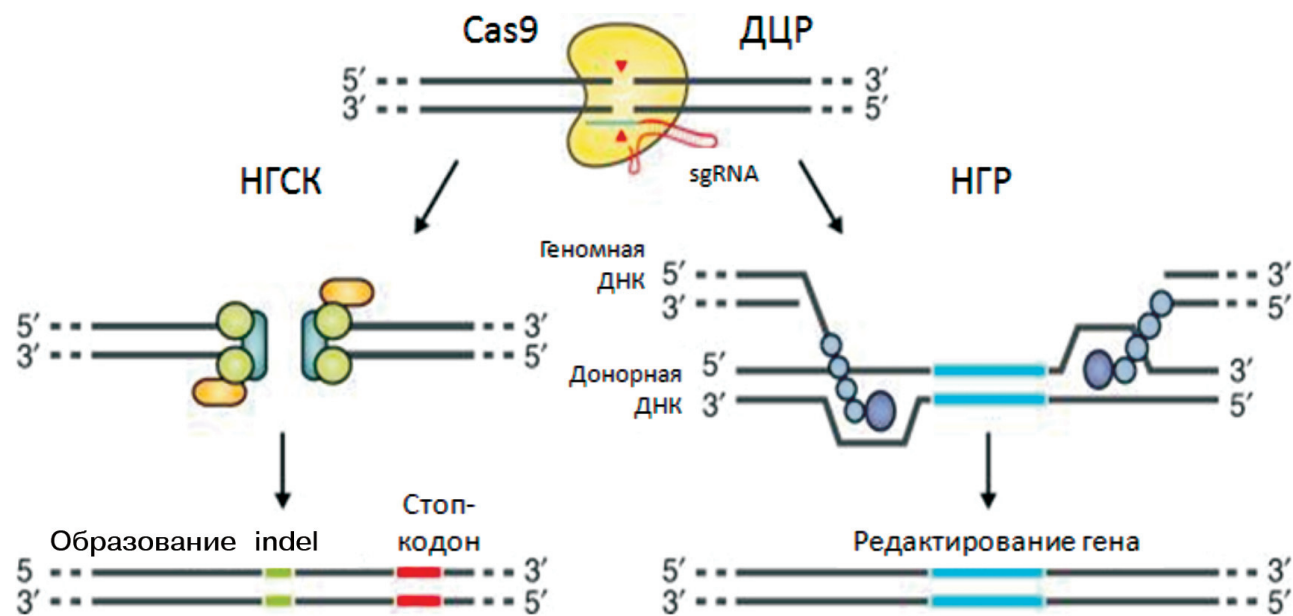


Рис. 2. Двухцепочечный разрыв ДНК запускает репарацию. Объяснение в тексте. ДЦР — двухцепочечный разрыв, НГСК — негомологичное соединение концов, НГР — направленная гомологичная репарация. Из статьи F.A. Rap с соавт. с модификациями [14].

готу мыши и дальше анализируют рожденных мышей. Бесспорно, по этическим соображениям на человеческих эмбрионах такая работа невозможна. Работа по геномному редактированию человеческих эмбрионов разрешена в Китае и с 2016 г. в Великобритании в лаборатории под руководством К. Ниакан из Института Френсиса Крика [31]. Однако любые манипуляции с эмбрионами человека разрешены в течение 7–14 дней после оплодотворения, и такие эмбрионы никогда не будут пересажены для дальнейшего развития. С другой стороны, существует особый вид доставки различных веществ в организм мышей постнатально. Речь идет о гидродинамической инъекции в хвостовую вену мыши. Ее особенность в том, что мыши внутривенно вводят компоненты CRISPR/Cas9 в растворе объемом 10% от массы тела в течение 4–7 секунд, что позволяет быстро доставить в разные органы, в частности, в печень необходимые вещества. Безусловно, такой вид введения нельзя применить у человека. В-третьих, геном мыши существенно отличается от человеческого, и ряд биологических процессов протекает по-разному. Перечисленные выше примеры указывают на особенности использования CRISPR/Cas9 на модельных животных и у человека, приводящие к возможным различиям в получаемых результатах.

