



КОМИСАРЕНКО

Сергей Васильевич – академик НАН Украины, директор Института биохимии им. О.В. Палладина НАН Украины



РОМАНЮК

Светлана Ивановна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института биохимии им. О.В. Палладина НАН Украины

## РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА, ИЛИ CRISPR/CAS9 — ПАНАЦЕЯ ОТ МНОГИХ НЕИЗВОЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ИЛИ ПЕРВЫЙ ШАГ К ГЕННОМУ АПОКАЛИПСИСУ?

В обзоре говорится об истории открытия, бурном развитии и дальнейших перспективах применения нового мощного инструмента для редактирования генома — CRISPR/Cas9. Взяв за основу один из элементов защитной системы бактерий, ученые-биологи создали довольно простой, дешевый и быстрый метод внесения изменений в ДНК растений, животных и человека. Никогда раньше человечество не имело столь точного орудия для манипуляции генами, и это открывает широкие возможности для профилактики и лечения многих заболеваний. В то же время в обществе ведутся острые дискуссии: благо или зло несет человечеству CRISPR/Cas9? Как и любая новая технология, геномное редактирование вызывает опасения и поднимает ряд серьезных этических проблем, особенно о возможности его использования на клетках зародышевой линии и геноме эмбрионов человека. Однако уже сейчас очевидно, что CRISPR/Cas9 — это не очередная модная игрушка для ученых, а революционная технология, которая изменит наше будущее. Ключевые слова: CRISPR/Cas9, редактирование геномной ДНК, геновая терапия, генетически модифицированные организмы.

История науки знает много примеров, когда случайное открытие в непопулярной области науки приводило к научному прорыву, который делал возможным осуществление самых заветных мечтаний человечества. Так были открыты антибиотики, рентгеновское излучение и т.д. Вот и сейчас мы являемся свидетелями развертывания подобной научной революции в генетике. Кажется, в распоряжении генетиков появился инструмент, способный в короткие сроки сделать научную фантастику реальностью. Научное сообщество активно обсуждает перспективы лечения рака и неизлечимых наследственных заболеваний путем удаления из организма дефектных генов. В геометрической прогрессии растет количество научных статей по этой тематике, в печати постоянно появляются сообщения, интервью, идут дискуссии. Виновниками такого «переполюса» являются авторы неожиданно

был разработан метод CRISPR/Cas9 для точного редактирования генома живых организмов.

Открытие CRISPR/Cas9 уже отмечено множеством научных наград и, несомненно, заслуживает самого престижного научного отличия — Нобелевской премии. Основная часть этой статьи была написана несколько лет назад как предвестница этого события. Однако Нобелевский комитет по разным причинам пока не спешит принимать положительное решение, в частности, вероятнее всего, из-за судебных проволочек относительно патентования этой методики, которая продолжается в последние годы. Несмотря на это, практическое применение технологии CRISPR/Cas9 с каждым годом становится все шире и имеет многочисленные достижения в области биотехнологии и медицины, значение которых для человечества сложно переоценить. Поэтому, по нашему мнению, важно и интересно рассмотреть основные направления и перспективы развития этой технологии, а также очертить имеющиеся

проблемы. С чего началась история открытия CRISPR/Cas9? Как ни странно, из исследований о тивирусном иммунитете бактерий. В 50-х годах XX ст. ученые обратили внимание на то, что некоторые штаммы бактерий легко заражаются вирусами, а другие штаммы того же вида — устойчивы к заражению. Двадцать лет исследований дали свои результаты: оказалось, что устойчивость определенных бактериальных штаммов к вирусам объясняется наличием у бактерий специальных энзимов – рестриктаз (от лат. restrictio – ограничения), разрезающих вирусную ДНК. Интересной особенностью этих энзимов является их четкая специфичность к определенной небольшой последовательности ДНК. Собственную ДНК бактерии связываются с рестриктазой с помощью метилирования нуклеотидных остатков аденина и цитозина. Первую рестриктазу (EcoK) в 1968 г. выделили Мэтью Мезельсон (Matthew Meselson) и Роберт Юань (Robert Yuan) [1]. Способность этих энзимов «резать» ДНК в четко определенной точке использовалась учеными для получения нужных фрагментов геномной ДНК. В 1978 г. за открытие рестриктаз и их применение в молекулярной генетике Вернера Арбера (Werner Arber), Гамильтона Смита (Hamilton O. Smith) и Даниэла Натанса

