

Терапевтические подходы к использованию системы редактирования генома CRISPR/Cas при наследственных болезнях у человека и модельных животных

Мглинец В.А.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: mglinetz@mail.ru

С момента открытия системы редактирования генома CRISPR/Cas эта технология благодаря многочисленным модификациям и усовершенствованиям существенно продвинулась, приблизившись вплотную к применению в клинической медицине. В настоящее время на повестке дня стоит вопрос об её использовании для лечения наследственных болезней, где известен ген, вызывающий болезнь.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, наследственные болезни, лечение.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Therapeutic approaches of the CRISPR/Cas genome editing system for genetic diseases in humans and model animals

Mglinets V.A.

Medical Genetics Research Center, Moscow 115478 Russia; e-mail: mglinetz@mail.ru

Since the opening of the CRISPR / Cas genome editing system, this technology has made significant progress thanks to numerous modifications and improvements, coming close to application in clinical medicine. At present, the issue on its use for the treatment of genetic diseases, where the gene causing the disease is known, is on the agenda. With the help of this system, it is supposed to correct the mutant gene in cells taken from the patients themselves with the subsequent introduction of these cells back to the patient, or to correct *in situ* the mutation directly on the spot in the target gene in patients.

Key words: genome editing, CRISPR/Cas9, hereditary diseases, therapy.

Введение

В предыдущих работах [1, 11] были рассмотрены принципы действия, модификации и всевозможные улучшения системы CRISPR/Cas9 по редактированию генома. Редактирование генома с помощью этой системы осуществляется комплексом, состоящим из одиночной гид-РНК (sgRNA), обеспечивающей распознавание локуса мишени в ДНК, и нуклеазы Cas9, разрезающей ДНК мишень. При этом места разрезов репарируются путем вставки новых участков из донорской ДНК при использовании гомология-управляемой репарации (HDR) ДНК [77]. В устранении поврежденных ДНК участвует специальный энзим ДНК-лигаза, окружающая двойную спираль и репарирующая разрезанную нить ДНК. В ходе обычной жизни клетки происходит репарирование миллионов разрывов ДНК. ДНК-лигаза катализирует критическую ступень соединения разрывов в дуплексной ДНК в процессах репарации, репликации и рекомбинации ДНК и действует в присутствии АТФ или NAD⁺ (Nicotinamide adenine dinucleotide) в качестве кофакторов.

В понятие «редактирование генома с использованием CRISPR/Cas9 системы» входит не только устранение из

генома имеющихся мутаций, но и целенаправленная индукция экспрессии желательных генов и индукция мутаций определенных генов, например, для моделирования болезней человека у животных. Для этого наиболее подходит система репарации NHEJ (nonhomologous end joining). Здесь мы рассмотрим попытки использования системы CRISPR/Cas для редактирования генома у животных, моделирующих болезни человека, и у людей с определенными наследственными заболеваниями.

Все подходы в общем можно подразделить на вмешательство *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Под экспериментами *in vitro* мы будем иметь в виду редактирование генома клеток, полученных от мутантных индивидов, при этом результаты исправления генов исследуются в культивируемых клетках путем анализа продукции ими функционального продукта и восстановления функции мутантных клеток. Под экспериментами *ex vivo* мы будем иметь в виду выделение клеток от пациентов или мутантных животных, исправление их вне тела и обратное введение их в тот же организм. И, наконец, под экспериментами *in vivo* мы будем иметь в виду введение системы геномного редактирования непосредственно в организм для исправления мутантного гена в месте его локализации (*in situ*).

Использование CRISPR/Cas системы у модельных животных

Эксперименты *in vitro*

Безусловно, самыми первыми подходами изучения системы CRISPR-Cas стали исследования *in vitro*. Так, были предприняты успешные попытки терапии наследственной тирозинемии типа I, вызываемой мутациями гена *FAH* (Fumarylacetoacetate Hydrolase), на мышах [84]. Эти мутации, вызывая пропуск экзона 8 во время сплайсинга, давали укороченный, нестабильный белок FAH, что приводило к накоплению токсических метаболитов и к тяжелым повреждениям печени у животных.

Путем замещения метилированного промотора на неметилированный с помощью системы CRISPR/Cas9 была осуществлена активация экспрессии гена нервных клеток *OLIG2* (oligodendrocyte transcription factor 2) и гена эмбриональных стволовых клеток *NANOG* (Nk2 homeobox domain gene) в клетках HEK293T. Кроме того, путем активации гена *OLIG2* с помощью CRISPR/Cas9 в клеточной линии эмбриональной карциномы NTERA-2 удалось добиться экспрессии нервного маркера β III-tubulin [40]. Была продемонстрирована эффективность данной техники по коррекции ассоциированных с болезнью мутаций на примере превращения мутантного гена *APOE*, ассоциирующего с болезнью Альцгеймера, в его версию с низким риском заболевания у мышей [46].

Огромное внимание при использовании технологии редактирования генов уделяется способам активации (CRISPRa) важных генов и репрессии нежелательных генов [70]. С этой целью разработана система CRISPR interference (CRISPRi). Технология CRISPRi может ингибировать как инициацию транскрипции, так и элонгацию мРНК путем целенаправленного воздействия на участки самого гена [64]. Эта система репрессии может быть усилена путем слияния белков dCas9 и KRAB (Kruppel-associated box) репрессора [29, 79] или путем использования эпигенетического репрессора, удаляющего активирующую метилирующую метку H3K4 [43]. Например, система, состоящая из 4 копий домена mSin3 interaction domain (tSID4X) тандемно присоединенных к каркасу dCas9, способна репрессировать эндогенный ген *SOX2* (SRY-Box 2) в клетках HEK293T [47].

С другой стороны, показано, что комплексы dSpCas9-VP64 индуцируют важные для развития гены, такие, как *SOX17* (SRY-Box 2) и *OCT4* (octamer-binding transcription factor 4) [25, 41] и запускают клеточное репрограммирование. Так, целенаправленное воздействие на ген *MyoD1* (myogenic differentiation 1) в фибробластах мыши усиленного активатора VP64-dSpCas9-BFP-VP64 вызывало клеточное перепрограммирование в направлении миоцитов [13]. Кроме того, с помощью комплекса с улучшенным активатором dSpCas9-VPR (Viral protein R of HIV-1) удалось активировать гены главных регуляторов нейрональных клонов *NEUROD1* и *NEUROG2* в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках,

заставляя их дифференцироваться в нервные клетки. Были использованы программируемые активаторы Cas9 для специфической индукции экспрессии латентного генома вируса ВИЧ HIV (Human immunodeficiency virus) [51, 87]. Активация молчащего генома HIV делает ретровирус чувствительным к противовирусным лекарствам, в результате чего ретровирус может быть удален иммунной системой.