### Мышечная дистрофия Дюшенна

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД, OMIM 310200) — X-сцепленное рецессивное заболевание, поражающее скелетную мускулатуру и сердечную мышцу; средняя продолжительность жизни пациентов составляет 24 года [32]. Основными причинами МДД являются делеции (79% случаев [33]), дупликации и нонсенс-мутации в гене *DMD*. В результате этих мутаций не происходит созревание белка дистрофина, кодируемого геном *DMD*, его экспрессия не обнаруживается ни в скелетной мускулатуре, ни в сердечной мышце. На текущий момент разработка лечения МДД с использованием технологии CRISPR/Cas9 демонстрирует наиболее впечатляющие результаты, которые давно вышли за пределы исследований *in vitro*, и сейчас известно как минимум пять работ, описывающих успешное лечение МДД у модельных мышей [23–25, 34, 35], что позволяет надеяться на скорую трансляцию этой технологии для лечения человека.

Первая работа *in vivo* была опубликована С. Long с соавт. в 2014 г. [34] и описывала успешное редактирование генома в зиготах модельных мышей *mdx* с нонсенс-мутацией в экзоне 23 гена *Dmd*. Исследователи непосредственно в зиготу вводили мРНК Cas9, sgRNA и ssODN в качестве донорной ДНК, далее пересаживали эмбрион псевдобеременной самке мыши, а после рождения через 3 и 9 недель оценивали изменения. В работе показано, что такой способ коррекции мутации приводит к образованию мышей с генетическим мозаициз-

мом, несущих от 2 до 100% «откорректированных» генов *Dmd*, что авторы связывают с тем, что геномное редактирование происходит не во всех эмбриональных клетках, а лишь в определенной группе клеток. Надо отметить, что в последующих работах на зиготах мыши и человека [22, 29, 30] все эмбрионы, подвергшиеся геномному редактированию, демонстрировали мозаицизм, что, несомненно, является существенным недостатком описываемого метода. В цитируемой работе [34] продемонстрировано, что коррекция лишь 17% аллелей гена *Dmd* приводит к увеличению дистрофин-положительных мышечных волокон до 60%, чего вполне достаточно для коррекции МДД. Интересно, что при оценке дистрофина в миофибриллах скелетной мускулатуры через 3 недели после рождения было обнаружено, что часть из них его не содержат, тогда как на 9-й неделе все миофибриллы скелетной мускулатуры были дистрофин-положительны. Для сердечной мышцы такой тенденции не отмечено. В этой же работе показано, что CRISPR/Cas9 также позволяет редактировать геном сателлитных клеток, которые являются аналогом стволовых клеток в скелетной мускулатуре и обладают способностью делиться и восстанавливать мышечную ткань. Мышей, развившихся из «отредактированных» зигот, наблюдали в течение жизни, и у них не было отмечено признаков опухолевого роста или других аномалий фенотипа [34]. Последующие работы по разработке методов лечения МДД [23–25, 35] были сосредоточены на геномном редактировании у модельных мышей постнатально (что приближает нас к клиническому использованию у человека), а также на использовании НГСК, так как геномное редактирование на основе НГР как метода репарации ДЦР ДНК происходит лишь в делящихся клетках и с меньшей частотой, чем НГСК.

Известно, что мутации в гене *DMD* также являются причиной мышечной дистрофии Беккера (МДБ, OMIM 300376), однако в данном случае они представляют собой, например, делеции без сдвига рамки считывания или миссенс-мутации, приводящие к более мягкому течению заболевания. При МДБ чаще всего происходит образование «укороченного» дистрофина, который может не в полной мере, но все же выполнять свои функции, поэтому клиническая картина мышечной дистрофии развивается позже и протекает легче, чем при МДД [36]. В связи с этим, сейчас основным подходом к коррекции мутаций в гене *DMD* при МДД является получение минимальной экспрессии белка за счет восстановления рамки считывания и достижение Беккер-подобного фенотипа. Показано, что даже низкая экспрессия дистрофина (4–15% от нормы) существенно улучшает сокращение скелетной мускулатуры и сердечной мышцы [37, 38]. В 2016 г. в одном из январских номеров журнала Science опубликованы три статьи, описывающие успешное лечение МДД *in vivo* на модели животных, выполненное тремя независимыми коллективами из США [23–25]. Все три группы исследователей применили

один и тот же подход — вырезание с помощью CRISPR/Cas9 экзона 23 гена *Dmd*, содержащего нонсенс-мутацию у линии мышей *mdx*, и сшивание экзонов 22 и 24 путем НГСК. Принципиальная схема такого подхода показана на рис. 3. Надо отметить, что такой подход возможен не только в случае мутаций в экзоне 23, но и для других экзонов гена *DMD*. Было посчитано, что суммарно около 83% пациентов с МДД могут быть излечены с использованием стратегии вырезания пораженного экзона [39]. Преимуществами такого подхода являются отсутствие необходимости использования донорной ДНК для НГР, а также более высокая частота репарации ДНК путем НГСК, по сравнению с НГР, так как последняя происходит только во время деления клетки, тогда как дифференцированные миоциты утрачивают способность к делению [40].