(Daniel Nathans) была удостоена Нобелевской премии. А в 1967 г. Бернхард Вейсс (Bernhard Weiss) и Чарльз Ричардсон (Charles Richardson) впервые обнаружили специальные «сшивающие» энзимы — ДНК-лигазы [2]. Использование лигаз и рестриктаз дало возможность создавать искусственные конструкции из ДНК живых организмов. Так появилась новая область науки — генная инженерия, позволившая создавать генно-модифицированные организмы (ГМО), рекомбинантные протеины, индуцированные

стволовые клетки и т.д. Что такое CRISPR/Cas9? И при чем здесь о тивирусном иммунитете бактерий? Оказалось, что бактерии защищаются от вирусов не только с помощью рестриктазы, ведь вирус может не иметь в своей ДНК последовательности, необходимой для расщепления этими энзимами. Есть и другой, более действенный механизм, предоставляющий бактериям специфическую защиту после встречи с определенным вирусом. Этот механизм реализует система с достаточно громоздким названием

CRISPR/Cas9, или «криспер». Когда ДНК вируса проникает в бактерию, происходит копирование фрагмента этой ДНК и перенос его в специальное «хранилище» информации о вирусах в собственном геноме — CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — короткие палиндромные по вторам, регулярно расположенные группами). Здесь образцы ДНК разных вирусов (спейсеры) накапливаются между одинаковыми короткими повторами бактериальной ДНК и используются для изготовления CRISPR РНК — crРНК (их еще называют РНК-зондами или РНК-гидами), специфически распознающих гены определенных ДНК бактерий, связываясь с рестриктазой, что предотвращает повторное заражение. Благодаря crРНК вирусную ДНК находят специальные энзимы – протеины Cas (CRISPR ассоциированные протеины), гены которых находятся рядом с массивом CRISPR. Эти энзимы, как и рестриктазы, являются эндонуклеазами, то есть они способны разрезать ДНК вируса, обезвреживая ее.

Рассмотрим подробнее, как работает система CRISPR/Cas9. Лидерная последовательность CRISPR играет роль промотора, с которого начинается транскрипция всего массива. Может, она также распознается протеинами,

которые вставляют в CRISPR новые спейсеры. После транскрипции массива CRISPR образуется длинная молекула РНК, к которой присоединяется небольшая РНК, комплементарная повторам (tracrPНК); к tracrPНК присоединяется протеин Cas9, активируемый при взаимодействии, а к Cas9, в свою очередь, присоединяется энзим РНКаза III, разрезающий длинную РНК на фрагменты — crPНК и отсоединяемый. В *Streptococcus pyogenes*, например, образовавшиеся crPНК состоят из 42 нуклеотидов: 22 концевых нуклеотида — это половина палиндромного повтора, а остальные 20 — уникальный спейсерный фрагмент. Фактически в результате разрезания длинной РНК образуется комплекс crPНК, tracrPНК и активированного протеина Cas9. Спейсерная часть crPНК распознает комплементарный участок вирусной ДНК, а протеин Cas9 замыкается на двух нитях ДНК и «разрезает» их, вызывая дальнейшую деградацию чужеродной ДНК [3]. Для успешного распознавания ДНК-«мише нет» и ее повреждения Cas9 распознал определенную короткую (3–9 нуклеотидов) последовательность PAM (Protospacer Adjacent Motif — мотив, примыкающий к протоспейсам сэра), которая находится рядом с распознанным crPНК участком ДНК. У разных видов бактерий эта последовательность разная; например, для *Streptococcus pyogenes* последовательность PAM – 5'-NRG 3' (где N – любой нуклеотид, а R – A или G). Для чего нужно распознавание PAM? Предполагается, что отсутствие последовательностей PAM в составе собственных генов бактерии защищает их от разрезания системой CRISPR/Cas9, ведь CRISPR содержит 20 % спейсеров, нацеленных на собственную ДНК [4]. Для чего эти спейсеры хранятся, неизвестно. Возможно, у бактерий есть механизм регуляции транскрипции собственных генов, к которому вовлечены CRISPR и специальные протеины. Кто открыл систему CRISPR/Cas9? Споры по этому вопросу продолжаются до сих пор. Ведь в современной науке уже невозможно открыть что-то единолично. История открытия, повлекшая революцию в геномной инженерии, продолжалась в течение 25 лет, и многие ученые внесли в нее свой вклад.