В настоящее время на повестке дня стоит использование нескольких подходов по активации терапевтических гаплонедостаточных генов, противораковых генов, а также подходов по репрессии онкогенов, генов резистентности к противораковым лекарствам и доминантно негативных генов. Так, при синдромах Прадера-Вилли и Энгельмена активаторы, встроенные в геном на основе использования системы Cas9, могли бы целенаправленно вызвать экспрессию молчащего аллеля, создавая полностью интактную копию соответствующего гена [2].

Несколько иной подход предложен для поиска способа лечения болезни Паркинсона [3]. Используя технику CRISPR, редактировали ген alpha-synuclein, вставив при этом люминисцентную метку из белка, который вызывает свечение у светлячков. Каждый раз, когда клетка продуцирует белок alpha-synuclein, метка испускает свет. Эта реакция позволяет легко его измерять. Если такие модифицированные клетки обработать определенным лекарством и после такого воздействия свет больше не индуцируется, то это означает, что лекарство обладает потенциалом лечения этой болезни. Исследователи могут проверять новые и уже существующие лекарства, чтобы посмотреть, как они регулируют уровень alpha-synuclein у пациентов. С помощью этой технологии ученые надеются выявить пути снижения продукции alpha-synuclein, что, возможно, позволит предупредить болезнь Паркинсона или её прогрессирование.

Эксперименты *ex vivo*

Обычно клетки, полученные от мутантных организмов, можно откорректировать *ex vivo*, вводя в них нормальный ген или его мини-вариант. Для этого используются разнообразные подходы, в том числе и коррекция генов с использованием системы CRISPR/Cas9. Например, в случае SCID-X1 [67] корректировали *ex vivo* ген *IL2RG* (interleukin-2 receptor common γ -chain) в гематопозитических стволовых клетках и клетках предшественниках (HSPCs) перед их введением модельным мышам.

Была также осуществлена перестройка иммунных клеток таким образом, чтобы они экспрессировали рецепторы TCR (T-cell receptor), обладающие повышенным сродством к раковым антигенам NY-ESO-1 и LAGE-1. Измененные с помощью системы CRISPR/Cas9 рецепторы TCR вводились в Т-клетки, чтобы нейтрализовать клетки с прежними TCR и нацелить измененные иммунные клетки на опухолевые [23].

При внутривенном введении лентивирусов, несущих трансен, экспрессия которого реализуется в гепатоцитах, выявлена терапевтическая эффективность такого подхода у собак с гемофилией В из-за мутаций в кодирующем гене фактора IX [10].

Подход с добавлением нормального гена дистрофина был использован при лечении мышечной дистрофии Дюшенна у мышей [54]. Система рекомбиназы Cre, используемая для распознавания последовательности в длинных терминальных повторах лентивируса HIV, позволяющая вырезать этот провирус HIV из генома клеток [87] в принципе может быть использована и для доставки терапевтических генов в мышцы при мышечной дистрофии [88].

Путем целенаправленного воздействия одиночной Cas-никазы на фибробласты плодов крупного рогатого скота были получены колонии трансенных клеток NRAMP1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1), которые после трансплантации давали трансенных коров с повышенной устойчивостью к туберкулезу [26]. Показано, что у свиней, моделирующих кистозный фиброз, замещение мутантного гена *CFTR* на нормальный может приводить к нормализации важных биологических аспектов функции легких и улучшению способности легочных секретов убивать бактерии [16]. На мышцах, моделирующих множественный склероз, была продемонстрирована успешная генотерапия путём внесения гена myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) [42].

Однако наиболее эффективным является замещение поврежденных клеток нормальными, полученными из эмбриональных стволовых клеток (ESC) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) с помощью системы CRISPR/Cas. Оно использовано для восстановления зрения у модельных животных [85] и для создания подходов лечения нейродегенеративных заболеваний [6]. Хронический грануломатоз вызывается дефектом белка NOX2, ключевой молекулы, позволяющей иммунной системе разрушать вредные бактерии. Мутация *NOX2* в стволовых клетках от пациентов с грануломатозом была репарирована с использованием вышеуказанной технологии, клетки дифференцировались в иммунные, с восстановленной антимикробной функцией. Будучи имплантированными мышам, измененные клетки сохраняли свою способность долговременного редактирования генов без признаков побочных эффектов [19]. Сходным образом, модифицированные стволовые клетки SMART (Stem cells Modified for Autonomous Regenerative Therapy), превращенные в хрящевые клетки защищали суставы от повреждений, вызываемых хроническим артритом [8].

Эксперименты *in vivo*

До появления системы CRISPR/Cas заместительная терапия с введением нормальных генов, например, генов *SDF-1* (Stromal cell-derived factor-1), гена *survivin*,

микроРНК miR-133 в ишемический миокард способствовала восстановлению функции сердца после ишемии у крыс. Сходный подход применяется для устранения глухоты и нарушения чувства равновесия у мышей [32]. Так, у мышей, моделирующих синдром Usher типа 1c, при введении исправленной версии гена *Ush1c* во внутренние и наружные волосковые клетки слуховой улитки начинает продуцировать нормальный белок harmonin полной длины [63]. Заместительная генотерапия не зависит от характера мутации [5], тогда как терапия с помощью редактирования генов требует подготовки специфической гид-РНК sgRNA, подходящей только к определенной мутации [31].

При разных глазных болезнях наблюдается патологический внутриглазной ангиогенез, когда кровеносные сосуды начинают расти по поверхности сетчатки, протекать, разрываться или вызывать отслоение сетчатки, приводя к потере зрения. Одиночная инъекция редактирующей геном системы CRISPR Cas9 для гена *VEGFR2*, критического для ангиогенеза, оказалась способной предупреждать ангиогенез в сетчатке у модельных мышей [37].

Система CRISPR Cas9 эффективно корректирует доминантную мутацию гена *Crygc* у мышей с врожденной катарактой при совместной инъекции мРНК Cas9 и sgRNA, нацеленных на мутантный аллель *Crygc* в зиготе [80]. А в другом исследовании было установлено, что система CRISPR Cas9 может быть использована для модификации трансгена *EGFP* или эндогенного гена *Crygc* в сперматогониальных стволовых клетках мышей. В последнем случае коррекция мутации *Crygc* приводила к восстановлению сперматогенеза и продукции потомства с исправленным фенотипом в 100% случаев [81].