Во всех трех работах трандукция векторов, содержащих SpCas9 [23] или SaCas9 [24, 25] вместе с sgRNA [23] или парных gRNA [24, 25], *in vivo* проводили с использованием аденоассоциированных вирусов: AAB8 [24] или AAB9 [23, 25], имеющих тропность к скелетной мускулатуре и сердечной мышце. При исследованиях *in vitro* и *in vivo* все три коллектива продемонстрировали очень низкую неспецифическую активность Cas9 — до 1% indel в неспецифических сайтах (интроны генов *Adcy2-201* и *YIG0141A14*) [24].

Показано, что при внутримышечном введении AAB вектора с SaCas9/gRNA мышам в постнатальный период экзон 23 успешно вырезается лишь в 2% аллелей [24]. Однако такой низкой эффективности работы Cas9 и НГСК вполне достаточно для того, чтобы синтезировалось 59% [24] или 40% [25] транскриптов без этого экзона. Такое существенное увеличение доли «правильных» транскриптов дает лишь 8%-е восстановление уровня дистрофина в мышцах, по сравнению с нормой. Однако, как указано выше [37, 38], этого уровня экспрессии должно быть достаточно для клинически значимых изменений в мышцах, что и было продемонстрировано в одной из работ [24]. В исследовании С. Long с соавт. приведены более оптимистичные цифры: через 6 недель после внутримышечной инъекции в 25% миофибрилл определяли экспрессию дистрофина, при этом уровень белка составлял до 53% от нормы [23].

Несмотря на успешное восстановление уровня дистрофина в скелетной мускулатуре при внутримышечном введении, остается проблема отсутствия дистрофина в сердечной мышце, поэтому второй задачей всех трех коллективов было восстановить экспрессию гена *Dmd* путем системного введения AAB вектора (интраперитонеально [23–25], внутривенно [25] и ретроорбитально [23]) мышам в неонатальный и постнатальный периоды. Во всех работах показано восстановление экспрессии дистрофина и его функции, как в сердечной мышце, так и в скелетной мускулатуре. При этом в работе М. Tabebordbar с соавт. [25] указано, что 3–18% транскриптов из разных мышц не содержат экзон 23, а коллективу под

руководством Е. Olson [23] удалось восстановить экспрессию дистрофина в сердечной мышце до 71% и в скелетной мускулатуре до 28% от нормы.

М. Tabebordbar с соавт. [25] также показали, что как при системном, так и при внутримышечном способе введения AAB, содержащего SaCas9, успешно редактируется геном не только дифференцированных миоцитов, но также и сателлитных клеток в скелетной мускулатуре. В работе С. Long с соавт. [23] также приведены данные об отсутствии неспецифической активности Cas9 в сперматозоидах мышей мужского пола после геномного редактирования. Кроме того, коллектив провел работу по редактированию зигот мышей *mdx* и показал, что при введении плазмид непосредственно в зиготу 80% транскриптов рожденных мышей содержат делецию экзона 23 [23].

Последняя на сегодняшний день опубликованная работа [35] проводилась на модельных мышцах *mdx* в постнатальный период (1–3 день после рождения). Им вводили внутримышечно аденовирусный вектор с Cas9 и двумя gRNA, подобренными на интроны 20 и 23. В результате происходило «вырезание» не только экзона 23, в котором данные мыши имели нонсенс-мутацию, но также экзонов 21 и 22. Авторы объяснили, что им пришлось использовать такой подход, так как им не удалось подобрать высокоспецифичную gRNA на интрон 22 для вырезания только экзона 23. К сожалению, методически работа выполнена на низком уровне, авторы не приводят данные об эффективности НГСК, о количестве транскриптов без экзонов 21–23 и о неспецифической активности Cas9. Эффективность геномного редактирования была оценена только на уровне мРНК методом количественной ПЦР, где референсным геном выступал только *Gapdh*. По приведенным в статье данным, экспрессия дистрофина в миоцитах у мышей после аденовирусной трансдукции составила 50% от нормы [35]. Несмотря на существенные недостатки данного