В 1987 г. японские ученые во главе с Йосидзуми Исино (Yoshizumi Ishino) вместе с геном *iap*, который они исследовали, случайно клонировали достаточно большой фрагмент генома кишечной палочки *Escherichia coli*, не кодирующий ни одного протеина [5]. Это было очень странно, поскольку бактерии, как правило, не имеют лишних последовательностей. Участок состоял из повторяющихся последовательностей ДНК и переменных фрагментов ДНК между ними — спейсеров [6]. В 1993 г. ученые из Нидерландов под руководством Яна ван Эмбдена (Jan DA van Embden) исследовали разнообразие прерываемых прямых повторов среди различных штаммов возбудителя туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) и разработали новый метод дифференцировки. Позднее испанец Франсиско Хуан Мартинес Мохики (Francisco Juan Martínez Mojica) нашел по подобным участкам у других видов бактерий и архей и в 2000 г. предложил объединить их в родственницу под названием CRISPR (Clustered Regularly Spaced Repeats — короткие) [8], которую через два года переименовали в CRISPR. Тогда же, в 2002 г., группа ученых из Нидерландов во главе с Рууд Янсенем (Ruud Jansen) открыли гены протеинов Cas, расположенные рядом с участком CRISPR [9]. А в 2005 г. сразу три исследовательские группы независимо друг от друга выяснили, что между повторами CRISPR часто находятся последовательности, идентичные последовательностям ДНК вирусов-бактериофагов и плазмид [10–12]. Эти результаты и предположения о выполнении CRISPR функции противовирусной защиты не вызвали тогда особого интереса. Все изменила научная статья, вышедшая в журнале *Science* в 2007 г. [13]. Ее авторами была группа ученых во главе с Филиппом Хорватом (Philippe Horvath) из компании Danisco (США) — производителя известных йогуртов Danone (в 2011 г. Danisco приобрела компания DuPont за \$6,3 млрд). Дело в том, что при производстве кисломолочных продуктов есть опасность заражения молочнокислых бактерий вирусом микробактериофагами, что может привести к огромным убыткам. Потому в компании Danisco

решили отобрать для производства клоны молочнокислых микробов, устойчивых к вирусу. А поскольку компания использовала CRISPR для классификации своих коммерческих штаммов, ученые сразу заметили, что в участках CRISPR отобранных клонов появлялись новые спейсеры, являющиеся тождественными участкам вирусного генома. Исследователи искусственно вставили спейсер с последовательностью ДНК вируса в участок CRISPR бактерии, что сразу же сделало

ее устойчивой к вирусу. В 2007–2008 гг. были открыты важные детали механизма работы CRISPR. Группа под руководством Джона ван дер Ооста (John van der Oost), например, показала, что защита реализуется через малые РНК [14].

Луциано Марраффини (Luciano A. Marraffini) и Эрик Сонтгеймер (Erik J. Sontheimer) из Северо-Западного университета в Эванстоне (штат Иллинойс, США) доказали, что система CRISPR направлена на разрезание ДНК [15]. Они первыми высказали мнение о возможности использования CRISPR для редактирования генома в гетерологических системах и даже подали заявку на патент, но из-за недостаточности экспериментального подтверждения в конце концов отказались от него [16].

Впоследствии стало известно, что для выполнения защитной функции CRISPR необходимо взаимодействие со многими протеинами Cas, одни из которых связываются с малыми РНК, другие распознают ДНК вируса, а третьи разрезают ее. Однако французская исследовательница Эммануэль Шарпентье (Emmanuelle Charpentier), работающая сейчас преимущественно в Германии и Швеции, выявила разновидность системы CRISPR, которая для полноценной защиты нуждалась только в одном очень большом протеине Cas — его назвали Cas9. В 2012 г. Мартин Джинек (Martin Jinek) из группы Дженнифер Дудны (Jennifer Doudna) из Калифорнийского университета в Беркли (University of California, Berkeley) объединил tracrRNA и crRNA в одну единственную молекулу sgRNA (single-guide RNA — единственная РНК-гид) и создал вектор для клонирования этой РНК. Вы явилось, что такая синтетическая sgRNA корректно работает в клетке в комплексе с протеином Cas9. Тогда же научные группы Э. Шарпентье и Дж. Дудны

