

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.09.3-17>

## Обзор текущих исследований по разработке генной терапии на основе геномного редактирования для лечения муковисцидоза

Смирнихина С.А.

ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова  
115522, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

Муковисцидоз (МВ) – частое моногенное заболевание, возникающее в результате мутаций в гене *CFTR*. Патогенетическая терапия, несмотря на ее высокую эффективность, подходит не всем пациентам, является пожизненной и сопряжена с побочными эффектами. В связи с этим в мире ведутся масштабные исследования, направленные на разработку этиотропной терапии МВ, в частности, основанные на геномном редактировании. В обзоре рассмотрены некоторые недостатки существующей терапии, описаны методы геномного редактирования и проанализированы опубликованные на текущий момент данные по генной терапии МВ с использованием методов геномного редактирования.

**Ключевые слова:** муковисцидоз, геномное редактирование, CRISPR-Cas, клеточные линии, F508del.

**Для цитирования:** Смирнихина С.А. Обзор текущих исследований по разработке генной терапии на основе геномного редактирования для лечения муковисцидоза. *Медицинская генетика* 2024; 23(9): 3-17.

**Автор для корреспонденции:** Смирнихина Светлана Анатольевна; e-mail: smirnikhinas@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ МГНЦ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 09.09.2024

## Review of current research on the development of gene therapy for cystic fibrosis using genome editing techniques

Smirnikhina S.A.

Research Centre for Medical Genetics  
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

Cystic fibrosis (CF) is a prevalent monogenic disease caused by mutations in the *CFTR* gene. Although pathogenetic therapy is highly effective, it is not suitable for all patients, requires lifelong treatment, and is associated with side effects. Consequently, extensive research is being conducted globally to develop etiotropic therapy for CF, particularly focusing on genome editing methods. This review explores the limitations of current therapy, outlines genome editing techniques, and evaluates all currently available data on gene therapy for CF utilizing genome editing techniques.

**Keywords:** cystic fibrosis, genome editing, CRISPR-Cas, cell lines, F508del.

**For citation:** Smirnikhina S.A. Review of current research on the development of gene therapy for cystic fibrosis using genome editing techniques. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(9): 3-17. (In Russ.)

**Corresponding author:** Svetlana A. Smirnikhina; e-mail: smirnikhinas@gmail.com

**Funding.** The study has been funded by the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**Conflict of Interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 09.09.2024

### Введение

Муковисцидоз (МВ) – тяжелое системное аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с нарушением транспорта ионов хлора. Поражения легких и желудочно-кишечного тракта обуславливают тяжесть клинической картины. Причиной МВ являются мутации в гене *CFTR*, который кодирует трансмембранный белок-регулятор проведения ионов хлора (CFTR) [1].

В норме ген *CFTR* кодирует одноименный белок, выполняющий функцию ионного канала на мембране клетки, пропускающего ионы хлора из клетки наружу [2-3]. Различают несколько классов мутаций в гене *CFTR* при МВ в зависимости от того, какие изменения белка CFTR они обуславливают. К мутациям первого класса относят нонсенс-мутации, приводящие к пол-

ному отсутствию белка на поверхности клетки. Эти мутации приводят к наиболее тяжелому течению заболевания. С повышением класса мутаций тяжесть МВ уменьшается. Мутации, относящиеся ко второму классу, ведут к нарушению транспортировки белка к мембране. К этому классу относится самая частая в Европе мутация в гене *CFTR* – F508del.

Тип мутации в гене *CFTR* неразрывно связан с возможной патогенетической терапией МВ. Прорывом в области лечения МВ стало появление *CFTR*-модуляторов (корректоров и потенциаторов), которые компенсируют последствия мутаций: корректоры улучшают созревание белка *CFTR*, потенциаторы усиливают открытие ионного канала *CFTR*. Необходимо отметить, что *CFTR*-модуляторы действуют только в том случае, если белок *CFTR* синтезируется в клетке. Если у пациента мутация *CFTR* I класса, при которой синтез белка не происходит, *CFTR*-модуляторы бесполезны.

Среди всех *CFTR*-модуляторов можно выделить Трикафта (элексакафтор, тезакафтор и ивакафтор; тройная терапия). Трикафта эффективна у пациентов, имеющих одну или две мутации из перечня в 178 патогенных вариантов, включая F508del в гомо- или гетерозиготном состоянии, начиная с 6 лет [4]. Появление тройной терапии – знаковое событие для пациентов с МВ, отмеченное премией «Прорыв» в 2023 г. [5]. Трикафта демонстрирует довольно хорошую переносимость, высокую эффективность и, что самое главное, прием препарата ведет к снижению частоты трансплантации легких пациентам с МВ за счет того, что пациенты на фоне терапии перестали соответствовать критериям направления на трансплантацию.

Несмотря на высокую эффективность тройной терапии, у большинства пациентов (около 90%) отмечаются побочные эффекты [6]. Зачастую они характеризуются легкой или умеренной степенью тяжести. Побочные эффекты включают кашель, головную боль, увеличение выделения мокроты, повышение активности печеночных ферментов, сыпь, снижение тромбоцитов [7]. Одним из неожиданных побочных эффектов является влияние на психическое здоровье: часть пациентов отмечает депрессию, около четверти (23%) сообщают о проблемах со сном после начала приема Трикафта [7-8], зарегистрированы попытки суицида на фоне приема препарата [9]. Часть пациентов вынуждена отменять терапию Трикафта или переходить на другие препараты патогенетической терапии из-за возникших побочных эффектов [7].

Важным моментом является и стоимость лечения. Препараты патогенетической терапии необходи-

мо применять пожизненно, при этом стоимость годового курса лечения Трикафта, по данным Фармацевтического вестника, составляет 21-22 млн руб. [10].

Таким образом, несмотря на очевидные плюсы терапии *CFTR*-модуляторами, разработка этиотропной терапии МВ является актуальной задачей, в теории позволяющей добиться еще большей эффективности при снижении затрат на лечение.

С тех пор как была впервые предложена концепция генной терапии [11] и установлена молекулярно-генетическая причина МВ [12] начались многолетние исследования по разработке метода лечения этого заболевания, которые, к сожалению, до сих пор не увенчались успехом [13-16]. При этом технологии генной терапии постоянно развиваются, появляются новые методы редактирования генома, имеющие свои преимущества в продолжительности эффекта [17-19], но даже это не смогло переломить ситуацию настолько, чтобы хотя бы один из разрабатываемых препаратов был одобрен для лечения. Причины неэффективности всех разработанных подходов различны и многогранны, но обусловлены преимущественно низкой эффективностью доставки генотерапевтических конструкций и быстрой их элиминацией из организма.

В ряде исследований *in vitro* показано, что для нормализации транспорта ионов хлора в эпителиальных клетках при МВ достаточно 6-20% *CFTR* экспрессирующих клеток [20-21]. Это позволяет разрабатывать генотерапию МВ с учетом не 100% эффективности доставки и активности генотерапевтических конструкций в клетках человека.

Основным разрабатываемым подходом к генотерапии МВ является генозаместительная терапия с доставкой кДНК или мРНК гена *CFTR*. Проводимые сейчас клинические исследования включают доставку кДНК с помощью адено-ассоциированных вирусов (клиническое исследование NCT05248230) и вирусов герпеса (NCT05504837). Также разрабатываются подходы по доставке мРНК гена *CFTR* в составе липосом (NCT05712538, NCT05668741, NCT03375047). Кроме того, зарегистрированы клинические исследования препарата на основе антисмысловых олигонуклеотидов для изменения сплайсинга гена *CFTR* (NCT06217952) и препаратов, направленных на ингибирование гена, кодирующего канал ENaC (*SCNN1A*), с помощью микроРНК (NCT03647228, NCT04375514). Во всех исследованиях препараты используют ингаляционно.

Доклинические исследования на основе генозаместительной терапии (доставка кДНК гена *CFTR* в составе вирусных векторов) на модельных МВ животных

(мышьях [22–23], мартышках [24], крысах [25] и свиньях [26–27]) продемонстрировали не только успешную доставку кДНК гена *CFTR*, но и восстановление функции канала *CFTR*. При использовании *CFTR*-модуляторов показано, что при восстановлении работы канала *CFTR* симптомы МВ у человека обратимы. Следовательно, генотерапия также должна быть эффективна у человека. Однако клинические исследования, проведенные ранее, демонстрируют незначительный клинический эффект [16].

Основными проблемами генозаместительной терапии МВ являются: 1) терапевтические конструкции при ингаляционном способе введения попадают преимущественно в верхние дыхательные пути, тогда как при МВ поражаются, в первую очередь, терминальные отделы легкого; 2) терапевтические конструкции попадают в терминально дифференцированные эпителиальные клетки, которые регулярно обновляются, что ведет к быстрой утрате «функционального» гена. Эти проблемы могут быть решены за счет модификации базальных клеток легкого, служащих источников терминально дифференцированных эпителиальных клеток, и за счет использования геномного редактирования для стабильного изменения генома этого типа клеток.

В конце XX века и начале XXI века появились новые молекулярно-генетические методы, позволяющие целенаправленно изменять гены, что потенциально можно использовать для создания лекарственных препаратов, в основе которых будет лежать коррекция мутаций, вызывающих заболевания.

### Методы геномного редактирования

Геномное редактирование — группа молекулярно-генетических методов, в основе которых лежит использование так называемых программируемых нуклеаз. Технологии геномного редактирования развиваются настолько стремительно, что уже сейчас это определение не совсем верно, так как существует ряд модификаций геномного редактирования с использованием нуклеаз и неактивных нуклеаз.