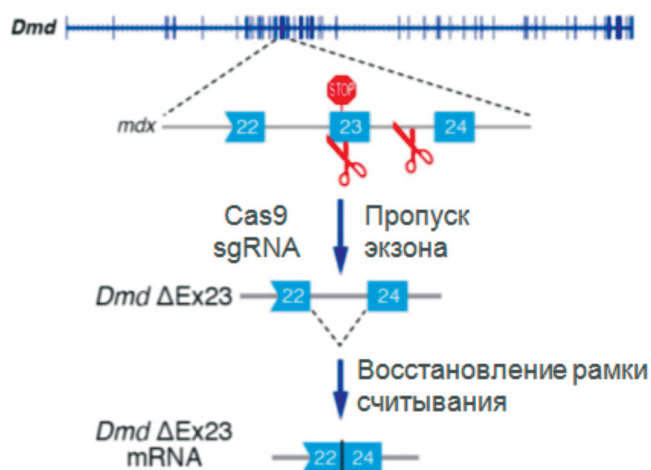


Рис. 3. Схема коррекции мутаций в гене *Dmd*. Объяснение в тексте. Из статьи С. Long с соавт. с модификациями [23].

исследования, оно все же лишний раз демонстрирует возможность геномного редактирования МДД у модельных мышей.

### Тирозинемия

Тирозинемия I типа (OMIM 276700) — аутосомно-рецессивное заболевание, сопровождающееся недостаточностью фумарилацетоацетатгидролазы (ФАГ), участвующей в метаболизме тирозина, и накоплением метаболитов-предшественников в печени, приводящим к циррозу печени, гепатоцеллюлярной карциноме и вторичной почечной недостаточности [41].

Н. Yin с соавт. [42] опубликовали результаты работы по коррекции мутации в гене *Fah* у модельных мышей *Fah5981SB*, несущих точковую мутацию в последнем нуклеотиде 8-го экзона, приводящую к нарушению сплайсинга и пропуску 8 экзона в мРНК. В результате мутации образуется укороченный и нестабильный белок ФАГ. С целью коррекции мутации была разработана система CRISPR/Cas9 с использованием ssODN в качестве донорной ДНК для НГР. При внутривенном введении мышам плазмиды, содержащей SpCas9 и sgRNA, а также ssODN, показано, что НГР успешно происходит лишь в 0,4% гепатоцитов, при этом уровень мРНК, содержащей 8 экзон, составил 8—36% от нормы. В работе продемонстрирована высокая частота (26%) формирования indel в месте специфического действия Cas9, при этом частота неспецифической активности была оценена в 0,3% [42].

Как было отмечено ранее, AAV обладает низкой пакующей способностью, не превышающей 4,5 т.п.н. [21], поэтому даже при использовании SaCas9 невозможно поместить в одну вирусную частицу нуклеазу, sgRNA и донорную ДНК для НГР. В некоторых работах показано, что использование эквивалентных количеств AAV, несущих Cas9 и sgRNA, дает высокую суммарную эффективность геномного редактирования [24]. Однако есть работы, использующие другой подход — комбинацию вирусной и невирусной доставки разных компонентов системы CRISPR/Cas9. В работе Н. Yin с соавт. [26] для лечения тирозинемии I типа у модельных мышей *Fah5981SB* использовали AAV2/8, тропный к гепатоцитам, для доставки sgRNA и донорной ДНК для НГР, тогда как SpCas9 доставляли в виде мРНК путем липофекции. По результатам иммуногистохимического анализа белок ФАГ экспрессировался в  $6,2 \pm 1,0\%$  гепатоцитов, при этом 9,5% транскриптов гена *Fah* содержали 8 экзон. Проведенное глубокое секвенирование показало низкую частоту неспецифической активности Cas9 — менее 0,3% indel [26].