опубликовали статью в Science [17], в которой предложили способ использования системы CRISPR/Cas9 для разрезания выбранных исследователем ДНК-мишеней в клетке и продемонстрировали возможность такого подхода в экспериментах *in vitro*. Почти одновременно с ними по подобным статьям опубликовала группа литовского биохимика Виргиниуса Шикшниса (Virginijus Siksnys) из Института биотехнологии Вильнюсского университета [18]. Интересно, что работа Шикшниса была выполнена раньше, но ее публикация задержалась на полгода из-за безосновательного отказа от публикации в журнале Cell. В начале 2013 г. группы Джорджа Черча (George Church) [19] и его бывшего аспиранта Фена Чжана (Feng Zhang) [20] из Института Броуда (Broad Institute of MIT and Harvard) в Кембридже показали, что искусственная crRNA и протеин Cas9 полноценно функционируют в клетках высших организмов. Практически одновременно эффективность такого подхода подтвердили ученые из Южной Кореи в экспериментах с культурой клеток человека [21]. Сразу после этого все забыли о проблемах бактерий в их непростой борьбе с вирусами. Казалось, что научные и общественные издания «взорвались» публикациями исключительно на одну тему: о CRISPR/Cas9 как фантастическом инструменте для редактирования геномов высших организмов.

Почему же открытие технологии CRISPR/Cas9 привело к такому ажиотажу? Дело в том, что эта технология оказалась намного лучше предыдущих методов генной инженерии. Ранее при создании ГМО ученые не имели возможности контролировать, куда именно в геноме и в каком количестве встраивается вирусный вектор с геном-вставкой. Чтобы получить необходимый результат, нужно было провести очень кропотливую и длительную работу, отбрасывая значительное количество неудачных вариантов. Технология CRISPR/Cas9 предложила обычный метод встраивать ген-вставку в определенную последовательность ДНК. Кроме того, эта технология дает возможность работать в клетках всех организмов — от бактерий до млекопитающих. Систему CRISPR/Cas9 можно использовать не только в лаборатории, как рестриктазы, но и непосредственно в

одновременно редактировать неограниченное количество генов в геноме, а также вводить компоненты системы не только в отдельные клетки, но и в целые ткани или весь организм. Неоспоримые преимущества CRISPR/Cas9 значительно сокращают длительность генно-инженерных работ и позволяют уже сейчас рассматривать реальную возможность применения этой системы для модификации эмбрионов человека, лечения рака или

наследственных заболеваний. Конечно, есть и другие инструменты для редактирования генома, а именно: мегануклеазы, TALEN и нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN — Zinc-Finger Nucleases). Мегануклеазы — это природные ДНК-нуклеазы, находящиеся у фагов, бактерий, грибов, водорослей и некоторых растений. Они кодируются мобильными генетическими элементами и распознают большие участки ДНК (12–40 пар оснований), благодаря чему их считают наиболее специфическими природными рестриктазами. С момента открытия в 1990-х годах наиболее известными стали мегануклеазы I-SceI, I-CreI и I-DmoI семейства LAGLIDADG (название происходит от характерной для этих протеинов последовательности). Эти небольшие протеины встречаются в митохондриях и хлоропластах эукариотических одноклеточных организмов и известны своими тесно упакованными трехмерными структурами. Однако широкого применения в генной инженерии мегануклеазы не получили, поскольку достаточно сложно подобрать среди них фермент, который разрезал бы ДНК в нужном месте. Сейчас ученые пытаются создать более совершенные генно-инженерные мегануклеазы и их гибриды с другими протеинами [22]. Системы редактирования генома TALEN и ZFN — это генно-инженерные протеины, содержащие расщепляющий ДНК домен ДНК-нуклеазы и домены других протеинов, которые после модификации приобретают способность связываться с определенной последовательностью ДНК. В состав протеинов TALEN входит домен протеина TALE (Transcription Activator-Like Effector — эффектор, подобный активатору транскрипции) фитопатогенной бактерии *Xanthomonas*, однако иены ZFN содержат