Классические варианты геномного редактирования нацелены на создание двухцепочечного разрыва (ДЦР) ДНК в нужном исследователю месте (например, в районе мутации, которую необходимо исправить), после чего созданный ДЦР репарируется одним из двух способов — негомологичным соединением концов (НГСК) или направленной гомологичной репарацией (НГР). При репарации путём НГР необходимо дополнительно добавлять матрицу для репара-

ции, с которой произойдет рекомбинация. При этом репарация ДНК по механизму НГСК зачастую приводит к нокауту аллеля, а по пути НГР — к рекомбинации с донорной молекулой и замещению фрагмента ДНК в области разрыва. Эти события как раз и лежат в основе направленного изменения генома с использованием методов геномного редактирования.

Существует четыре метода геномного редактирования: мегануклеазы, нуклеазы ZFN, TALEN и метод CRISPR-Cas.

Метод редактирования генома с использованием мегануклеаз является самым первым. В основе лежит использование модифицированных эндонуклеаз рестрикции, полученных из разных бактерий. Модификации эндонуклеаз заключаются во внесении мутаций в кодирующую их последовательность ДНК, меняющих конформацию фермента так, что он начинает обнаруживать специфический локус ДНК. Чаще всего используют мегануклеазы I-SceI и I-CreI. Мегануклеазы обычно работают в виде гомодимера и образуют ДЦР с липкими концами [28].

Вторым по хронологии методом геномного редактирования является технология с использованием нуклеаз цинковых пальцев (ZFNs) [29]. В качестве нуклеазы в этом методе используют фермент FokI, состоящий из двух доменов, к каждому из которых присоединен ДНК-связывающий локус, распознающий таргетный фрагмент ДНК. Структурной единицей для связывания ДНК у ZFN является аминокислота в альфа-спирали цинкового пальца. Три или реже четыре расположенные в определенных положениях аминокислотных остатка цинкового пальца распознают и связываются с тремя или реже с четырьмя основаниями целевого локуса ДНК. Таким образом, один мотив цинкового пальца обеспечивает связывание с триплетом ДНК. Обычно ДНК-распознающий домен состоит из 3–6 мотивов. ДНК-связывающие локусы подбираются на разные цепи ДНК таким образом, чтобы два домена FokI собрались в одном месте, в котором будет произведен ДЦР. В результате действия FokI образуется ДЦР с липкими концами. ZFN считается одним из самых специфичных методов геномного редактирования.

Следующим методом геномного редактирования является использование подходов с нуклеазами TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) [30]. Этот метод похож на ZFNs, отличия состоят, прежде всего, в строении ДНК-связывающего локуса. У TALEN ДНК-связывающий локус представлен повторами мономеров из 34 аминокислот. Аминокислоты, располо-

женные в положениях 12 и 13, отвечают за распознавание и связывание одного основания ДНК. Обычно ДНК-связывающий локус представлен 17,5 мономерами. Это существенно повышает размер TALEN и ограничивает его доставку в целевые клетки. В остальном метод практически идентичен ZFN: в качестве нуклеазы используется FokI, состоящий из двух доменов, к каждому из которых присоединен ДНК-связывающий локус, состоящий из аминокислотных остатков.

Среди методов геномного редактирования выделяется технология CRISPR-Cas, на основе которой разрабатывается львиная доля генотерапевтических подходов. Метод CRISPR-Cas появился в 2012 г. [31] и за 12 лет получил такое большое распространение, что в 2020 г. его создатели получили Нобелевскую премию [32]. В 2023 г. появился первый одобренный препарат, в основе которого лежит технология CRISPR-Cas, и инициировано порядка 70 клинических исследований (КИ) [33] по лечению разных заболеваний человека с использованием этого метода.

В классическом варианте CRISPR-Cas используют нуклеазы – ферменты, расщепляющие обе нити ДНК. Cas9 состоит из двух доменов (HNH и RuvC), обладающих способностью создавать разрыв. Если внести мутацию в один из этих доменов, то нуклеазу можно превратить в никазу (nCas9) – фермент, создающий одноцепочечный разрыв ДНК. При этом существуют два варианта nCas9 – с мутациями в одном (D10A – RuvC) или другом домене (H840A – HNH). При внесении мутаций в оба режущих домена Cas9 получают неактивную форму (dead Cas9 или dCas9).

Основным свойством никазы и неактивной формы Cas9 является возможность присоединения различных белков, которые будут функционировать в целевом локусе. Таким образом эти модификации можно использовать для целевого воздействия на определенный регион, внося в него однонитевые разрывы или не внося разрывов вовсе. Основными методами, в основе которых лежит использование никаза и неактивных Cas9, являются редакторы оснований, праймированное и эпигенетическое редактирование.

Редакторы оснований – модификация CRISPR-Cas, позволяющая целебно корректировать геном без расщепления ДНК. Это достигается путем слияния nCas9 (или в некоторых случаях dCas9) с белками, позволяющими конвертировать цитозин в тимин (цитозиновые редакторы) [18] или аденин в гуанин (адениновые редакторы) [34].

Существует несколько поколений редакторов оснований, их совершенствование заключается, прежде

всего, в уменьшении так называемого окна редактирования – той области, в которой происходит замена нуклеотида. Первые редакторы оснований отличались довольно широким окном редактирования, тогда как последующие имели уже меньшие окна. Кроме того, модификации редакторов оснований используют различные молекулы, потенцирующие конверсию [35].

В целом, каждая последующая модификация редакторов оснований является более точной и специфичной, чем ранние. Сейчас в арсенале исследователей имеется несколько десятков редакторов оснований, которые могут быть использованы в том числе и для генной терапии. Основным преимуществом этой методики является то, что в процессе редактирования не создается двухцепочечный разрыв, в связи с этим частота ошибок при репарации ДНК заметно снижается, как в локусе редактирования, так и за его пределами в случае неспецифического действия CRISPR-Cas. При использовании редакторов, которые работают через создание однонитевых разрывов, репарация осуществляется по механизму эксцизионной репарации оснований, который более точен, и следовательно более безопасен с точки зрения создания нецелевых изменений генома. С помощью редакторов оснований можно корректировать несколько типов точечных мутаций, включая нонсенс-мутации (например, W1282X) в гене *CFTR* [36].

Праймированное редактирование (prime editing) – относительно новая модификация CRISPR-Cas, описанная впервые в 2019 г. [19]. Основное отличие этой методики, которое также является и преимуществом, – это использование никазы nCas9, слитой с обратной транскриптазой, что позволяет строить на месте матрицу для восстановления правильной последовательности ДНК. Для этого используется сконструированная особым образом направляющая РНК, в данном случае она называется pegRNA (от prime editing guide RNA). PegRNA состоит из sgRNA (стандартной направляющей РНК для распознавания целевого участка ДНК), а также из двух других вариативных частей: PBS (primer binding site, сайт начала синтеза кДНК) и RT template (матрица для обратной транскриптазы). Наличие этих двух элементов позволяет на месте синтезировать матрицу для рекомбинации, которая встраивается в место одноцепочечного разрыва ДНК. Необходимо отметить, что праймированное редактирование позволяет корректировать практически все типы мутаций, за исключением делеций, дупликаций, инверсий и инсерций, превышающих 50 нуклеотидов, поэтому может явиться универсальным методом для лечения многих заболеваний.

Основным клинически значимым преимуществом методов геномного редактирования является необратимость изменений генома, которая потенциально может обуславливать необходимость однократного введения/применения препарата для стабильного клинического эффекта. Необходимость повторных введений генотерапевтических препаратов сопряжена не только с итоговой высокой стоимостью лечения, но также и с побочными эффектами, включая иммунный ответ на вектор. Однократность введения препарата позволяет минимизировать стоимость и побочные эффекты.

Методы геномного редактирования, включая новые модификации CRISPR-Cas, демонстрируют довольно высокую эффективность, особенно при нокауте генов. Именно это обстоятельство вкупе с подходом *ex vivo* позволило первому препарату на основе геномного редактирования для лечения бета-талассемии и серповидно-клеточной анемии получить одобрение FDA в 2023 г. [37].

Генетические редакторы могут быть доставлены в клетку в виде ДНК, мРНК, комплексов белок-РНК и различных комбинаций этих подходов. Это позволяет подобрать наиболее эффективный и безопасный метод доставки, например, липидные наночастицы [38].

Многообразие инструментов геномного редактирования, ортологов нуклеаз, модификаций нуклеаз и белков, соединенных с ними, позволяет использовать методы редактирования генома для решения многих задач.

### **Клеточные объекты для разработки генной терапии МВ**

Клеточные модели, на которых проводятся исследования генной терапии МВ, можно разделить на индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), 2D и 3D-модели. Исследования на ИПСК от пациентов с МВ проводят в том случае, когда необходимо получить клон отредактированных клеток, затем, после его дифференцировки в разные типы CFTR-экспрессирующих клеток, продемонстрировать восстановление работы канала CFTR [39-40].

Чаще всего этап исследования *in vitro* проводят на 2D-культурах. Иммуортиализованные клеточные линии от пациентов с МВ являются наиболее часто используемыми клеточными моделями для разработки генотерапевтических подходов. Они представляют собой эпителиальные клетки бронхов или трахеи от пациентов с МВ, подвергшиеся иммуортиализации с помощью различных вирусных генов [41-42]. Второй по частоте

использования клеточной моделью являются первичные клетки, полученные при биопсии дыхательных путей пациентов с МВ. Зачастую проводят биопсию тканей верхних дыхательных путей, поэтому наиболее доступными являются клетки назального и бронхиального эпителия. Эти клетки довольно просто получить, и они пригодны для небольших (не длительных) экспериментов [43-45].