С помощью стратегии HITI (homology-independent targeted integration), позволяющей воздействовать на нейроны млекопитающих в постнатальном периоде, осуществляли инсерции копии экзона 2 гена *Merkk* в интрон 1 и было отмечено улучшение зрительной функции у модельных крыс с пигментным ретинитом [74].

Путем модификации нуклеазы Cas9 можно сделать редактирование генома программируемым [38]. Регуляция активности эндонуклеазы Cas9 с помощью малых молекул используется при разных подходах [89], например, когда белок intein размером в 412 аминокислот вставляют в положение Ser219 или в положение Cys574 белка Cas9, энзим оказывается инактивированным до тех пор, пока не будет активирован intein с помощью 4-hydroxytamoxifen (4-НТ) и он не будет удален в процессе сплайсинга. При таком временном контроле редактирования гена количество эффектов вне мишени, вызываемых системой CRISPR/Cas уменьшаются в 25 раз. Например, можно получать животных, у которых Cas9 редактирование будет происходить только в клетках тех тканей, где экспрессируется трансактиватор rtTA (reverse tetracycline transactivator) [20]. Так, создана трансгенная система CRISPR/Cas, способная

к редактированию генома исключительно в кардиомиоцитах. Использование тамохифен-индуцибельного промотора *Myh6* (myosin heavy chain 6), управляющего экспрессией гена *Cas9*, позволяет контролировать индукцию нуклеазы *Cas9* и во времени [12].

Выше уже упоминалось об интересном подходе к редактированию генов путем превращения оснований цитидина в уридин *in situ*, которое может приводить к исправлению мутантных генов [46]. Такие подходы очень важны для клиники, но пока они разрабатываются только на модельных животных.

Так, с целью локальной модификации гена *VEGF* у модельных мышей с возрастной макулярной дегенерацией AMD (age-related macular degeneration), в их глаза вводили предварительно собранный специальный комплекс CRISPR/Cas9 [45]. При этом *in situ* область хориоидальной неоваскуляризации уменьшалась на 58%. В другой работе с помощью этой системы у мышей с пигментным ретинитом деактивировали гены *Nrl* или *Nr2e3*, в результате репрограммированные палочковидные фоторецепторы становились колбочковидными фоторецепторами и зрение улучшалось [90].

Продемонстрировано, что возможна коррекция точковой мутации гена *F9* (coagulation factor IX) с помощью системы CRISPR/Cas *in situ* в печени мышей, что может служить в дальнейшем терапевтической стратегией данной и других наследственных болезней у человека [31].

Установлено, что технология CRISPR/Cas9 может быть использована для лечения угрожающей жизни скоротечной печеночной недостаточности fulminant hepatic failure (FHF). Была разработана химерная sgRNA, специфически и целенаправленно воздействующая на геномные регионы гена *Fas* (Fas cell surface death receptor) мыши. В результате исследований было установлено, что доставка *in vivo* CRISPR/Cas9 в клетки печени модельных животных с FHF способна поддерживать гомеостаз печени и защищать гепатоциты от апоптоза, вызываемого мутацией гена *Fas* [50].

Используя электропорацию плазмид с системой *Cas9 in utero* или микроинъекции белкового комплекса *Cas9*, удалось нарушить экспрессию *in situ* гена *Eomes/Tbr2*, (Eomesodermin/T-Box Brain Protein 2), фундаментально для нейрогенеза неокортекса. Это нарушение приводило к уменьшению числа основных предшественников и к увеличению количества дифференцированных нейронов. Таким образом, было установлено, что воздействие *in vivo* CRISPR/Cas9 системы на нейральные стволовые клетки приводит к быстрому, эффективному и длительному изменению экспрессии специфических нейрональных генов, влияющих на развитие головного мозга млекопитающих [39]. Путем инъекции рибонуклеопротеиновых комплексов *Cas9* в гиппокамп, полосатое тело и кору головного мозга мышей можно редактировать гены в постмитотических нейронах. *Cas9* нуклеаза была модифицирована путем добавления множественных последовательностей ядерной локализации NLS,

что позволило десятикратно усилить эффективность редактирования генома *in vivo* [72].

Версия nuclease-dead (dCas9) может быть запрограммирована на разнообразные инженерные преобразования генома, такие, как репрессия гена *KRAB* (Kruppel-associated box) [29]. Происходящая из *Campylobacter jejuni*, нуклеаза *CjCas9*, доставляемая в сетчатку с помощью вирусного вектора AAV, может эффективно инактивировать дефектные гены *Hif1a* (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) и *VEGF A*, уменьшая область хориоидальной неоваскуляризации у мышей с возрастной макулярной дегенерацией [44]. Маленького размера нуклеаза *Cas9* от бактерий *Staphylococcus aureus* (SaCas9) была использована для целенаправленного воздействия на локус *Pcsk9* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), и существенно снижала уровень соответствующего белка и холестерина в сыворотке мутантных мышей [65].

Метод CRISPR/Cas9 был использован для целенаправленного воздействия на точковые мутации в экзонах гена дистрофина мутантных мышей *mdx*, моделирующих дистрофию Дюшенна человека [53, 61, 75, 83]. Возникновение стоп-кодона в гене дистрофина приводит к мышечной дистрофии у мышей *mdx*. В этих исследованиях для вырезания региона, несущего мутацию, были использованы парные CRISPR/Cas9 системы с sgRNAs, распознающими интронные последовательности, которые обрамляют мутантный экзон с двух сторон. Было показано, что экзон 23, несущий точковую мутацию, вырезанный с двух сторон с помощью *Cas9*, пропускался при считывании и DMD-транскрипт оказывался соответствующим рамке считывания (in-frame). Это приводило к восстановлению белка дистрофина и компонентов дистрофин-гликопротеинового комплекса и к функциональному восстановлению мышц мышей, подвергнутых действию системы редактирования генома CRISPR/Cas9. При этом восстанавливались локализация и активность соответствующей синтазы оксида азота (nNOS). Недавно была успешно использована более короткая *Cpf1*-like *Cas9* нуклеаза, вызывающая одиночный разрез и использующая донорскую ДНК для восстановления гена дистрофина в клетках мышей и человека [86]. Наконец, был разработан новый подход, называемый CRISPR-Gold, который использует наночастицы золота для доставки компонентов этой системы у мышей, моделирующих DMD [48]. Одна внутримышечная инъекция CRISPR-Gold мышам с DMD способна восстановить 5,4% генов дистрофина. Это в 18 раз больше, чем при действии упомянутой выше CRISPR-Cas9 системы, вызывающей лишь 0,3% восстановления. Кроме того, CRISPR-Gold эффективно редуцирует тканевой фиброз и улучшает силу и подвижность у мышей.