### Бета-талассемия

Бета-талассемия (OMIM 613985) — наследственное клинически гетерогенное заболевание, вызываемое го-

мозиготными или компаунд-гетерозиготными мутациями в гене *HBB*. В случае мутаций нарушается продукция гемоглобина А, что приводит к аномальному эритропоэзу [43]. Исследования по разработке лечения бета-талассемии в мире сейчас проводят только на клеточных культурах [44, 45], нет ни одной работы, выполненной на модельных животных. Однако Р. Liang с соавт. в 2015 г. опубликовали статью [22] с описанием первого в мире исследования по геномному редактированию эмбрионов человека. В работе были использованы так называемые трехядерные зиготы, образованные в результате оплодотворения яйцеклетки двумя сперматозоидами в протоколе ЭКО. Такие эмбрионы нежизнеспособны и их не пересаживают матери для дальнейшего развития. Предварительно авторы сделали серию экспериментов на клеточной культуре HEK293Т, в которых получили очень оптимистичные результаты, позволившие продолжить работу уже на эмбрионах человека. Исследователи вводили в зиготу мРНК Cas9, sgRNA и ssODN и наблюдали 48 часов, после чего проводили оценку эффективности геномного редактирования методом ПЦР и секвенирования. В 52% живых эмбрионов (28 из 54) были обнаружены признаки нуклеазной активности Cas9. Однако только в 14% из них (4 из 28) произошла НГР с помощью ssODN, тогда как в большей части (25%, 7 из 28) донорной ДНК послужил эндогенный ген *HBD*, имеющий высокую гомологию с *HBB*. Кроме того, во всех четырех эмбрионах после геномного редактирования определялся генетический мозаицизм, что в перспективе делает неэффективной предимплантационную генетическую диагностику. Примечательно, что в работе были получены высокие частоты неспецифической активности Cas9 в предсказанных сайтах, тогда как предварительные эксперименты *in vitro* не показали таких результатов [22]. Низкая частота целевого геномного редактирования наряду с высокой частотой неспецифической активности, образованием мозаичных форм, а также высокой вероятностью НГР с эндогенными генами показывают, насколько осторожными необходимо быть при планировании экспериментов на эмбрионах человека.

### Недостаточность орнитинтранскарбамилазы

Недостаточность орнитинтранскарбамилазы (ОТК, OMIM 311250) — X-сцепленное рецессивное заболевание, сопровождающееся нарушением обмена в цикле мочевины и гипераммониемией. Причинами заболевания являются точковые мутации и делеции гена *OTC* [46]. Y. Yang с соавт. [27] опубликовали статью с результатами работы по геномному редактированию гена *Otc* у модельных мышей с недостаточностью ОТК (*spf<sup>ash</sup>*). В исследовании использовали AAV8 с SaCas9 в одной вирусной частице и sgRNA и донорную ДНК — в другой. Оба AAV вводили внутривенно мышам и оценивали эффект через 3 и 8 недель после введения. При введении

векторов новорожденным мышам частота образования indel в гене *Otc* в среднем была около 31%, частота НГР — 10%. В работе продемонстрировано усиление активности фермента в гепатоцитах до 20% от нормальных значений и увеличение мРНК гена *Otc* до 13% от нормы. При этом при оценке расположения гепатоцитов, экспрессирующих фермент, показано, что они расположены группами, подтверждая клональную экспансию редактированных клеток (рис. 4). В статье также приведены подробные данные о клиническом эффекте, доказывающие успешное функционирование гена *Otc* у новорожденных мышей, которым вводили все компоненты системы CRISPR/Cas9. Примечательно, что аналогичное исследование на взрослых мышах продемонстрировало значительно меньшую эффективность геномного редактирования — НГР составила от 0,3% до 1,7% в зависимости от дозы ААВ. Авторы считают, что низкая частота НГР в данном случае возникает в результате низкой пролиферации клеток печени у взрослых мышей, по сравнению с новорожденными [27].