Наконец, 3D-клеточные модели включают в себя кишечные органоиды [46-47], а также бронхиальные и легочные органоиды, полученные из ИПСК [48-49]. Основным преимуществом 3D-моделей является гетерогенный клеточный состав, схожий с тем, что встречается в целом органе человека, например, легком или кишечнике. Разработанные функциональные тесты на 3D-моделях позволяют быстро оценить эффективность восстановления канала CFTR [49-50].

При выборе объекта исследования необходимо руководствоваться не только тем, экспрессирует ли клетка CFTR, но также и тем, насколько быстро генетически модифицированная клетка будет элиминирована из организма. Время жизни отредактированных клеток определяет, как быстро потребуются повторное введение генотерапевтического препарата. С этой точки зрения особый интерес представляют базальные клетки легкого — это клетки, из которых образуются все более дифференцированные типы эпителиальных клеток легкого. Редактировав мутацию в базальных клетках легкого, можно ожидать, что клинический эффект будет длительным за счет того, что эти клетки сами по себе экспрессируют CFTR, а также служат источником всех других типов клеток легкого [51]. Этот тип клеток можно получить путем дифференцировки из ИПСК (в виде 2D модели), также они входят в состав бронхиальных и легочных органоидов.

Основным разрабатываемым подходом генотерапии МВ является *in vivo* терапия, при которой препарат вводят непосредственно в организм пациента. Есть ряд работ, проведенных на мышах, демонстрирующих потенциал *ex vivo* терапии, то есть трансплантации модифицированных клеток легкого. Несмотря на то, что в целом, такой подход показывает хорошие результаты, он сопряжен с дополнительным повреждением легкого нафталеном [48] или блеомицином [52] с последующим облучением легкого для того, чтобы элиминировать стволовые и прогениторные клетки из легких. Показано, что если этого не сделать, то регенерация легкого будет идти преимущественно за счет собственных клеток, а не донорских [53]. Также есть работы, показывающие, что гемопоэтические стволовые клетки

(ГСК, CD34+ клетки) не могут быть применены для *ex vivo* терапии МВ, так как после трансплантации ГСК с *Cftr* дикого типа в легких нокаутных *Cftr* мышей находят единичные *Cftr*+ клетки [54].

ИПСК после редактирования сами по себе не могут быть трансплантированы, так как доказано, что они вызывают образование тератом [55]. Для минимизации риска развития тератом необходима 100% терминальная дифференцировка всех ИПСК в культуре, потому что не полностью дифференцированные клетки (производные ИПСК) также могут приводить к развитию тератом [56]. В связи с этим рекомендуется включать этап селекции терминально дифференцированных клеток для последующей трансплантации. Предсказать долгосрочные последствия трансплантации производных ИПСК сейчас не представляется возможным, так как нет достаточного количества проведенных исследований.

### Геномное редактирование для лечения МВ

По состоянию на июль 2024 г. не инициировано ни одного КИ по лечению МВ с использованием технологий редактирования генома. Подавляющее большинство исследований сейчас находится на стадии *in vitro* – проведение экспериментов на клеточных моделях от пациентов, часть исследований проводится на модельных животных. Сводные данные по опубликованным результатам исследований на клеточных моделях представлены в **таблице**.

В силу актуальности исследований по коррекции мутаций в гене *CFTR*, включая самую частую в Европе F508del, по состоянию на июль 2024 г. опубликовано довольно много работ, демонстрирующих разные результаты. Первые исследования в этой области были мало эффективными, исследователям редко удавалось получить эффективность исправления мутации F508del в разных клетках выше 2% [42; 57-68]. Такого эффекта, безусловно, недостаточно для использования методов геномного редактирования в клинике. Однако недавние исследования по коррекции мутации F508del в ИПСК [69] и в базальных стволовых клетках верхних дыхательных путей [43] показали многообещающие результаты. Обе исследовательские группы использовали электропорацию белка Cas9 и направляющей РНК. Первая группа добавила одноцепочечную донорную молекулу ДНК к смеси для электропорации и получила 12,7% отредактированных с помощью НГР аллелей *CFTR* [69]. Вторая группа доставила НГР-матрицу с использованием вектора AAV6 и добилась 41% эф-

фективности коррекции мутации F508del [43]. Одной из последних по хронологии работ по редактированию мутации F508del в гене *CFTR* стало исследование Wei T. с соавт. [44], в котором показана 16% эффективность коррекции мутации в первичных эпителиальных клетках бронхов от пациентов с МВ при невирусной доставке. Перечисленные исследования показывают, что технология CRISPR-Cas постоянно развивается и совершенствуется, особенно с появлением новых методов доставки нуклеиновых кислот в клетку. Зачастую именно высокая эффективность доставки обеспечивает высокую эффективность редактирования.

Метод праймированного редактирования также был апробирован для коррекции мутации F508del в гене *CFTR*, однако показал низкую эффективность в кишечных органоидах от пациентов с МВ [68]. При этом, при коррекции мутаций с.680T>G (L227R) и с.3909C>G (N1303K) показано значимое улучшение проводимости канала *CFTR* в кишечных органоидах и первичных базальных клетках из назального эпителия. В этой работе были использованы различные модификации праймированного редактирования, доставленные с помощью лентивирусных векторов [70].

Начиная с 2017 г. исследователи всего мира стали активно проводить исследования по редактированию нонсенс мутаций и мутаций сплайсинга в гене *CFTR* [36; 39-41; 45; 71-83]. Основная часть работ приходится на 2022-2023 гг., что, вероятно, связано с высокой эффективностью и доступностью тройной терапии МВ у пациентов с мутацией F508del, в то время как пациенты с нонсенс мутациями и мутациями сплайсинга остаются без лечения.

Большинство исследований связано с редактированием мутации W1282X, что обусловлено ее относительно высокой частотой в мире и накоплением в Израиле [84-87]. Наилучших результатов удалось добиться научным коллективам Santos L. с соавт. [76] – 17,7±2,1% при использовании классического подхода CRISPR-Cas с донорной молекулой и Krishnamurthy S. с соавт. [41] – 69% при использовании аденинового редактора оснований. Мутацию W1282X также пытались редактировать методом праймированного редактирования, доставленного аденовирусным вектором в эпителиальные клетки дыхательных путей, полученные из ИПСК, с эффективностью в 2,5% аллелей [78].

Также соответствующие исследования проводятся в отношении нонсенс мутаций R785X, R553X и G542X [36; 41; 77; 83].

Что касается мутаций сплайсинга, то в мире сейчас проводятся исследования, направленные на кор-

**Таблица.** Результаты исследований по коррекции мутаций в гене *CFTR* в клеточных культурах человека методами геномного редактирования

**Table.** The results of research on the correction of mutations in the *CFTR* gene in human cell cultures by genomic editing methods

	Способ доставки в клетки	Мутация в гене <i>CFTR</i>	Объект (клеточная культура)	Эффективность коррекции мутации	Библиографическая ссылка
<i>Метод геномного редактирования ZFN</i>					
1	Трансфекция плазмид с ZFN	F508del	Клетки линии Flp-In T-REx 293	1,2% аллелей	[88]
2	Трансфекция плазмид с ZFN с использованием липофекции (Липофектамин 2000)	F508del	Клетки линии бронхиально-го эпителия человека (Human bronchial epithelial (HBE))	До 1% аллелей	[57]
			Клетки эпителия трахеи больного МВ (cystic fibrosis tracheal epithelial (CFTE))	До 1% аллелей	
3	Трансфекция плазмид с ZFN с использованием липофекции (TransIT transfection reagent)	Попытка интегрировать кДНК гена <i>CFTR</i> в локус <i>CCR5</i>	ИПСК	Единичные колонии	[89]
4	Нуклеофекция плазмид с ZFN	$\Delta F508/\Delta I507$	ИПСК	Единичные колонии	[60]
5	Трансфекция плазмид с ZFN с использованием липофекции (Липофектамин 2000)	F508del	Клеточная линия CFBE41o-	До 10% аллелей	[42]
6	Электропорация мРНК ZFN и ssODN	F508del	Базальные клетки легкого	10,6% $\pm$ 2,6% аллелей	[65]
	Электропорация мРНК ZFN + AAB6			31,0% $\pm$ 4,0% аллелей	
		Попытка интегрировать супер-экзон (9-27) кДНК гена <i>CFTR</i> в локус <i>CFTR</i>		56,5% $\pm$ 7,4% аллелей	
<i>Метод геномного редактирования TALEN</i>					
7	Нуклеофекция плазмид с TALEN	F508del	ИПСК	Единичные колонии	[62]
8	Электропорация плазмид с TALEN (прибор Neon)	F508del	ИПСК	Единичные колонии	[63]
9	Трансдукция с помощью хелпер-зависимого аденовирусного вектора	Попытка интегрировать мини-ген <i>CFTR</i> в локус <i>CFTR</i>	Эпителиальные клетки дыхательных путей IB3-1	Около 5% аллелей	[90]
10	Нуклеофекция плазмид с TALEN (прибор Lonza)	F508del	ИПСК	Единичные колонии	[66]
<i>Метод геномного редактирования CRISPR-Cas (классический вариант с гомологичной рекомбинацией)</i>					
11	Трансфекция плазмид с CRISPR-Cas9 с использованием липофекции (Липофектамин 2000)	F508del	Кишечные органоиды	Единичные колонии	[58]
12	Нуклеофекция плазмид с CRISPR-Cas9 (прибор Lonza)	F508del	ИПСК	Единичные колонии	[59]
13	Трансфекция плазмид с CRISPR-Cas9 с использованием липофекции (Липофектамин 2000)	F508del	Клетки эпителия трахеи больного МВ (cystic fibrosis tracheal epithelial (CFTE))	1,9% аллелей	[61]