Миотоническая дистрофия типа I (DM1) вызывается увеличением повторов триплетов CTG в гене *DMPK* (Myotonic dystrophy protein kinase). Описана нацеленная на РНК *Cas9* (RCas9) система, которая обеспечила эф-

фективное устранение проявлений дистрофии DM1 путем доставки в мышцы взрослых мышей RCas9, используя аденоассоциированный вирус. Наблюдалась элиминация CUG РНК, восстановление ассоциированного с ними белка Mbn1 и исправление характера DM1-типа альтернативного сплайсинга в генах-кандидатах, включая ген хлорного канала 1, управляемого напряжением (*Cln1*), ответственных за проявления миотонии [4].

Редактирование генов в клетках человека

Эксперименты in vitro

В представленной выше работе Vatra с соавт., 2017 [4] сходный результат получен на миобластах от пациентов с миотонической дистрофией DM1, которые также обнаруживали сходную специфичную элиминацию РНК с избыточно повторяющимися CUG и нормализацию молекулярных характеристик миобластов.

Впервые в 2013 г. было сообщено об успешной демонстрации геномного редактирования клеток человека, базирующейся на использовании системы Cas9 [15, 56]. Было показано, что система CRISPR/Cas9 может целенаправленно воздействовать на специфические места в геноме клеток человека.

С использованием CRISPR/Cas системы производились замены на участке приблизительно от 5 до 1—2 нуклеотидов, эффективно корректируя разнообразные точечные мутации, имеющие отношение к болезням человека *in vitro*. Осуществлена удачная целенаправленная коррекция оснований в клетках человека в 6 генетических локусах [46]. В частности, осуществлено устранение мутации, ассоциированной с генетической болезнью накопления железа, известной как гемохроматоз в клетках от пациентов. Кроме того, удалось восстанавливать функцию гена гемоглобина в клетках человека [27].

Исследователи муковисцидоза (кистозного фиброза, CF) [68] оказались способны продемонстрировать пригодность системы редактирования генов CRISPR/Cas9 для исправления поврежденного гена *CFTR* (DF508) в кишечных стволовых клетках, полученных от пациентов. Это позволяло *in vitro* возвращать клетки к нормальному фенотипу. Сходная ситуация наблюдалась с более редкой мутацией гена *CFTR* в бронхиальных эпителиальных клетках [59].

Синдром прогерии Hutchinson-Gilford (HGPS) возникает в результате точечной мутации в гене *LMNA*, замещающей цитозина в позиции 1824 на тимин. Была продемонстрирована пригодность системы CRISPR/Cas9 с использованием HDR-репарации для синдрома HGPS, используя фибробласты от пациентов, которые были получены и де-дифференцированы в iPSC перед их обработкой [52]. Изменение генома HIV с помощью CRISPR/Cas9, используя клетки, получаемые от пациентов, также было успешно продемонстрировано *in vitro* [22, 35], и это является важной первой

ступенью генотерапии в качестве возможного лечения HIV/AIDS [71].

Была разработана *in vitro* система векторов, содержащих CRISPR Cas9-нуклеазу и Cas9-никазу, одновременно воздействующих на многие домены генома вируса гепатита HBV. В результате наблюдалось достоверное снижение как промежуточных форм размножающегося вируса, так и антигенных доменов его оболочки. Предполагается, что такой подход в будущем может быть использован для лечения пациентов с гепатитом В [66].

В упомянутой выше работе Zhang с соавт. (2017) [86] редактировали фибробласты не только мышей mdx, но и фибробласты, полученные от пациентов с DMD, которые исправляли и превращали в iPSCs. Когда отредактированные стволовые клетки дифференцировались в кардиомиоциты, то они экспрессировали восстановленный белок дистрофин и по своим параметрам были близки к обычным кардиомиоцитам.

Рассматривается потенциальная возможность использования технологии CRISPR/Cas в области ревматологии [21]. Недавно было показано, что с помощью системы CRISPR можно исправлять клетки Treg за счет редактирования их эпигенома [62].

Консультативным советом при NIH была одобрена заявка на использование CRISPR/Cas9, с целью усиления терапии рака на основе использования Т клеток раковых пациентов, редактирование и нормализация которых позволили бы этим клеткам более эффективно атаковать раковые клетки [23].

Подход ex vivo

Для замещения генов необходимо *ex vivo* подготовить клетки и внести в них или нормальный ген или его фрагменты [9]. Терапевтические подходы, базирующиеся на заместительной терапии, с аутологическими и гетерологическими пересадками скорректированных iPSC рассмотрены в недавнем обзоре Shi с соавт. (2017) [69]. Прекрасным примером данного подхода является случай ген-модифицированных клеток кожи мальчику с буллезным эпидермолизом [36]. Из кожи пациента были получены стволовые клетки, в которые был введен нормальный ген *LAMB3*. Из стволовых клеток получены трансплантаты кожи, с помощью которых удалось заместить 80% кожи пациента.

Показательной для концепции генотерапии стала группа болезней, характеризующаяся тяжелым комбинированным иммунодефицитом SCID (Severe combined immunodeficiency), возникающих в результате мутаций разных генов, экспрессирующихся в гематопозитических клетках [14], в частности гена *ADA* (аденозиндеаминазы). При использовании ретровирусного вектора для переноса в геном нормального гена удалось вылечить десятки пациентов с SCID или облегчить их состояние. Результаты ADA-генотерапии с помощью аутологических лимфоцитов периферической крови показали, что величина

производимых векторами системных уровней аденозин-деаминазы недостаточна для получения адекватных уровней циркулирующих энзимов для детоксификации тканей и органов пациентов. Было предположено, что помещение генов в плюрипотентные гематопозитические стволовые клетки будет приводить к продукции мультиклонального потомства генетически скорректированных клеток и приводить к полной коррекции иммунной системы и адекватной детоксификации токсических метаболитов, элиминируя тем самым большинство метаболических последствий болезни. Использование генотерапии *ex vivo* было разрешено для продуктов компаний Strimvelis и Zalmoxis [7].

Редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9 системы в плюрипотентных стволовых клетках человека может быть использовано для лечения некоторых заболеваний путем внесения их в организм человека [30]. Оказалась осуществимой репарация гена IL2R-gamma в гематопозитических стволовых клетках человека и введения их мышам. После редактирования клетки HSCs оказались способны поддерживать нормальный гематопоз и давать функциональные лимфоидные клетки, но до клинического тестирования дело не дошло [28].

Возрос интерес к иммунно-онкологическим подходам для лечения резистентных раковых опухолей с помощью специфичных для опухолей эффекторных Т-клеток, и к потенциальному вкладу генетически преобразованных эффекторных Т-клеток с генами рецептора химерного антигена CAR или Т-клеточного рецептора TCR. Было показано, что CAR Т-клетки обладают потенциалом проникать в солидные опухоли и убивать раковые клетки с высокой эффективностью. Новые технологии, такие, как редактирование генов CRISPR, также способствуют продвижению в направлении клинического их использования [7].

Этот подход был успешно использован и для добавления функционального гена β-глобина для лечения β-талассемии [57]. Продемонстрирована пригодность стволовых клеток для улучшения функции сердца с помощью исправленных кардиальных клеток-предшественников при инфаркте миокарда [58] и нейральных каналопатиях [82].

Группой китайских ученых протестирована система CRISPR в культурах Т-клеток человека с раком легких [73]. Использование этой системы для клинического испытания получило разрешение от этического комитета и руководства госпиталя. В настоящее время начато получение иммунных Т-клеток из крови пациентов, чтобы с помощью CRISPR/Cas9 делетировать ген, продуцирующий белок PD-1 (programmed cell death protein 1), удерживающий иммунный ответ под контролем. Этот ген большинство раковых опухолей может выключать, блокируя тем самым Т-клеточные противоопухолевые атаки. Модифицированные Т-клетки предполагается культивировать и затем вводить обратно пациентам. Каждый из 10 участников получит по 2–4 инъекции.

Первые инъекции проведены в октябре 2016 г. Цель клинического испытания — установить степень надежности и безопасности данной технологии [18]. Заключение о результатах клинического испытания ожидается в 2018 г.

В другой исследовательской группе для нейтрализации гена *PD-1* предложен метод улучшения доставки Cas9 рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса в разные типы клеток, включая и первичные CD4+ Т-клетки с использованием деформации клеток с помощью микро-жидкостного потока. RNP Cas9/sgRNA вместе с гомологичной донорской ДНК доставляли в CD4+ Т-клетки человека. При этом sgRNA и матрица для HDR содержали новый HindIII сайт, способный направлять процесс ферментативного расщепления, ограничиваясь только локусом *PD-1*. Этот подход достоверно снижал процент клеток с высоким уровнем PD-1 на клеточной поверхности по сравнению с контролем, укорачивал время реакции и снижал частоту эффектов вне мишени [33].

Вслед за разрешением клинического применения препарата Glybeга для доставки нормального терапевтического гена для лечения дефицита липопротеинлипазы, администрация США по контролю за продуктами и лекарствами (Food and Drug Administration, FDA) разрешила использование ген-терапевтического лечения Kymriah (tisagenlecleucel), разработанного Novartis Pharmaceuticals Corp., при остром лимфобластном лейкозе (<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm57405>). Лимфоцитарные Т-клетки пациента собираются и отправляются в производственный центр, где они генетически модифицируются, вводится нормальный ген, который продуцирует специфический белок (рецептор химерного антигена или CAR), нацеленный на уничтожение лейкоцитарных клеток, которые имеют на поверхности специфический антиген CD19. Измененные аутологичные клетки вводят обратно пациенту, чтобы убить раковые клетки. При клиническом исследовании 63 детей и молодых взрослых пациентов общий показатель ремиссии в течение трех месяцев лечения составил 83%.

Подходы in vivo

Компания Myonexus Therapeutics объявила о начале клинических испытаний по генотерапии мышечной дистрофии поясов конечностей (limb-girdle muscular dystrophies (LGMDs)) (<http://www.prweb.com/releases/2017/06/prweb14395332.htm>).

Однако переход от экспериментов на животных к клиническим испытаниям на человеке наталкивается на серьезные затруднения. В первую очередь, это крайне низкая эффективность исправления генома. Так, при попытке терапии наследственной тирозинемии типа I на мышцах, вызываемой мутацией гена *FAH* удавалось репарировать одну на каждые 250 клеток печени [84]. Обнаружено также быстрое разрушение системы редактирования в теле [66], и выявлен ограниченный

период эффективности. Ещё более существенным препятствием является возникновение эффектов от действия системы CRISPR/Cas вне мишени (т.е. разрезание DNA в нежелательных местах).

В случае рака легкого возможно с помощью системы CRISPR/Cas9 корректировать или разрушать мутантный ген *EGFR* (Epidermal growth factor receptor). После обнаружения мутаций *EGFR* в биоптатах, взятых от индивидуальных пациентов, мутантный ген *EGFR* в клетках легкого должен быть репарирован или разрушен. Разработана потенциальная распознающая последовательность sgRNA для экзона 20 T790M и экзона 19 del. В этом случае редактирование должно приводить к инсерции стоп-кодона путем HDR-репарации, что должно вызывать завершение трансляции *EGFR* на уровне экзона 19 или 20, или, в случае NHEJ-репарации, к случайным делециям и/или инсерциям, нарушающим активность мутантного гена *EGFR* и прекращающим прогрессирование рака. Однако подобная терапия может лишь предупреждать появление вторичных геномных мутаций [76]. Применение этого подхода должно сопровождаться традиционной хирургией, облучением или химиотерапией.

Группой китайских ученых технология CRISPR/Cas9 была использована для редактирования трехядерных зигот — нежизнеспособных ранних эмбрионов человека [49]. Затем система редактирования CRISPR/Cas9 была использована для исправления эндогенного гена β -глобина в клетках от пациентов с β -талассемией. Были выбраны три сайта-мишени в локусе HBB (beta-globin gene), соответствующие трем наиболее распространенным мутациям, и получены соответствующие специфические последовательности каждой sgRNA (G1, G2 и G3). Клетки 293T были индивидуально трансфицированы тремя векторами экспрессии, содержащими комплекс sgRNA-Cas9. Спустя 48 ч после трансфекции геномная ДНК была выделена, регионы, соответствующие сайтам мишеням, были амплифицированы методом PCR. PCR-продукты были затем субклонированы. Авторы были удивлены большим количеством эффектов (разрывов ДНК) вне мишени, включая даже некоторые удаленные места в геноме.