Однако применение систем TALEN и ZFN для редактирования генома требует создания отдельного искусственного протеина для каждой новой ДНК-мишени. В отличие от них, система CRISPR использует универсальный протеин Cas9, а изменять необходимо только sgРНК. Это гораздо проще и дешевле, поскольку любые РНК можно легко синтезировать. Еще одним преимуществом системы CRISPR/Cas9 перед другими инструментами редактирования генома является возможность ее применения к РНК, что предоставляет более гибкие возможности для воздействия на биохимические процессы в клетке. Для редактирования одной ноцепочечной РНК необходимо добавить crРНК, протеин Cas9 и ДНК-олигонуклеотид, содержащий последовательность PAM, — PAMmer [23]. Так, в 2016 г. было предложено с помощью системы CRISPR/Cas9 отслеживать долю определенных РНК в живой клетке без применения генетических меток – тегов [24]. Биотехнологические фирмы уже давно продают векторы для удобной доставки в клетку компонентов системы CRISPR/Cas9 с целью редактирования генома. Компания открытого обмена Addgene (Кембридж, США) осенью 2018 г. сделала большой шаг, бесплатно передав более 1 млн плазмид ученым всего мира, а недавно у нее появилась новая услуга — расширение вирусных векторов, прежде всего ленты вирусов и адено-ассоциированного вируса (AAV)[25]. Векторы для CRISPR/Cas9 представляют собой кольцевую молекулу ДНК, кодирующую РНК и матричную РНК протеина Cas9. Следовательно, исследователь может разрезать любую последовательность ДНК в клетке, включив в РНК соответствующий комплементарный фрагмент. Конечно, необходимо выбрать такую последовательность, которая не повторяется в других участках генома. Далее вектор размножают в клетках специального лабораторного штамма кишечной палочки (где он не считывается из-за несоответствия командных сигналов), выделяют из бактерий и трансформируют им клетки, геном которых хотят изменить. Ученые всего мира бросились использовать технологию CRISPR/Cas9 для редактирования геномов вирусов,

бактерий, животных и растений. транскрипции, в структуре ко

Применение этой технологии к бактериям с изволило из смешанной культуры выделять отдельные виды и штаммы. Успешно были модифицированы дрожжи, плодовые мушки, рыбы данио, шов копрядов, лягушек. Инъекции матричной РНК Cas9 и sgРНК в клетки зародыша позволили быстро получить генно-модифицированных мышей, крыс, свиней, хорьков, карпов и даже слонов. Итак, открылись практически безграничные перспективы создания ГМО для борьбы с болезнями, улучшения пород сельскохозяйственных животных и сортов растений, создания моделей для изучения генетических заболеваний человека и животных, тестирования новых методов

Во многих странах, в частности в США, организмы, модифицированные с помощью CRISPR, не относят к ГМО, поскольку они не содержат чужеродной ДНК, а потому можно относительно легко получить разрешение на выращивание модифицированных CRISPR растений и изготовление из них продуктов питания. Первыми в апреле 2016 г. такое разрешение от Министерства сельского хозяйства США получили шампиньоны садовые (*Agaricus bisporus*), которых с помощью CRISPR лишили способности темнеть за механические повреждения и терять товарный вид. Модифицированные грибы получил американский ученый Инонг Янг (Yinong Yang) из Университета штата Пенсильвания. С тех пор разрешение на выращивание было предоставлено еще для 5 организмов, модифицированных CRISPR, в частности рыжия посевного (*Camelina sativa*) — масляной культуры, содержащей больше омега-3 жирных кислот, а также сорта сои, устойчивого к засухе. Вскоре планируется выход этих товаров на рынок [26]. Технология редактирования генов способна повысить эффективность сельского хозяйства и помочь прокормить растущее население планеты, уменьшив при этом негативное влияние человека на окружающую среду. Исследователи планируют выращивать кур, не вызывающих аллергии у человека, восстановить ли сельность медоносных пчел, страдающих во всем мире от болезней и паразитов. Также предлагают применить

рогатый скот должен рожать только бычков, дающих больше мяса; включение гена зеленого флуоресцентного протеина (GFP) в половые хромосомы кур позволит отбраковывать по свечению в ультрафиолете яйца, из которых выделяются петушки, и использовать их в производстве вакцин. Однако поскольку при редактировании генома CRISPR может изменять нецелевые гены, высказывается предположение, что это может повлиять на здоровье животных, состав мяса и молока. Поэтому пока потребители требуют осторожности в применении новых технологий для животных, используемых в производстве продуктов питания [27].

Возможно даже создание домашних питомцев, экзотических и малоизученных животных повлекла за собой «волну» массового создания новых модельных организмов. Разработка моделей животных требует огромных затрат времени и средств. В 2016 г. Национальный научный фонд США запустил программу стоимостью \$24 млн для создания новых модельных организмов. Программа поддерживает исследование геномов видов, изучение жизненных циклов организмов и разработку протоколов для содержания этих видов в лаборатории. В рамках программы в марте 2019 г. с помощью CRISPR была создана первая генетически модифицированная рептилия — коричневый анолис (*Anolis sagrei*) [28]. Технология CRISPR стала ценным инструментом фундаментальных исследований, позволяющих «выключать» определенные гены и устанавливать их биологическую функцию в организме. Раскрытие генетических и молекулярных механизмов, обуславливающих сложные признаки и поведение, особенно важно для малоизученных видов животных. Так, с помощью CRISPR были идентифицированы гены, контролирующие узор и цвет крыльев бабочки [29], созданы модифицированные рейдерские муравьи (*Ooceraea biroi*), которые не имеют запаха феромонов и не могут поддерживать сложную иерархию колонии. Технология CRISPR помогла изучить мозговую деятельность головоногих моллюсков (гавайского кальмара бобтейла *Euprymna scolopes* и карликовой