Продолжение таблицы см. на стр. 10

	Способ доставки в клетки	Мутация в гене <i>CFTR</i>	Объект (клеточная культура)	Эффективность коррекции мутации	Библиографическая ссылка
14	Трансфекция плазмид с CRISPR-Cas9 с использованием липофекции (Transfex)	F508del	Базальные клетки эпителия бронхов человека (human bronchial epithelial basal cells (HBECS))	Единичные колонии	[64]
15	Трансдукция лентивирусным вектором с CRISPR-Cas9	3272-26A>G и 3849+10kbC>T	Первичные эпителиальные клетки дыхательных путей	1,4% аллелей	[72]
			Кишечные органоиды	0,9% аллелей	
16	Электропорация и трансфекция RNP с использованием липофекции (Липофектамин 2000)	F508del	ИПСК	12,7% аллелей и 22,0% клеток	[69]
17	Электропорация (нуклеофекция) RNP и доставка донорной молекулы с помощью AAB6	F508del	Базальные стволовые клетки верхних дыхательных путей (upper-airway basal stem cells (UABCs))	28% ± 5% аллелей	[43]
			Эпителиальные клетки бронхов человека (human bronchial epithelial cells (HBECS))	41% ± 4% аллелей	
		F508del/другая мутация	Базальные стволовые клетки верхних дыхательных путей (upper-airway basal stem cells (UABCs))	42% ± 15% аллелей	
18	Аденовирусная трансдукция компонентов CRISPR-Cas	ΔF508/ΔI507	ИПСК	0,2% аллелей	[67]
19	Электропорация (Neon) RNP и ssODN	W1282X	Эпителиальные клетки бронхов человека (human bronchial epithelium (HBE))	17,7±2,1% (HiFi-SpCas9)	[76]
				8,7±0,5% (AsCas12a (Cpf1))	
20	Нуклеофекция плазмид с CRISPR-Cas и донорной молекулы (прибор Lonza)	W1282X	ИПСК	Единичные колонии, селекция на антибиотике	[39]
21	Нуклеофекция плазмид с CRISPR-Cas и донорной молекулы	W1282X	ИПСК	До 10% колоний с селекцией на антибиотике	[40]
22	Липидные наночастицы (DOTAP10 LNPs) с мРНК Cas9, sgRNA и донорной молекулой	F508del	Первичные эпителиальные клетки бронхов человека (HBE)	16% аллелей	[44]
23	Электропорация RNP и AAB доставка донора	Попытка интегрировать кДНК гена <i>CFTR</i> с геном селекции в локус <i>CFTR</i>	Базальные клетки легкого	После сортировки – от 56 до 97% аллелей, в зависимости от линии	[91]
<b>Метод геномного редактирования CRISPR-Cas (редакторы оснований)</b>					
24	Электропорация плазмид с CRISPR-Cas9 (прибор NEPA21)	Нонсенс-мутации R785X, W1282X, R553X, R1162X	Кишечные органоиды	R785X – 8,88% аллелей (SpCas9-ABE) W1282X – 1,43% аллелей, R553X – 1,43% аллелей и R1162X – 8% аллелей (все xCas9-ABE)	[36]

Продолжение таблицы см. на стр. 11

	Способ доставки в клетки	Мутация в гене <i>CFTR</i>	Объект (клеточная культура)	Эффективность коррекции мутации	Библиографическая ссылка
25	Нуклеофекция плазмид с ABE7.10-SpCas9-NG (прибор Lonza)	Нонсенс-мутации R553X и W1282X, мутация сплайсинга 3849+10kb C>T	CuFi-3 и первичные клетки	от 38 до 82% аллелей в зависимости от мутации	[41]
26	Лентивирусный вектор с NG-ABEmax, NG-ABE8.20m, NG-ABE8e	2789+5G>A	Кишечные органоиды	10% аллелей	[79]
27	Электропорация мРНК NG-ABEmax			5% аллелей	
28	Электропорация плазмид с NG-ABEmax (прибор Neon)	W1282X	Первичные эпителиальные назальные клетки (HNEs)	27% аллелей	[45]
29	Электропорация плазмид с NRCH-ABE8e (прибор Neon)	с.2988+1G>A (3120+1G>A)	Эпителиальные клетки бронхов человека (human bronchial epithelium (HBE))	28% аллелей	[81]
	Электропорация мРНК с NRCH-ABE8e (прибор Neon)			90% аллелей	
30	Амфифильный челночный пептид S315 с ABE8e-Cas9 NG (RNP)	R553X	Первичные эпителиальные клетки дыхательных путей	5% аллелей	[83]
Метод геномного редактирования CRISPR-Cas (праймированное редактирование)					
31	Электропорация плазмид с CRISPR-Cas (прибор NEPA21)	F508del	Кишечные органоиды	Единичные органоиды	[68]
32	Аденовирусная доставка CRISPR-Cas	W1282X	Эпителиальные клетки дыхательных путей, полученные из ИПСК	2,5% аллелей	[78]
33	Лентивирусный вектор с CRISPR-Cas	с.3909C>G (N1303K)	Кишечные органоиды	Значимое увеличение площади органоидов после редактирования	[70]
		с.680T>G (L227R)	Первичные эпителиальные назальные клетки (HNEs)		
		с.3909C>G (N1303K)	Кишечные органоиды	2,3% проводимость CFTR от нормального уровня	
		с.680T>G (L227R)	Первичные эпителиальные назальные клетки (HNEs)	29,4% проводимость CFTR от нормального уровня	
		G542X	Линия клеток 16HBE-G542X		

**Примечание:** CFBE41o- – Cystic fibrosis bronchial epithelial 41o- (клетки бронхов трахеи больного MB), CFTE – Cystic fibrosis tracheal epithelial (клетки эпителия трахеи больного MB), HBE – Human bronchial epithelial (клетки линии бронхиального эпителия человека), HBECs – Human bronchial epithelial basal cells (базальные клетки эпителия бронхов человека), HNEs – Human nasal epithelial (первичные эпителиальные назальные клетки), LNPs – Lipid nanoparticles (липидные наночастицы), RNP – Ribonucleoprotein (рибонуклеопротеин), sgRNA – single guide RNA (единая направляющая РНК), ssODN – Single-stranded oligodeoxynucleotide (одноцепочечный олигодезоксирибонуклеотид), TALEN – Transcription activator-like effector nucleases (эффektorные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции), UABCs – Upper-airway basal stem cells (базальные стволовые клетки верхних дыхательных путей), ZFN – Zink Finger Nucleases (нуклеазы цинковых пальцев), AAV6 – Аденоассоциированный вирус серотипа 6, ИПСК – Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, кДНК – Комплементарная ДНК, мРНК – Матричная РНК

рекция мутаций с.1679+1634A>G (1811+1.6kbA>G), с.2657+5G>A (2789+5G>A), с.2988+1G>A (3120+1G>A), с.3140-26A>G (3272-26A>G), с.3718-2477C>T (3849+10kbC>T) [41; 71-73; 79-81], демонстрирующие эффективность от 1,4% до 90%.

Обращает на себя внимание факт, что последние публикации с использованием методов ZFN и TALEN для редактирования мутаций в гене *CFTR* датируются 2020 г., после которого подобные исследования не публиковались [65-66].

Таким образом, видно, что исследования, связанные с разработкой генной терапии на основе технологий редактирования генома, проводятся довольно интенсивно. Если раньше в фокусе исследователей преимущественно была самая частая мутация при МВ (F508del), то сейчас предпочтение отдают более редким мутациям. Также можно отметить, что современные модификации CRISPR-Cas вышли на первый план и занимают лидирующие позиции в списке методов, на основе которых разрабатываются генотерапевтические подходы для МВ. Это связано, безусловно, с их высокой безопасностью, точностью и эффективностью.

### Заключение

Генная терапия наследственных заболеваний сейчас активно развивается. Между тем, все еще существуют моногенные болезни, для которых такое лечение не разработано, несмотря на многочисленные клинические исследования разных генотерапевтических подходов. Одним из таких заболеваний является МВ. Появление методов геномного редактирования позволяет создавать лекарственные препараты и терапевтические технологии на основе коррекции мутации, вызывающей заболевание. Разработка таких терапевтических решений сейчас также активно ведется как в отношении МВ, так и других наследственных заболеваний. В ноябре 2023 года был одобрен первый препарат на основе редактирования генома для лечения серповидно-клеточной анемии и бета-талассемии. Пока ни одна из разработок на основе редактирования генома для лечения МВ не дошла до стадии КИ, однако в мире проводится несколько десятков исследований на доклинической стадии. Эволюция методов геномного редактирования привела к появлению высокоточных и эффективных методов – редакторов оснований и праймированного редактирования. Возможно, именно на основе этих платформ будут разработаны лекарственные препараты генной терапии МВ.