В связи с этим эксперты предложили наложить мораторий на такие исследования на клетках человека (<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/42425/title/Call-for-Germline-Editing-Moratorium/>). Однако недавно экспертным советом было предложено ограничить этот запрет только редактированием генов половых клеток, оставляя возможным использование редактирования генов в соматических клетках человека (<http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=24623>).

Однако в работе Ma с соавт. (2017) [55] удалось преодолеть и этот запрет с большой осторожностью, когда развитие ген-модифицированных эмбрионов человека ограничивалось первыми немногими делениями. Ги-

пертрофическая кардиомиопатия (HCM) является наиболее распространенной причиной внезапной смерти у в общем-то здоровых молодых атлетов и встречается приблизительно у 1 на 500 человек. Она вызывается доминантной мутацией в гене *MYBPC3*, но часто остается недиагностированной. Исследователи сгенерировали iPSC из кожного биоптата, полученного от мальчика с HCM кардиомиопатией и разработали стратегию редактирования гена на базе технологии CRISPR-Cas9, которая специфически нацелена на мутантную копию гена *MYBPC3*. Используя технику оплодотворения *in vitro*, исследователи инъекцировали подготовленные компоненты для редактирования гена в донорскую яйцеклетку, оплодотворенную донорским спермием. Затем они после нескольких циклов деления анализировали все клетки ранних эмбрионов по отдельности, чтобы посмотреть насколько эффективно репарировалась мутация. Был получен не только высокий процент репарированных эмбриональных клеток, но и также исправление гена не вызывало индукцию каких-либо обнаружимых мутаций вне мишени и геномную нестабильность. Установлено, что коррекция гена, по-видимому, более эффективна у эмбрионов с одной мутантной копией гена *MYBPC3*. Это частично обусловлено тем, что после CRISPR-Cas9-обусловленного ферментативного разрезания мутантной копии гена, эмбрион иницирует свою собственную репарацию. Вместо использования предусмотренной синтетической ДНК-матрицы эмбрион предпочитал использовать доступную здоровую копию гена, чтобы репарировать мутантную часть.

Сходный подход редактирования генома ранних эмбрионов человека с помощью CRISPR-Cas9 был использован для инактивации гена *OCT4* [24]. Этот подход, безусловно, является очень перспективным и в отношении других генных заболеваний.

Заключение

В настоящее время в связи с большими финансовыми затратами на разработку новых технологий и их усовершенствование, привлекаются гранты от всевозможных фондов. Каждое усовершенствование сейчас же закрепляется патентами. В связи с этим наблюдается впечатляющее зрелище войны патентов между биотехническими компаниями за продвижение CRISPR-системы на терапевтический рынок. Продолжается и борьба за технологию между академическими институтами. В целом, несмотря на огромные надежды, возлагаемые на технологию CRISPR/Cas9, денежные вливания и привлечение огромных людских ресурсов, она пробивает себе дорогу в клинику медленно и с трудом из-за значительных препятствий [17, 34]. Однако, безусловно, эта технология геномного редактирования — технология будущего и огромные затраты на её разработку будут оправданы.

Приятно отметить, что в очень важной работе по редактированию генома клеток эмбрионов человека [55] участвует бывший сотрудник нашего института Ш. Миталипов.