### Гемофилия В

Гемофилия В (ОМIM 306900) — X-сцепленное рецессивное заболевание, возникающее в результате мутации в гене, кодирующем фактор свертывания крови IX (*F9*), приводящей к кровотечениям и гематомам [47]. Y. Guan с соавт. [28] опубликовали работу с результатами геномного редактирования при гемофилии В. В семье было диагностировано это заболевание, и обнаружена новая ранее не описанная мутация Y371D в гене *F9*. С помощью технологии CRISPR/Cas9 авторы создали мышиную модель с этой мутацией и доказали, что активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) у мышей с мутацией Y381D (аналог Y371D у человека) было более чем в 2 раза выше, чем у мышей с аллелем дикога типа. Далее с использованием той же технологии CRISPR/Cas9 исследователи попытались исправить эту мутацию на линии мышей, которую они создали. Авторы показали, что при введении плазмид с Cas9 мышам непосредственно в хвостовую вену частота НГР составила 0,56% при использовании ssODN и 1,5% — при использовании двуцепочечной донорной ДНК. Через 8 недель после инъекции АЧТВ в обоих случаях было достоверно ниже, чем в контроле без редактирования. Вторая часть работы была проведена с использованием аденовирусной трансдукции; вирусные векторы также вводили внутривенно в двух дозах. Показано, что через 8 недель после инъекции аденовируса в более высокой дозе частота НГР составила 5,5%, однако показатели свертывания крови не изменились. Более того, исследователи наблюдали выраженный иммунный ответ на введение аденовируса, заключавшийся в значительном повышении уровней АСТ и АЛТ. Отсутствие снижения АЧТВ авторы связывают именно с развитием такой побочной реакции на аденовирусную трансдукцию [28].

### Пигментный ретинит

Пигментный ретинит (ПР, ОМIM 268000) — генетически гетерогенное наследственное заболевание, приводящее к прогрессирующей дегенерации сетчатки. Одна из его форм (ПР 40, ОМIM 613801) развивается в результате гомозиготной или компаунд-гетерозиготной мутации в гене *PDE6B* [48]. В 2016 г. W.H. Wu с соавт. [29] опубликована статья, описывающая успешную коррекцию мутации в гене *Pde6b* с использованием CRISPR/Cas9 у линии мышей с пигментным ретинитом, вызванным нонсенс-мутацией Y347X в этом гене (*rd1*). В мышиную зиготу вводили Cas9, sgRNA и ssODN и анализировали потомство. Из 11 мышей поколения F0 лишь у двух были признаки успешного «редактирования» мутации, причем в первом случае в 35,7% клеток, а во втором — лишь в 18,8%, указывая на мозаицизм. Исследователи показали дозозависимый характер восстановления функции гена, то есть у мыши с большим процентом НГР (35,7%) ответ колбочек и палочек на раздражители был сопоставим с мышами без мутации, тогда как у второй мыши (с 18,8% НГР) ответ был значительно ниже [29].

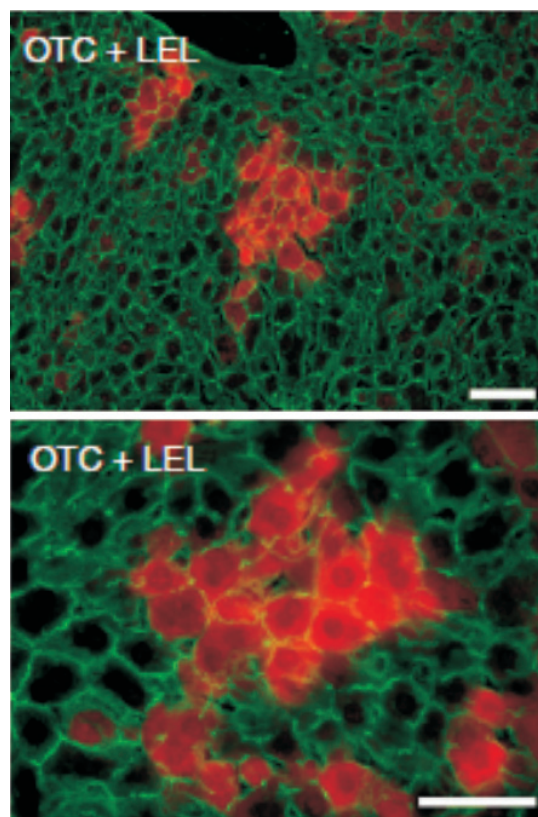


Рис. 4. Группы гепатоцитов после геномного редактирования методом CRISPR/Cas9, экспрессирующие ОТК (ОТК), по результатам иммунофлуоресцентного анализа. Красным цветом показана ОТК, зеленым — меченный лектин томата (*Lycopersicon esculentum* lectin, LEL), показывающий контуры гепатоцитов. Размер шкалы 50 мкм. Из статьи Y. Yang с соавт. [27].