### Литература

1. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 2013; 22: 58-65.
2. Berger H.A., Anderson M.P., Gregory R.J. et al. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 1422-31.
3. Choi J.Y., Muallem D., Kiselyov K. et al. Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub>-transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 2001; 410: 94-7.
4. Vertex Pharmaceuticals Incorporated. Trikafta (elexacaftor, tezacaftor, and ivacaftor tablets; ivacaftor tablets) [package insert]. U.S. Food and Drug Administration website. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2021/212273s0041bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/212273s0041bl.pdf). Revised June 2021. Accessed January 21, 2024.
5. Merali Z. Life-changing cystic fibrosis treatment wins US\$3-million Breakthrough Prize. *Nature*. 2023 Sep;621(7979):450-451. doi: 10.1038/d41586-023-02890-1.
6. Bacalhau M., Camargo M., Magalhães-Ghiotto G.A.V., et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor: A Life-Changing Triple Combination of CFTR Modulator Drugs for Cystic Fibrosis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Mar 8;16(3):410. doi: 10.3390/ph16030410.
7. Manciuoli T., Bresci S., Mencarini J., et al. Prevalence of adverse events in cystic fibrosis patients treated with elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor: Experience of the regional referral center in Tuscany, Italy. *Pediatr Pulmonol.* 2023 Dec;58(12):3626-3629. doi: 10.1002/ppul.26673.
8. Zhang L., Albon D., Jones M., Bruschiwein H. Impact of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor on depression and anxiety in cystic fibrosis. *Ther Adv Respir Dis.* 2022 Jan-Dec;16:17534666221144211. doi: 10.1177/17534666221144211.
9. Arslan M., Chalmers S., Rentfrow K., et al. Suicide attempts in adolescents with cystic fibrosis on Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor therapy. *J Cyst Fibros.* 2023 May;22(3):427-430. doi: 10.1016/j.jcf.2023.01.015.
10. Калиновская Е. В России зарегистрирован тройной комбинированный препарат от муковисцидоза, Фармацевтический вестник, 19.06.2023, <https://pharmvestnik.ru/content/news/V-Rossii-zaregistrirovan-troinoi-kombinirovannyi-preparat-ot-mukoviscidoza.html>. Дата доступа: 23.01.2024
11. Aposhian H.V. The use of DNA for gene therapy--the need, experimental approach, and implications. *Perspect Biol Med.* 1970 Autumn;14(1):98-108. doi: 10.1353/pbm.1970.0011.
12. Collins F.S., Riordan J.R., Tsui L.C. The cystic fibrosis gene: isolation and significance. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1990 Oct 15;25(10):47-57. doi: 10.1080/21548331.1990.11704019.
13. Aitken M.L., Moss R.B., Waltz D.A., et al. A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther.* 2001 Oct 10;12(15):1907-16. doi: 10.1089/104303401753153956.
14. Flotte T.R., Schwiebert E.M., Zeitlin P.L., Carter B.J., Guggino W.B. Correlation between DNA transfer and cystic fibrosis airway epithelial cell correction after recombinant adeno-associated virus serotype 2 gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2005 Aug;16(8):921-8. doi: 10.1089/hum.2005.16.921.
15. Flotte T.R., Zeitlin P.L., Reynolds T.C., et al. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther.* 2003 Jul 20;14(11):1079-88. doi: 10.1089/104303403322124792.
16. Alton E.W.F.W., Armstrong D.K., Ashby D., Bayfield K.J., Bilton D., Bloomfield E.V., et al. A randomised, double-blind, placebo-controlled

- trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis. *Efficacy Mech Eval* 2016;3(5) doi: 10.3310/eme03050
17. Cox D.B., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015 Feb;21(2):121-31. doi: 10.1038/nm.3793.
  18. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016 May 19;533(7603):420-4. doi: 10.1038/nature17946.
  19. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019 Dec;576(7785):149-157. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.
  20. Farmen S.L., Karp P.H., Ng P., et al. Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl-transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Dec;289(6):L1123-30. doi: 10.1152/ajplung.00049.2005.
  21. Johnson L.G., Olsen J.C., Sarkadi B., et al. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet.* 1992 Sep;2(1):21-5. doi: 10.1038/ng0992-21.
  22. Limberis M., Anson D.S., Fuller M., Parsons D.W. Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dose lentivirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther.* 2002 Nov 1;13(16):1961-70. doi: 10.1089/10430340260355365. Erratum in: *Hum Gene Ther.* 2002 Nov 20;13(17)2112.
  23. Stocker A.G., Kremer K.L., Koldej R., et al. Single-dose lentiviral gene transfer for lifetime airway gene expression. *J Gene Med.* 2009 Oct;11(10):861-7. doi: 10.1002/jgm.1368.
  24. Farrow N., Cmielewski P., Delhove J., et al. Towards Human Translation of Lentiviral Airway Gene Delivery for Cystic Fibrosis: A One-Month CFTR and Reporter Gene Study in Marmosets. *Hum Gene Ther.* 2021 Aug;32(15-16):806-816. doi: 10.1089/hum.2020.267.
  25. Reyne N., Cmielewski P., McCarron A., et al. Single-Dose Lentiviral Mediated Gene Therapy Recovers CFTR Function in Cystic Fibrosis Knockout Rats. *Front Pharmacol.* 2021 May 18;12:682299. doi: 10.3389/fphar.2021.682299.
  26. Cooney A.L., Abou Alaiwa M.H., Shah V.S., et al. Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs. *JCI Insight.* 2016 Sep 8;1(14):e88730. doi: 10.1172/jci.insight.88730.
  27. Cooney A.L., Singh B.K., Loza L.M., et al. Widespread airway distribution and short-term phenotypic correction of cystic fibrosis pigs following aerosol delivery of piggyBac/adenovirus. *Nucleic Acids Res.* 2018 Oct 12;46(18):9591-9600. doi: 10.1093/nar/gky773.
  28. Trimidal S. G., Benjamin R., Bae J. E., et al. Can Designer Indels Be Tailored by Gene Editing?. *BioEssays* 2019, 41, 1900126. <https://doi.org/10.1002/bies.201900126>
  29. Kim Y.G., 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.
  30. Cermak T., Doyle E.L., 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.
  31. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):816-821.
  32. Mullard A. CRISPR pioneers win Nobel prize. *Nat Rev Drug Discov.* 2020 Dec;19(12):827. doi: 10.1038/d41573-020-00198-7.
  33. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, <https://clinicaltrials.gov> (дата доступа 18.01.2024 г.)
  34. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., et al. Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* 2017 Nov 23;551(7681):464-471. doi: 10.1038/nature24644. Erratum in: *Nature.* 2018 May 2.
  35. Rees H.A., Liu D.R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells [published correction appears in *Nat Rev Genet.* 2018 Oct 19;]. *Nat Rev Genet.* 2018;19(12):770-788. doi:10.1038/s41576-018-0059-1
  36. Geurts M.H., de Poel E., Amatngalim G.D., et al. CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank. *Cell Stem Cell.* 2020 Apr 2;26(4):503-510.e7. doi: 10.1016/j.stem.2020.01.019. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32084388.
  37. Philippidis A. CASGEVY Makes History as FDA Approves First CRISPR/Cas9 Genome Edited Therapy. *Hum Gene Ther.* 2024 Jan;35(1-2):1-4. doi: 10.1089/hum.2023.29263.bfs.
  38. Gillmore J.D., Gane E., Taubel J., et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2021 Aug 5;385(6):493-502. doi: 10.1056/NEJMoa2107454.
  39. Suzuki S., Chosa K., Barilla C., et al. Seamless Gene Correction in the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Locus by Vector Replacement and Vector Insertion Events. *Front Genome Ed.* 2022 Apr 6;4:843885. doi: 10.3389/fgeed.2022.843885.
  40. Cuevas-Ocaña S., Yang J.Y., Aushev M., et al. A Cell-Based Optimised Approach for Rapid and Efficient Gene Editing of Human Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 17;24(12):10266. doi: 10.3390/ijms241210266.
  41. Krishnamurthy S., Traore S., Cooney A.L., et al. Functional correction of CFTR mutations in human airway epithelial cells using adenine base editors. *Nucleic Acids Res.* 2021 Oct 11;49(18):10558-10572. doi: 10.1093/nar/gkab788.
  42. Bednarski C., Tomczak K., Vom Hövel B., et al. Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model. *PLoS One* 2016; 11(8): e0161072.
  43. Vaidyanathan S., Salahudeen A.A., Sellers Z.M., et al. High-Efficiency, Selection-free Gene Repair in Airway Stem Cells from Cystic Fibrosis Patients Rescues CFTR Function in Differentiated Epithelia. *Cell Stem Cell.* 2020 Feb 6;26(2):161-171.e4. doi: 10.1016/j.stem.2019.11.002.
  44. Wei T., Sun Y., Cheng Q., et al. Lung SORT LNPs enable precise homology-directed repair mediated CRISPR/Cas genome correction in cystic fibrosis models. *Nat Commun.* 2023 Nov 11;14(1):7322. doi: 10.1038/s41467-023-42948-2.
  45. Mention K., Cavusoglu-Doran K., Joynt A.T., et al. Use of adenine base editing and homology-independent targeted integration strategies to correct the cystic fibrosis causing variant, W1282X. *Hum Mol Genet.* 2023 Nov 17;32(23):3237-3248. doi: 10.1093/hmg/ddad143.
  46. Dekkers J.F., Wiegierinck C.L., de Jonge H.R., et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med.* 2013 Jul;19(7):939-45. doi: 10.1038/nm.3201.
  47. Sato T., Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science.* 2013 Jun 7;340(6137):1190-4. doi: 10.1126/science.1234852.
  48. Miller A.J., Hill D.R., Nagy M.S., et al. In Vitro Induction and In Vivo Engraftment of Lung Bud Tip Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2018 Jan 9;10(1):101-119. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.012.
  49. Demchenko A., Kondratieva E., Tabakov V., et al. Airway and Lung Organoids from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Used to Assess CFTR Conductance. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6293. <https://doi.org/10.3390/ijms24076293>.
  50. Miller A.J., Dye B.R., Ferrer-Torres D., et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc.* 2019 Feb;14(2):518-540. doi: 10.1038/s41596-018-0104-8.