Список литературы

1. Мелинец В.А. Успехи в системе редактирования генома CRISPR/Cas. I. Модификации и улучшение системы// Успехи современной науки. Белгород.
2. Bailus B.J., Pyles B., McAlister M.M., et al. Protein Delivery of an Artificial Transcription Factor Restores Widespread Ube3a Expression in an Angelman Syndrome Mouse Brain// *Molec. Therapy*. — 2016. -Vol. 24(3). — P. 548-555.
3. Basu S., Adams L., Guhathakurta S. and Kim Y.-S. A novel tool for monitoring endogenous alpha-synuclein transcription by Nano-Luciferase tag insertion at the 3' end using CRISPR-Cas9 genome editing technique// *Scientific Reports*. 2017. — Vol. 7, Article number: 45883
4. Batra R., DNelles. A., Krach F. et al. Reversal of molecular pathology by RNA-targeting Cas9 in a myotonic dystrophy mouse model// *bioRxiv preprint first posted online Sep. 4, 2017*; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/184408>
5. Barzel A., Paulk N.K., Shi Y., et al. Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice// *Nature*. — 2015. — Vol. 517. — P. 360-364.
6. Bell S., Peng H., Crapper L., et al. A Rapid Pipeline to Model Rare Neurodevelopmental Disorders with Simultaneous CRISPR/Cas9 Gene Editing// *STEM CELLS Translational Medicine*. — 2017. — Vol. 6 (3). — P. 886-896.
7. Bordignon C. Twenty-five years of gene therapy for genetic diseases and leukemia: The road to marketing authorization of the first ex vivo gene therapies// *Journal of Autoimmunity* Available online 16 July 2017
8. Brunger J.M., Zutshi A., Willard V.P., et al. Genome Engineering of Stem Cells for Autonomously Regulated, Closed-Loop Delivery of Biologic Drugs// *Stem Cell Reports*. — 2017- Vol. 8(5). — P. 1202-1213.
9. Calos M.P. Genome Editing Techniques and Their Therapeutic Applications// *Clin.Pharmacol. and Ther.* — 2016. — Vol. 101. — *Therapeutic Innovations*. P. 42-51.
10. Cantore A., Ranzani M., Bartholomae C.C., et al. Liver-directed lentiviral gene therapy in a dog model of hemophilia B// *Sci. Transl. Med.* — 2015. — Vol. 7. — P. 277ra228
11. Cebrian-Serrano A., Davies B. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools// *Mammalian Genome*. - 2017 — Vol. 28(7). — P. 247-261.
12. Carroll K. J., Makarewicha C. A., McAnally J., et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9// *PNAS*. — 2016.- Vol. 113 (2). — P. 338-343.
13. Chakraborty S., Ji H., Kabadi A.M., et al. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification// *Stem Cell Rep.* — 2014. — Vol. 3. — P. 940-947.
14. Cicalese, M.P. & Aiuti, A. Clinical applications of gene therapy for primary immunodeficiencies// *Hum. Gene Ther.* — 2015. — Vol. 26. — P. 210-219.
15. Cong L., Ran F.A., Cox D., et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems// *Science*. — 2013. — Vol. 339. P. 819-823.
16. Cooney A.L., Alaiwa M.H.A., Shah V.S., et al. Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs// *JCI Insight*. — 2016. — Vol. 1(14). — P. e88730.
17. Cornu T.I., Mussolino C., Cathomen T. Refining strategies to translate genome editing to the clinic// *Nature Med.* — 2017. — Vol. 23. — P. 415-423.
18. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time// *Nature*. — 2016. — Vol. 535 (7630). — P. 476-477.
19. De Ravin S.S., Li L., Wu X., et al. CRISPR-Cas9 gene repair of hematopoietic stem cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease// *Sci. Translational Med.* — 2017. — Vol. 9 (372). — P. pii: eaah3480
20. Dow L.E. Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9// *Trends in Mol. Med.* — 2015. — Vol. 21 (10). — P. 609-621.
21. Duroux-Richard I., Giovannangeli C., Apparilly F. CRISPR-Cas9: A revolution in genome editing in rheumatic diseases // *Joint Bone Spine*. — 2017. — Vol. 84(1) — P. 1-4
22. Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus// *Sci Rep*. — 2013. — Vol.3. — P. 2510.
23. Eyquem J., Mansilla-Soto J., Giavridis T., et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection// *Nature*. — 2017. — Vol. 543. — P. 113-117.
24. Fogarty N.M.E., McCarthy A., Snijders K.E., et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis// *Nature*. 2017. — DOI: 10.1038/nature24033
25. Gao X., Tsang J.C.H, Gaba F., et al. Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers// *Nucleic Acids Res.* — 2014. — Vol. 42. — P. e155-e155.
26. Gao Y., Wu H., Wang Y., et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects// *Genome Biol.* — 2017.- Vol.18 (1). — P. 13
27. 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. — DOI:10.1038/nature24644
28. Genovese P, Schirolli G, Escobar G. et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells// *Nature*. — 2014. — Vol.510(7504). — P.235-240.
29. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes// *Cell*. — 2013. — Vol. 154.- P. 442-451.
30. Gonzalez F. CRISPR/Cas9 genome editing in human pluripotent stem cells: Harnessing human genetics in a dish// *Dev. Dyn.* — 2016. — Vol. 245 (7). — P. 788-806.
31. 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. — Vol. 8 (5). — P. 477-488.
32. Gyorgy B., Sage C., Indzhykulian A.A., et al. Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV// *Mol. Therapy*. — 2017. — Vol. 25(2). — P. 379-391.
33. Han X., Liu Z., Ma Y., et al. Cas9 Ribonucleoprotein Delivery via Microfluidic Cell-Deformation Chip for Human T-Cell Genome Editing and Immunotherapy// *Adv. Biosys.* — 2017. — Vol. 1 (1-2). — P. 1600007.
34. Haussecker D. Stacking up CRISPR against RNAi for therapeutic gene inhibition// *FEBS J.* — 2016. — Vol. 283 (17). — P. 3249-3260.
35. Hu W, Kaminski R, Yang F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2014. — Vol.111. — P. 11461-6.
36. Hirsch T., Rothoefl T., Teig N., et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*, 2017; DOI: 10.1038/nature24487
37. Huang X, Zhou G, Wu W, et al. Genome editing abrogates angiogenesis in vivo// *Nature Communications*. — 2017. — Vol. 8 (1) DOI: 10.1038/s41467-017-00140-3