### Катаракта

Наследственная форма катаракты типа 2 (OMIM 604307) — тяжелое ауtosомно-доминантное заболевание, вызываемое мутацией в гене гамма-С кристаллина *CRYGC*. Это довольно редкое заболевание, однако его тяжесть обуславливает необходимость коррекции данного состояния. Работа, опубликованная Y. Wu с соавт. [30], демонстрирует возможность редактирования мутации на мышинной модели катаракты. В данной модели делеция одного нуклеотида в гене *Crygc* вызывает сдвиг рамки считывания и преждевременное образование стоп-кодона. При этом делеция обуславливает также образование новой РАМ-последовательности для Cas9, что позволило подобрать sgRNA таким образом, чтобы она связывалась только с мутантным аллелем. В исследовании вводили мРНК Cas9 и sgRNA непосредственно в зиготу мыши и обнаружили, что 10 из 22 рожденных мышей имеют признаки геномного редактирования, причем 6 из них путем НГСК, а 4 — путем НГР с использованием эндогенного гена *Crygc* (второго аллеля), так как в зиготу не вносили матрицу для НГР. При повторе эксперимента с ssODN для НГР данные по успешному редактированию незначительно превышали результаты первого эксперимента, поэтому авторы делают вывод о необязательном введении матрицы для НГР, если в клетке есть неповрежденный аллель, как в случае ауtosомно-доминантного заболевания. При оценке неспецифического действия Cas9 показано, что лишь у 2 мышей из 12 присутствуют indel в основных предсказанных сайтах. Также авторы показали, что при скрещивании мышей с «отредактированной» мутацией и мышей без мутации, потомство наследует, в том числе, отредактированный генотип [30].

### Заключение

Приведенные выше примеры использования CRISPR/Cas9 для лечения наследственных заболеваний, безусловно, демонстрируют чрезвычайно широкие возможности и высокий потенциал для коррекции мутаций моногенных заболеваний *in vivo*. Конечно, подход по геномному редактированию зигот сложно транслировать на человека, но лечение мышей постнатально показывает очень оптимистичные результаты, позволяющие рассчитывать на скорое применение метода у человека. Вероятно, главным препятствием скорейшего перехода к клиническим исследованиям является относительно высокая частота неспецифической активности Cas9. Однако в этом направлении идет активный поиск решений, и по многим направлениям есть успехи: инженерия новых более специфичных Cas9, поиск и открытие Cas9 и Cas-подобных ферментов у других видов микроорганизмов, дизайн sgRNA и увеличение доли НГР относительно НГСК. Любопытно также, что пока нет данных о проблемах, фактически остановивших развитие генной терапии в предыдущее десятилетие — низ-

кой эффективности адресной доставки. По всей видимости, проблема становится не такой существенной при геномном редактировании, т.к. даже небольшая доля плазмид или векторов с CRISPR/Cas9, достигая целевых клеток, позволяет исправить их раз и навсегда, в отличие от классической генной терапии, при которой необходима постоянно действующая генетическая конструкция. Есть все основания полагать, что CRISPR/Cas9 станет тем методом, который позволит излечить многие наследственные заболевания.

### Список литературы

1. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Feb 6;93(3):1156-1160.
2. Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. N Engl J Med. 2014 Mar 6;370(10):901-910.
3. Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39(12):e82.
4. Reardon S. Leukaemia success heralds wave of gene-editing therapies. Nature. 2015 Nov 12;527(7577):146-147.
5. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier EA. Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-821.
6. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. Hum Mol Genet. 2014 Sep 15;23(R1):R40-46.
7. Shearer RF, Saunders DN. Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: lentivirus and alternatives. Genes Cells. 2015 Jan;20(1):1-10.
8. Wong SP, Argyros O, Harbottle RP. Sustained expression from DNA vectors. Adv Genet. 2015;89:113-152.
9. Videira M, Arranja A, Rafael D, Gaspar R. Preclinical development of siRNA therapeutics: towards the match between fundamental science and engineered systems. Nanomedicine. 2014 May;10(4):689-702.
10. Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. Cell Stem Cell. 2016 May 5;18(5):573-586.
11. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. Mol Ther. 2016 Mar;24(3):430-446.
12. Prakash V, Moore M, Yanez-Munoz RJ. Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. Mol Ther. 2016 Mar;24(3):465-474.
13. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iop* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J Bacteriol. 1987;169:5429-5433.
14. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2281-2308.
15. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. Nat Methods. 2015;12:982-988.
16. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. Mol Ther Nucleic Acids. 2015 Nov 17;4:e264.
17. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature. 2016;529:490-495.



18. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154:1380-1389.
19. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*. 2014 Jun;32(6):577-582.
20. Gaj T, Epstein BE, Schaffer DV. Genome engineering using adeno-associated virus: basic and clinical research applications. *Mol Ther*. 2016 Mar;24(3):458-464.
21. Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015 Apr 9;520(7546):186-191.
22. Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015 May;6(5):363-372.
23. Long C, Amoaasi L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. 2016 Jan 22;351(6271):400-403.
24. Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016 Jan 22;351(6271):403-407.
25. Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JK, et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2016 Jan 22;351(6271):407-411.
26. Yin H, Song CQ, Dorkin JR, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol*. 2016 Mar;34(3):328-333.
27. Yang Y, Wang L, Bell P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*. 2016 Mar;34(3):334-338.
28. Guan Y, Ma Y, Li Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol Med*. 2016 May 2;8(5):477-488.
29. Wu WH, Tsai YT, Justus S, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. 2016 May 20. doi: 10.1038/mt.2016.107. [Epub ahead of print]
30. Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2013 Dec 5;13(6):659-662.
31. Callaway E. UK scientists gain licence to edit genes in human embryos. *Nature*. 2016 Feb 4;530(7588):18.
32. Rall S, Grimm T. Survival in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*. 2012 Oct;31(2):117-120.
33. Oshima J, Magner DB, Lee JA, et al. Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements. *Hum Genet*. 2009 Sep;126(3):411-423.
34. Long C, McAnally JR, Shelton JM, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*. 2014 Sep 5;345(6201):1184-1188.
35. Xu L, Park KH, Zhao L, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx mice. *Mol Ther*. 2016 Mar;24(3):564-569.
36. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*. 1988 Jan;2(1):90-95.
37. Godfrey C, Muses S, McClorey G, et al. How much dystrophin is enough: the physiological consequences of different levels of dystrophin in the mdx mouse. *Hum Mol Genet*. 2015 Aug 1;24(15):4225-4237.
38. van Putten M, van der Pijl EM, Hulsker M, et al. Low dystrophin levels in heart can delay heart failure in mdx mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Apr;69:17-23.
39. Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat*. 2009 Mar;30(3):293-299.
40. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6th edition. New York: ; 2014. Chapter 21, Genesis and Regeneration of Skeletal Muscle; p. 1232-1235.
41. Bliksrud YT, Brodtkorb E, Andresen PA, et al. Tyrosinaemia type I — de novo mutation in liver tissue suppressing an inborn splicing defect. *J Mol Med (Berl)*. 2005 May;83(5):406-410.
42. Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014 Jun;32(6):551-553.
43. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010 Feb;12(2):61-76.
44. Xu P, Tong Y, Liu XZ, et al. Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2-654 (C>T) mutation in  $\beta$ -thalassemia-derived iPSCs. *Sci Rep*. 2015 Jul 9;5:12065.
45. Niu X, He W, Song B, et al. Combining single-strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in Beta-thalassemia-induced Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem*. 2016 Jun 10. pii: jbc.M116.719237. [Epub ahead of print]
46. Batshaw ML, Tuchman M, Summar M, et al. A longitudinal study of urea cycle disorders. *Mol. Genet. Metab*. 2014;113:127-130.
47. Goodeve AC. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis. *J Thromb Haemost*. 2015 Jul;13(7):1184-1195.
48. Veltel S, Gasper R, Eisenacher E, Wittinghofer A. The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Apr;15(4):373-380.

## Gene therapy of hereditary diseases by CRISPR/Cas9 technology *in vivo*

Smirnikhina S.A.<sup>1</sup>, Lavrov A.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — Laboratory of Mutagenesis, Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation; e-mail: smirnikhinas@gmail.com

<sup>2</sup> — Department of Molecular and Cellular Genetics, The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

Since 1970's gene therapy remains very actual, but still unachievable problem. Discover of genome editing technologies using specific nucleases gives us new possibilities in the treatment of various diseases, including monogenic disorders. This review summarizes brief characteristics of CRISPR/Cas9 method, basic principles, advantages and disadvantages of the method and provides examples of successful application of CRISPR/Cas9 to correct mutations of monogenic hereditary diseases in mouse models and human embryos.

**Key words:** CRISPR-Cas Systems; Targeted Gene Repair; Muscular Dystrophy, Duchenne; Disease Models, Animal