51. Parekh K.R., Nawroth J., Pai A., et al. Stem cells and lung regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020 Oct 1;319(4):C675-C693. doi: 10.1152/ajpcell.00036.2020.
52. Della Latta V., Cecchetti A., Del Ry S., Morales M.A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res.* 2015 Jul;97:122-30. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.012.
53. Rosen C., Shezen E., Aronovich A., et al. Preconditioning allows engraftment of mouse and human embryonic lung cells, enabling lung repair in mice. *Nat Med.* 2015 Aug;21(8):869-79. doi: 10.1038/nm.3889.
54. Loi R., Beckett T., Goncz K.K., Suratt B.T., Weiss D.J. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jan 15;173(2):171-9. doi: 10.1164/rccm.200502-309OC.
55. Gutierrez-Aranda I., Ramos-Mejia V., Bueno C., et al. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells.* 2010 Sep;28(9):1568-70. doi: 10.1002/stem.471.
56. Liu Z., Tang Y., Lü S., et al. The tumorigenicity of iPS cells and their differentiated derivatives. *J Cell Mol Med.* 2013 Jun;17(6):782-91. doi: 10.1111/jcmm.12062.
57. Lee C.M., Flynn R., Hollywood J.A., et al. Correction of the  $\Delta F508$  Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *Biores.* Open Access. 2012; 1(3): 99-108.
58. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 653-8.
59. Firth A.L., Menon T., Parker G.S., et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep.* 2015; 12(9): 1385-90.
60. Crane A.M., Kramer P., Bui J.H., et al. Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2015; 4(4): 569-77.
61. Hollywood J.A., Lee C.M., Scallan M.F., et al. Analysis of gene repair tracts from Cas9/gRNA double-stranded breaks in the human CFTR gene. *Sci. Rep.* 2016; 6: 32230.
62. Suzuki S., Sargent R.G., Illek B., et al. TALENs Facilitate Single-step Seamless SDF Correction of F508del CFTR in Airway Epithelial Submucosal Gland Cell-derived CF-iPSCs. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2016; 5: e273.
63. Merkert S., Bednarski C., Göhring G., et al. Generation of a gene-corrected isogenic control iPSC line from cystic fibrosis patient-specific iPSCs homozygous for p.Phe508del mutation mediated by TALENs and ssODN. *Stem Cell Res.* 2017; 23: 95-7.
64. Peters-Hall J.R., Coquelin M.L., Torres M.J., et al. Long-term culture and cloning of primary human bronchial basal cells that maintain multipotent differentiation capacity and CFTR channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018 Aug 1;315(2):L313-L327. doi: 10.1152/ajplung.00355.2017.
65. Suzuki S., Crane A.M., Anirudhan V., et al. Highly Efficient Gene Editing of Cystic Fibrosis Patient-Derived Airway Basal Cells Results in Functional CFTR Correction. *Mol Ther.* 2020 Jul 8;28(7):1684-1695. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.04.021.
66. Fleischer A., Vallejo-Díez S., Martín-Fernández J.M., et al. iPSC-Derived Intestinal Organoids from Cystic Fibrosis Patients Acquire CFTR Activity upon TALEN-Mediated Repair of the p.F508del Mutation. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Apr 18;17:858-870. doi: 10.1016/j.omtm.2020.04.005.
67. Palmer D.J., Turner D.L., Ng P. A Single "All-in-One" Helper-Dependent Adenovirus to Deliver Donor DNA and CRISPR/Cas9 for Efficient Homology-Directed Repair. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Feb 4;17:441-447. doi: 10.1016/j.omtm.2020.01.014.
68. Geurts M.H., de Poel E., Pleguezuelos-Manzano C., et al. Evaluating CRISPR-based prime editing for cancer modeling and CFTR repair in organoids. *Life Sci Alliance.* 2021 Aug 9;4(10):e202000940. doi: 10.26508/lsa.202000940.
69. Ruan J., Hirai H., Yang D., et al. Efficient Gene Editing at Major CFTR Mutation Loci. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Jun 7;16:73-81. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.006.
70. Bulcaen M., Kortleven P., Liu R.B., et al. Prime editing functionally corrects cystic fibrosis-causing CFTR mutations in human organoids and airway epithelial cells. *Cell Rep Med.* 2024 May 21;5(5):101544. doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101544.
71. Sanz D.J., Hollywood J.A., Scallan M.F., et al. Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184009.
72. Maule G., Casini A., Montagna C., et al. Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing. *Nat Commun.* 2019 Aug 7;10(1):3556. doi: 10.1038/s41467-019-11454-9.
73. Sanz D.J., Harrison P.T. Minigene assay to Evaluate CRISPR/Cas9-based excision of Intronic mutations that Cause Aberrant Splicing in Human Cells. *Bio Protoc.* 2019 Jun 5;9(11):e3251. doi: 10.21769/BioProtoc.3251.
74. Melfi R., Cancemi P., Chiavetta R., et al. Investigating REPAIRv2 as a Tool to Edit CFTR mRNA with Premature Stop Codons. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 6;21(13):4781. doi: 10.3390/ijms21134781.
75. Erwood S., Laselva O., Bily T.M.I., et al. Allele-Specific Prevention of Nonsense-Mediated Decay in Cystic Fibrosis Using Homology-Independent Genome Editing. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 May 12;17:1118-1128. doi: 10.1016/j.omtm.2020.05.002.
76. Santos L., Mention K., Cavusoglu-Doran K., et al. Comparison of Cas9 and Cas12a CRISPR editing methods to correct the W1282X-CFTR mutation. *J Cyst Fibros.* 2021 Jun 5;S1569-1993(21)00167-3. doi: 10.1016/j.jcf.2021.05.014.
77. Chiavetta R.F., Titoli S., Barra V., et al. Site-Specific RNA Editing of Stop Mutations in the CFTR mRNA of Human Bronchial Cultured Cells. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 30;24(13):10940. doi: 10.3390/ijms241310940.
78. Li C., Liu Z., Anderson J., et al. Prime editing-mediated correction of the CFTR W1282X mutation in iPSCs and derived airway epithelial cells. *PLoS One.* 2023 Nov 29;18(11):e0295009. doi: 10.1371/journal.pone.0295009.
79. Amistadi S., Maule G., Ciciani M., et al. Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor. *Mol Ther.* 2023 Jun 7;31(6):1647-1660. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.03.004.
80. Walker A.J., Graham C., Greenwood M., et al. Molecular and functional correction of a deep intronic splicing mutation in CFTR by CRISPR-Cas9 gene editing. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2023 Oct 18;31:101140. doi: 10.1016/j.omtm.2023.101140.
81. Joynt A.T., Kavanagh E.W., Newby G.A., et al. Protospacer modification improves base editing of a canonical splice site variant and recovery of CFTR function in human airway epithelial cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2023 Jun 29;33:335-350. doi: 10.1016/j.omtm.2023.06.020.
82. Кондратьева Е.В., Демченко А.Г., Лавров А.В., Смирнихина С.А. Редактирование мутации с.3846G>А (р.Трп1282\*) в гене CFTR в ИПСК с использованием аденинового редактора. *Медицинская генетика.* 2023; 22(11): 20-26. Doi: 10.25557/2073-7998.2023.11.20-26

83. Kulhankova K., Traore S., Cheng X., et al. Shuttle peptide delivers base editor RNPs to rhesus monkey airway epithelial cells in vivo. *Nat Commun.* 2023 Dec 5;14(1):8051. doi: 10.1038/s41467-023-43904-w.
84. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2021 Annual Data Report, Bethesda, Maryland, Cystic Fibrosis Foundation. <https://www.cff.org/medical-professionals/patient-registry>. Дата доступа: 22.01.2024
85. UK Cystic Fibrosis Registry 2022 Annual Data Report, 2023, [https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2023-12/CFT\\_2022\\_Annual\\_Data\\_Report\\_Dec2023.pdf](https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2023-12/CFT_2022_Annual_Data_Report_Dec2023.pdf). Дата доступа: 22.01.2024
86. Petrova N., Balinova N., Marakhonov A., Vasilyeva T., Kashirskaya N., Galkina V., Ginter E., Kutsev S., Zinchenko R. Ethnic Differences in the Frequency of CFTR Gene Mutations in Populations of the European and North Caucasian Part of the Russian Federation. *Front Genet.* 2021 Jun 16;12:678374. doi: 10.3389/fgene.2021.678374
87. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год./ Под редакцией С.А. Красовского, М.А. Стариновой, А.Ю. Воронковой, Е.Л. Амелиной, Н.Ю. Каширской, Е.И. Кондратьевой, Л.П. Назаренко – СПб.: Благотворительный фонд «Острова», 2023, 81 с.
88. Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Osiaik A., et al. Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell.* 2008 Jul 25;31(2):294-301. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
89. Ramalingam S., London V., Kandavelou K., et al. Generation and genetic engineering of human induced pluripotent stem cells using designed zinc finger nucleases. *Stem Cells Dev.* 2013; 22(4): 595-610.
90. Xia E., Zhang Y., Cao H., et al. TALEN-Mediated Gene Targeting for Cystic Fibrosis-Gene Therapy. *Genes (Basel).* 2019 Jan 11;10(1):39. doi: 10.3390/genes10010039.
91. Vaidyanathan S., Kerschner J.L., Paranjapye A., et al. Investigating adverse genomic and regulatory changes caused by replacement of the full-length CFTR cDNA using Cas9 and AAV. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2024 Feb 2;35(1):102134. doi: 10.1016/j.omtn.2024.102134.
8. Zhang L., Albon D., Jones M., Bruschwein H. Impact of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor on depression and anxiety in cystic fibrosis. *Thorax.* 2022 Jan-Dec;73(1):e1. doi: 10.1136/thorax-2021-204211.
9. Arslan M., Chalmers S., Rentfrow K., et al. Suicide attempts in adolescents with cystic fibrosis on Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor therapy. *J Cyst Fibros.* 2023 May;22(3):427-430. doi: 10.1016/j.jcf.2023.01.015.
10. Kalinovskaya E. V Rossii zaregistrirovano troynoy kombinirovanny preparat ot mukoviscidoza, [A triple combination drug for cystic fibrosis has been registered in Russia]. *Pharmvestnik* [Pharmaceutical Bulletin]. 19.06.2023, <https://pharmvestnik.ru/content/news/V-Rossii-zaregistrirovano-troinoi-kombinirovannyi-preparat-ot-mukoviscidoza.html>. Access date: 23.01.2024 (In Russ.)
11. Aposhian H.V. The use of DNA for gene therapy--the need, experimental approach, and implications. *Perspect Biol Med.* 1970 Autumn;14(1):98-108. doi: 10.1353/pbm.1970.0011.
12. Collins F.S., Riordan J.R., Tsui L.C. The cystic fibrosis gene: isolation and significance. *Hosp Pract (Off Ed).* 1990 Oct 15;25(10):47-57. doi: 10.1080/21548331.1990.11704019.
13. Aitken M.L., Moss R.B., Waltz D.A., et al. A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther.* 2001 Oct 10;12(15):1907-16. doi: 10.1089/104303401753153956.
14. Flotte T.R., Schwiebert E.M., Zeitlin P.L., Carter B.J., Guggino W.B. Correlation between DNA transfer and cystic fibrosis airway epithelial cell correction after recombinant adeno-associated virus serotype 2 gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2005 Aug;16(8):921-8. doi: 10.1089/hum.2005.16.921.
15. Flotte T.R., Zeitlin P.L., Reynolds T.C., et al. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther.* 2003 Jul 20;14(11):1079-88. doi: 10.1089/10430340322124792.
16. Alton E.W.F.W., Armstrong D.K., Ashby D., Bayfield K.J., Bilton D., Bloomfield E.V., et al. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis. *Efficacy Mech Eval* 2016;3(5) doi: 10.3310/eme03050
17. Cox D.B., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015 Feb;21(2):121-31. doi: 10.1038/nm.3793.
18. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016 May 19;533(7603):420-4. doi: 10.1038/nature17946.
19. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019 Dec;576(7785):149-157. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.
20. Farnen S.L., Karp P.H., Ng P., et al. Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl<sup>-</sup> transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Dec;289(6):L1123-30. doi: 10.1152/ajplung.00049.2005.
21. Johnson L.G., Olsen J.C., Sarkadi B., et al. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet.* 1992 Sep;2(1):21-5. doi: 10.1038/ng0992-21.
22. Limberis M., Anson D.S., Fuller M., Parsons D.W. Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dose lentivirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther.* 2002 Nov 1;13(16):1961-70. doi: 10.1089/10430340260355365. Erratum in: *Hum Gene Ther.* 2002 Nov 20;13(17):2112.
23. Stocker A.G., Kremer K.L., Koldej R., et al. Single-dose lentiviral gene transfer for lifetime airway gene expression. *J Gene Med.* 2009 Oct;11(10):861-7. doi: 10.1002/jgm.1368.