38. Jinek M., East A., Cheng A., et al. RNA-programmed genome editing in human cells// *Elife*. — 2013. — Vol. 2. — P. e00471.
39. Kalebic N., Taverna E., Tavano S., et al. CRISPR/Cas9-induced disruption of gene expression in mouse embryonic brain and single neural stem cells *in vivo*// *EMBO Rep*. — 2016. — V. 17 (3). — P. 338-348.
40. Katayama S., Moriguchi T., Ohtsu N., Kondo T. A Powerful CRISPR/Cas9-Based Method for Targeted Transcriptional Activation// *Angew Chem Int Ed Engl*. — 2016. — Vol. 55(22). — P. 6452-6456.
41. Kearns NA, Genga RMJ, Enuameh MS, et al. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells// *Develop*. — 2014. — Vol. 141. — P. 219-223.
42. Keeler G.D., Kumar S., Palaschak B. et al. Gene Therapy-Induced Antigen-Specific Tregs Inhibit Neuro-inflammation and Reverse Disease in a Mouse Model of Multiple Sclerosis// *Molecular Therapy*. — 2017- DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.09.001
43. Kiani S, Chavez A, Tuttle M, et al. Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression// *Nat Methods*. — 2015. — Vol. 12. — P. 1051-1054.
44. Kim E., Koo T., Park S.W., et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*// *Nature Communic*. — 2017. — Vol. 8. — P. 14500
45. Kim K., Park S.W., Kim J.H., et al. Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration// *Genome Res*. — 2017. DOI: 10.1101/gr.219089.116 **
46. Kim Y.B., Komor A.C., Levy J.M., et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions// *Nat. Biotechnol*. — 2017. — Vol. 35(4). — P. 371-376.
47. Konermann S, Brigham MD, Trevino A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states// *Nature*. — 2013. — Vol. 500. — P. 472-476.
48. Lee K., Conboy M., Park H.M., et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair // *Nature Biomedical Engineering* (2017) doi:10.1038/s41551-017-0137-2
49. Liang P., Xu Y., Zhang X., et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes// *Protein & Cell*. — 2015. — Vol. 6 (5). -P. 363-372.
50. Liang W-C., Liang P-P., Wong C-W., et al., CRISPR/Cas9 Technology Targeting Fas Gene Protects Mice From Concanavalin-A Induced Fulminant Hepatic Failure// *J. Cell. Biochem*. — 2017. — Vol. 118(3). — P. 530-536
51. Limsirichai P., Gaj T., Schaffer D.V. CRISPR-mediated activation of latent HIV-1 expression// *Mol Ther*. — 2016. — Vol. 24. — P. 499-507.
52. Liu, G., Suzuki, K., Qu, J., et al. Targeted Gene Correction of Laminopathy-Associated LMNA Mutations in Patient-Specific iPSC// *Cell Stem Cell*.- 2011. -Vol. 8 (6).- P. 688-694.
53. Long C., Amoasi L, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy// *Science*. — 2016. — Vol. 351. — P. 400-403.
54. Loperfido, M., Jarmin S., Dastidar S. et al. piggyBac transposons expressing full-length human dystrophin enable genetic correction of dystrophic mesoangioblasts// *Nucl. Acids Res*. — 2016.- Vol.44. — P. 744-760.
55. Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.-W., et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. — 2017. — Vol. 548(7668). — P. 413-419.
56. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas// *Science*.- 2013. — Vol. 339. — P. 823-826.
57. Mansilla-Soto, J., Riviere, I., Boulad, F. & Sadelain, M. Cell and gene therapy for the Beta-thalassemias: advances and prospects// *Hum. Gene Ther*. — 2016. — Vol. 27. — P. 295-304.
58. Matkar P.N., Leong-Poi H. and Singh K.K. Cardiac gene therapy: are we there yet?// *Gene Therapy*. — 2016. — Vol. 23. — P. 635-648.
59. Molinski S.V., Ahmadi S., Ip W., et al. Orkambi® and amplifier co-therapy improves function from a rare CFTR mutation in gene-edited cells and patient tissue// *EMBO Molecular Med*. — 2017. — Vol. 9. — P. 1224-1243.
60. Moreno A.M., Mali P. Therapeutic genome engineering via CRISPR-Cas system// *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine (WIREs)* — 2017. — Vol. 9(4). — P. e1380.
61. Nelson C.E. Hakim C.H., Ousterout D.G., et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy// *Science*. — 2016. — Vol. 351 (6271). — P. 403-407.
62. Okada M., Kanamori M., Someya K. et al. Stabilization of Foxp3 expression by CRISPR-dCas9-based epigenome editing in mouse primary T cells// *Epigenetics & Chromatin*. — 2017. — Vol.10. — P. 24
63. Pan B., Askec C., Galvin A., et al. Gene therapy restores auditory and vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1c// *Nat. Biotechnol*. — 2017. — Vol. 35(3). — P. 264-272.
64. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. — 2013. — Vol. 152. — P. 1173-1183.
65. Ran F.A. Cong L., Yan W.X., et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9// *Nature*. — 2015. — Vol. 520. — P. 186-191.
66. Sakuma T., Masaki K., Abe-Chayama H., et al. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus// *Genes to Cells*. — 2016. — Vol. 21 (11). — P. 1253-1262.
67. Schirolli G., Ferrari S., Conway A., et al. Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1// *Science Translational Medicine*. 2017. — Vol. 9(411), eaan0820.
68. 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. — Vol. 13(6). — P. 653-658.
69. Shi Y., Inoue H., Wu J.C., Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress// *Nat. Rev. Drug Discovery*. — 2017. — Vol. 16. — P.115-130.
70. Simeonov D.R., Gowen B.G., Boontanrart M. et al. Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with CRISPR activation. *Nature*. — 2017 — Vol. 549. — P. 111-1115.
71. Spragg, C., Feelixge, H.D.S., Jerome, K.R. Cell and gene therapy strategies to eradicate HIV reservoirs.// *Current Opinion in HIV and AIDS*. — 2016.- Vol. 11 (4). — P. 442-449.
72. Staahl B.T., Benekareddy M., Coulon-Bainier C., et al. Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes// *Nat. Biotechnol*. — 2017. — Vol. 35(5). — P. 431-434.
73. Su S., Hu B., Shao J., et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients// *Sci Rep*. — 2016. — Vol. 6. — Article number: 20070.
74. Suzuki K., Tsunekawa Y., Hernandez-Benitez R., et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration// *Nature*. — 2016. — Vol. 540. — P. 144-149.
75. Tabeordbar M. Zhu K., Cheng J.K., et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells//*Science*. — 2016. — Vol. 351.- P. 407-411.
76. Tang H., Shrager J.B. CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular

surgical therapy// *EMBO Mol. Med.* — 2016. — Vol.8 (2). — P.83-85.

77. *Tschaharganeh D.F., Lowe S.W., Garippa R.J., Livshits G.* Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease *in vivo*// *FEBS J.* — 2016. — Vol. 283(17). — P.3194-3203.

78. *Vojta A., Dobrinic P., Tadic V., et al.* Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation// *Nucl. Acids Residues.* — 2016.- Vol. 44.- P. 5615-5628.

79. *Vora S., Tuttle M., Cheng J., Church G.* Next stop for the CRISPR revolution: RNA-guided epigenetic regulators// *FEBS J.* — 2016. — Vol. 283 (17). — P. 3181-3193.

80. *Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, et al.* Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9// *Cell Stem Cell.* — 2013. — Vol.13. — P. 659-62.

81. *Wu Y, Zhou H, Fan X, et al.* Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells// *Cell Res.* — 2015. — Vol.25. — P. 67-79.

82. Wykes R.C, Lignani G. Gene therapy and editing: Novel potential treatments for neuronal channelopathies// *j. Neuropharm.* -2017. — pii: S0028-3908(17)30254-X.

83. *Xu L., Park K.H., Zhao L., et al.* CRISPR-mediated Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Function in mdx Mice// *Mol. Therapy.* — 2016. — Vol.4(3). — P. 564-569.

84. *Yin H, Xue W, Chen S, et al.,* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype// *Nat Biotechnol.* — 2014. — Vol. 32. — P. 551-553.

85. *Zarbin M.* Cell-Based Therapy for Degenerative Retinal // *Trends in Mol.Med.* — 2016. — Vol. 22 (2). — P. 115-134.

86. *Zhang Y., Long C., Li H., et al.* CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice// *Sci. Adv.* — 2017.- Vol. 3(4). — P. e1602814

87. *Zhang Y., Yin C., Zhang T., et al.* CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs// *Sci Rep.* — 2015. — Vol. 5. — P. 16277.

88. *Zhao, C. Farruggio A.P., Bjornson C.R.R.* et al. Recombinase-mediated reprogramming and dystrophin gene addition in mdx mouse induced pluripotent stem cells// *PLoS One.* — 2014. -Vol. 9. — P. e96279.

89. *Zhou W., Deiters A.* Conditional Control of CRISPR/Cas9 Function// *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* — 2016. — Vol. 55(18). — P. 5394-5399.

90. *Zhu J., Ming C., Fu X., et al.* Gene and mutation independent therapy via CRISPR-Cas9 mediated cellular reprogramming in rod photoreceptors// *Cell Research.* — 2017. — Vol. 27. — P.830-833.