## References

1. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 2013; 22: 58-65.
2. Berger H.A., Anderson M.P., Gregory R.J. et al. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 1422-31.
3. Choi J.Y., Muallem D., Kiselyov K. et al. Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 2001; 410: 94-7.
4. Vertex Pharmaceuticals Incorporated. Trikafta (elexacaftor, tezacaftor, and ivacaftor tablets; ivacaftor tablets) [package insert]. U.S. Food and Drug Administration website. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2021/212273s004lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/212273s004lbl.pdf). Revised June 2021. Accessed January 21, 2024.
5. Merali Z. Life-changing cystic fibrosis treatment wins US\$3-million Breakthrough Prize. *Nature.* 2023 Sep;621(7979):450-451. doi: 10.1038/d41586-023-02890-1.
6. Bacalhau M., Camargo M., Magalhães-Ghiotto G.A.V., et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor: A Life-Changing Triple Combination of CFTR Modulator Drugs for Cystic Fibrosis. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Mar 8;16(3):410. doi: 10.3390/ph16030410.
7. Manciuilli T., Bresci S., Mencarini J., et al. Prevalence of adverse events in cystic fibrosis patients treated with elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor: Experience of the regional referral center in Tuscany, Italy. *Pediatr Pulmonol.* 2023 Dec;58(12):3626-3629. doi: 10.1002/ppul.26673.

24. Farrow N., Cmielewski P., Delhove J., et al. Towards Human Translation of Lentiviral Airway Gene Delivery for Cystic Fibrosis: A One-Month CFTR and Reporter Gene Study in Marmosets. *Hum Gene Ther.* 2021 Aug;32(15-16):806-816. doi: 10.1089/hum.2020.267.
25. Reyne N., Cmielewski P., McCarron A., et al. Single-Dose Lentiviral Mediated Gene Therapy Recovers CFTR Function in Cystic Fibrosis Knockout Rats. *Front Pharmacol.* 2021 May 18;12:682299. doi: 10.3389/fphar.2021.682299.
26. Cooney A.L., Abou Alaiwa M.H., Shah V.S., et al. Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs. *JCI Insight.* 2016 Sep 8;1(14):e88730. doi: 10.1172/jci.insight.88730.
27. Cooney A.L., Singh B.K., Loza L.M., et al. Widespread airway distribution and short-term phenotypic correction of cystic fibrosis pigs following aerosol delivery of piggyBac/adenovirus. *Nucleic Acids Res.* 2018 Oct 12;46(18):9591-9600. doi: 10.1093/nar/gky773.
28. Trimidal S. G., Benjamin R., Bae J. E., et al. Can Designer Indels Be Tailored by Gene Editing?. *BioEssays* 2019, 41, 1900126. <https://doi.org/10.1002/bies.201900126>
29. Kim Y.G., 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.
30. Cermak T., Doyle E.L., 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.
31. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):816-821.
32. Mullard A. CRISPR pioneers win Nobel prize. *Nat Rev Drug Discov.* 2020 Dec;19(12):827. doi: 10.1038/d41573-020-00198-7.
33. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, <https://clinicaltrials.gov> (Access date: 18.01.2024 r.)
34. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., et al. Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* 2017 Nov 23;551(7681):464-471. doi: 10.1038/nature24644. Erratum in: *Nature.* 2018 May 2.
35. Rees H.A., Liu D.R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells [published correction appears in *Nat Rev Genet.* 2018 Oct 19;]. *Nat Rev Genet.* 2018;19(12):770-788. doi:10.1038/s41576-018-0059-1
36. Geurts M.H., de Poel E., Amatngalim G.D., et al. CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank. *Cell Stem Cell.* 2020 Apr 2;26(4):503-510.e7. doi: 10.1016/j.stem.2020.01.019. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32084388.
37. Philippidis A. CASGEVY Makes History as FDA Approves First CRISPR/Cas9 Genome Edited Therapy. *Hum Gene Ther.* 2024 Jan;35(1-2):1-4. doi: 10.1089/hum.2023.29263.bfs.
38. Gillmore J.D., Gane E., Taubel J., et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2021 Aug 5;385(6):493-502. doi: 10.1056/NEJMoa2107454.
39. Suzuki S., Chosa K., Barilla C., et al. Seamless Gene Correction in the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Locus by Vector Replacement and Vector Insertion Events. *Front Genome Ed.* 2022 Apr 6;4:843885. doi: 10.3389/fgeed.2022.843885.
40. Cuevas-Ocaña S., Yang J.Y., Aushev M., et al. A Cell-Based Optimised Approach for Rapid and Efficient Gene Editing of Human Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 17;24(12):10266. doi: 10.3390/ijms241210266.
41. Krishnamurthy S., Traore S., Cooney A.L., et al. Functional correction of CFTR mutations in human airway epithelial cells using adenine base editors. *Nucleic Acids Res.* 2021 Oct 11;49(18):10558-10572. doi: 10.1093/nar/gkab788.
42. Bednarski C., Tomczak K., Vom Hövel B., et al. Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model. *PLoS One* 2016; 11(8): e0161072.
43. Vaidyanathan S., Salahudeen A.A., Sellers Z.M., et al. High-Efficiency, Selection-free Gene Repair in Airway Stem Cells from Cystic Fibrosis Patients Rescues CFTR Function in Differentiated Epithelia. *Cell Stem Cell.* 2020 Feb 6;26(2):161-171.e4. doi: 10.1016/j.stem.2019.11.002.
44. Wei T., Sun Y., Cheng Q., et al. Lung SORT LNPs enable precise homology-directed repair mediated CRISPR/Cas genome correction in cystic fibrosis models. *Nat Commun.* 2023 Nov 11;14(1):7322. doi: 10.1038/s41467-023-42948-2.
45. Mention K., Cavusoglu-Doran K., Joynt A.T., et al. Use of adenine base editing and homology-independent targeted integration strategies to correct the cystic fibrosis causing variant, W1282X. *Hum Mol Genet.* 2023 Nov 17;32(23):3237-3248. doi: 10.1093/hmg/ddad143.
46. Dekkers J.F., Wiegerinck C.L., de Jonge H.R., et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med.* 2013 Jul;19(7):939-45. doi: 10.1038/nm.3201.
47. Sato T., Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science.* 2013 Jun 7;340(6137):1190-4. doi: 10.1126/science.1234852.
48. Miller A.J., Hill D.R., Nagy M.S., et al. In Vitro Induction and In Vivo Engraftment of Lung Bud Tip Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2018 Jan 9;10(1):101-119. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.012.
49. Demchenko A., Kondrateva E., Tabakov V., et al. Airway and Lung Organoids from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Used to Assess CFTR Conductance. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6293. <https://doi.org/10.3390/ijms24076293>.
50. Miller A.J., Dye B.R., Ferrer-Torres D., et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc.* 2019 Feb;14(2):518-540. doi: 10.1038/s41596-018-0104-8.
51. Parekh K.R., Nawroth J., Pai A., et al. Stem cells and lung regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020 Oct 1;319(4):C675-C693. doi: 10.1152/ajpcell.00036.2020.
52. Della Latta V., Cecchetti A., Del Ry S., Morales M.A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res.* 2015 Jul;97:122-30. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.012.
53. Rosen C., Shezen E., Aronovich A., et al. Preconditioning allows engraftment of mouse and human embryonic lung cells, enabling lung repair in mice. *Nat Med.* 2015 Aug;21(8):869-79. doi: 10.1038/nm.3889.
54. Loi R., Beckett T., Goncz K.K., Suratt B.T., Weiss D.J. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jan 15;173(2):171-9. doi: 10.1164/rccm.200502-309OC.
55. Gutierrez-Aranda I., Ramos-Mejia V., Bueno C., et al. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells.* 2010 Sep;28(9):1568-70. doi: 10.1002/stem.471.
56. Liu Z., Tang Y., Lü S., et al. The tumorigenicity of iPS cells and their differentiated derivatives. *J Cell Mol Med.* 2013 Jun;17(6):782-91. doi: 10.1111/jcmm.12062.
57. Lee C.M., Flynn R., Hollywood J.A., et al. Correction of the ΔF508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *Biores. Open Access.* 2012; 1(3): 99-108.
58. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 653-8.
59. Firth A.L., Menon T., Parker G.S., et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep.* 2015; 12(9): 1385-90.
60. Crane A.M., Kramer P., Bui J.H., et al. Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2015; 4(4): 569-77.
61. Hollywood J.A., Lee C.M., Scallan M.F., et al. Analysis of gene repair tracts from Cas9/gRNA double-stranded breaks in the human CFTR gene. *Sci. Rep.* 2016; 6: 32230.

62. Suzuki S., Sargent R.G., Illek B., et al. TALENs Facilitate Single-step Seamless SDF Correction of F508del CFTR in Airway Epithelial Submucosal Gland Cell-derived CF-iPSCs. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2016; 5: e273.
63. Merkert S., Bednarski C., Göhring G., et al. Generation of a gene-corrected isogenic control iPSC line from cystic fibrosis patient-specific iPSCs homozygous for p.Phe508del mutation mediated by TALENs and ssODN. *Stem Cell Res*. 2017; 23: 95-7.
64. Peters-Hall J.R., Coquelin M.L., Torres M.J., et al. Long-term culture and cloning of primary human bronchial basal cells that maintain multipotent differentiation capacity and CFTR channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018 Aug 1;315(2):L313-L327. doi: 10.1152/ajplung.00355.2017.
65. Suzuki S., Crane A.M., Anirudhan V., et al. Highly Efficient Gene Editing of Cystic Fibrosis Patient-Derived Airway Basal Cells Results in Functional CFTR Correction. *Mol Ther*. 2020 Jul 8;28(7):1684-1695. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.04.021.
66. Fleischer A., Vallejo-Díez S., Martín-Fernández J.M., et al. iPSC-Derived Intestinal Organoids from Cystic Fibrosis Patients Acquire CFTR Activity upon TALEN-Mediated Repair of the p.F508del Mutation. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Apr 18;17:858-870. doi: 10.1016/j.omtm.2020.04.005.
67. Palmer D.J., Turner D.L., Ng P. A Single “All-in-One” Helper-Dependent Adenovirus to Deliver Donor DNA and CRISPR/Cas9 for Efficient Homology-Directed Repair. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Feb 4;17:441-447. doi: 10.1016/j.omtm.2020.01.014.
68. Geurts M.H., de Poel E., Pleguezuelos-Manzano C., et al. Evaluating CRISPR-based prime editing for cancer modeling and CFTR repair in organoids. *Life Sci Alliance*. 2021 Aug 9;4(10):e202000940. doi: 10.26508/lsa.202000940.
69. Ruan J., Hirai H., Yang D., et al. Efficient Gene Editing at Major CFTR Mutation Loci. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019 Jun 7;16:73-81. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.006.
70. Bulcaen M., Kortleven P., Liu R.B., et al. Prime editing functionally corrects cystic fibrosis-causing CFTR mutations in human organoids and airway epithelial cells. *Cell Rep Med*. 2024 May 21;5(5):101544. doi: 10.1016/j.xcr.2024.101544.
71. Sanz D.J., Hollywood J.A., Scallan M.F., et al. Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184009.
72. Maule G., Casini A., Montagna C., et al. Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing. *Nat Commun*. 2019 Aug 7;10(1):3556. doi: 10.1038/s41467-019-11454-9.
73. Sanz D.J., Harrison P.T. Minigene assay to Evaluate CRISPR/Cas9-based excision of Intronic mutations that Cause Aberrant Splicing in Human Cells. *Bio Protoc*. 2019 Jun 5;9(11):e3251. doi: 10.21769/BioProtoc.3251.
74. Melfi R., Cancemi P., Chiavetta R., et al. Investigating REPAIRv2 as a Tool to Edit CFTR mRNA with Premature Stop Codons. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 6;21(13):4781. doi: 10.3390/ijms21134781.
75. Erwood S., Laselva O., Bily T.M.I., et al. Allele-Specific Prevention of Nonsense-Mediated Decay in Cystic Fibrosis Using Homology-Independent Genome Editing. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 May 12;17:1118-1128. doi: 10.1016/j.omtm.2020.05.002.
76. Santos L., Mention K., Cavusoglu-Doran K., et al. Comparison of Cas9 and Cas12a CRISPR editing methods to correct the W1282X-CFTR mutation. *J Cyst Fibros*. 2021 Jun 5;S1569-1993(21)00167-3. doi: 10.1016/j.jcf.2021.05.014.
77. Chiavetta R.F., Titoli S., Barra V., et al. Site-Specific RNA Editing of Stop Mutations in the CFTR mRNA of Human Bronchial Cultured Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 30;24(13):10940. doi: 10.3390/ijms241310940.
78. Li C., Liu Z., Anderson J., et al. Prime editing-mediated correction of the CFTR W1282X mutation in iPSCs and derived airway epithelial cells. *PLoS One*. 2023 Nov 29;18(11):e0295009. doi: 10.1371/journal.pone.0295009.
79. Amistadi S., Maule G., Ciciani M., et al. Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor. *Mol Ther*. 2023 Jun 7;31(6):1647-1660. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.03.004.
80. Walker A.J., Graham C., Greenwood M., et al. Molecular and functional correction of a deep intronic splicing mutation in CFTR by CRISPR-Cas9 gene editing. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023 Oct 18;31:101140. doi: 10.1016/j.omtm.2023.101140.
81. Joynt A.T., Kavanagh E.W., Newby G.A., et al. Protospacer modification improves base editing of a canonical splice site variant and recovery of CFTR function in human airway epithelial cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023 Jun 29;33:335-350. doi: 10.1016/j.omtn.2023.06.020.
82. Kondrateva E.V., Demchenko A.G., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Redaktirovaniye mutatsii c.3846G>A (p.Trp1282\*) v gene CFTR v IPSK s ispol'zovaniyem adeninovogo redaktora [Editing the c.3846G>A (p.Trp1282\*) mutation in the CFTR gene in iPSCs using adenine editor]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2023;22(11):20-26. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.20-26>
83. Kulhankova K., Traore S., Cheng X., et al. Shuttle peptide delivers base editor RNPs to rhesus monkey airway epithelial cells in vivo. *Nat Commun*. 2023 Dec 5;14(1):8051. doi: 10.1038/s41467-023-43904-w.
84. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2021 Annual Data Report, Bethesda, Maryland, Cystic Fibrosis Foundation. <https://www.cff.org/medical-professionals/patient-registry>. Access date: 22.01.2024
85. UK Cystic Fibrosis Registry 2022 Annual Data Report, 2023, [https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2023-12/CFT\\_2022\\_Annual\\_Report\\_Dec2023.pdf](https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2023-12/CFT_2022_Annual_Report_Dec2023.pdf). Access date: 22.01.2024
86. Petrova N., Balinova N., Marakhonov A., Vasilyeva T., Kashirskaya N., Galkina V., Ginter E., Kutsev S., Zinchenko R. Ethnic Differences in the Frequency of CFTR Gene Mutations in Populations of the European and North Caucasian Part of the Russian Federation. *Front Genet*. 2021 Jun 16;12:678374. doi: 10.3389/fgene.2021.678374
87. Registratsiyentov s mukovistsidozom v Rossiyskoy Federatsii. 2021 god. / Pod red. S.A. Krasovskogo, M.A. Starinoy, A.YU. Voronkoy, Ye.L. Amelinoy, N.YU. Kashirskoy, Ye.I. Kondrat'yevoy, L.P. Nazarenko [Registry of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. 2021. / Ed. by S.A. Krasovsky, M.A. Starinova, A.Yu. Voronkova, E.L. Amelina, N.Yu. Kashirskaya, E.I. Kondratieva, L.P. Nazarenko – SPb.: Blagotvoritel'nyy fond «Ostrova» [St. Petersburg: Charitable Foundation “Ostrova”], 2023, 81 p. (In Russ.)
88. Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Osiaik A., et al. Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*. 2008 Jul 25;31(2):294-301. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
89. Ramalingam S., London V., Kandavelou K., et al. Generation and genetic engineering of human induced pluripotent stem cells using designed zinc finger nucleases. *Stem Cells Dev*. 2013; 22(4): 595-610.
90. Xia E., Zhang Y., Cao H., et al. TALEN-Mediated Gene Targeting for Cystic Fibrosis-Genes Therapy. *Genes (Basel)*. 2019 Jan 11;10(1):39. doi: 10.3390/genes10010039.
91. Vaidyanathan S., Kerschner J.L., Paranjapye A., et al. Investigating adverse genomic and regulatory changes caused by replacement of the full-length CFTR cDNA using Cas9 and AAV. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024 Feb 2;35(1):102134. doi: 10.1016/j.omtn.2024.102134.