среды. Ранее подобные исследования не проводились из-за отсутствия у моллюсков косточек и невозможности закрепления электродов на голове животного [28].

Инактивировать ген без его повреждения можно с помощью CRISPR-интерференции (CRISPRi). При этом мутантный протеин dCas9, у которого не функционируют оба нуклеозных центра, связывается с ДНК-«мишенью» и мешает продвижению РНК-полимеразы, что приводит к остановке транскрипции [30]. Если к протеину dCas9 «привязать» домен фактора транскрипции, увеличивающий или подавляющий активность генов, то можно оказывать непосредственное влияние на функционирование генов и работу всего организма. Регулировать активность экспрессии генов можно также, влияя на эпигеномные процессы (например, метилирование ДНК или ацетилирование гистонов). Для этого можно использовать искусственные протеины, состоящие из dCas9 и каталитического домена соответствующего фермента (ДНК-метилтрансферазы или ацетил трансферазы гистонов) [31].

«Мишенью» системы CRISPR/Cas9 могут быть также длинные некодирующие РНК (lncRNA) или энхансерные РНК (eRNA), регулирующие экспрессию генов и эпигенетические процессы [32]. Это очень важно для исследования функций регуляторных РНК и установления их роли в патогенезе заболеваний, поскольку более 90% заболеваний, связанных с единичной нуклеотидной заменой, содержат замену в некодирующих участках ДНК [33]. С помощью CRISPR/Cas9 можно доставлять в мутантные гены протеины, способные заменить дефектный ген на его здоровую копию из другой хромосомы, что может стать основой новых методов лечения некоторых заболеваний, например диабета. А присоединив к протеину dCas9 флуоресцентный протеин GFP, можно обозначить определенный участок в хромосоме живой клетки и наблюдать за ней под микроскопом в течение клеточного цикла или визуально определять длину теломера [34]. В 2019 г. в Калифорнийском университете в Беркли был создан биосенсор CRISPR-Chip на основе ультрачувствительного графена и системы CRISPR/Cas9, позволяющий в течение 15 минут определять

определенные последовательности ДНК без ее амплификации с чувствительностью 1,7 fM ( $1,7 \cdot 10^{-15}$  Моль) [35]. Ни мецкие ученые из Университета Фрайбурга разработали электрохимический микрофлюидный биосенсор, который обнаруживает до восьми микроРНК в одном образце с помощью CRISPR/Cas13a. Этот биосенсор имеет универсальный чип и легко настраивается на выявление любой микроРНК. Он может быть использован для ранней диагностики заболеваний человека, поскольку кластеры из 5–6 микроРНК, как правило, являются хорошим биомаркером, в частности при болезни Альцгеймера или различных типах рака. Подобные биосенсоры, использующие различные типы фермента Cas, могут направляться на выявление специфических последовательностей в одно- или двухцепной ДНК и РНК возбудителей инфекционных заболеваний. Такая система, например, способна определять количество РНК коронавируса, его тип (SARS или Covid19) и даже дифференцировать единичные несоответствия нуклеиновой кислоты [36]. Итак, как видим, возможности системы CRISPR/Cas9 не ограничиваются только разрезанием определенных последовательностей ДНК. Эта система является универсальным механизмом доставки любых молекул в любую «точку» генома,

что открывает фантастические возможности для медицины и фундаментальной науки. Ученым, внесшим наибольший вклад в открытие технологии CRISPR/Cas9, ежегодно прочат Нобелевскую премию, а в ее ожидании — отмечают другими многочисленными огородами. Наибольшее количество отличий собрала Дж. Дудна (29 за последние 6 лет), среди которых: премия Милдред Кон по биологической химии от Американского общества биохимиков и молекулярных биологов (2013), премия Лурье в области биомедицинских наук от Фонда Национального института здоровья премия «Прорыв» в области наук о жизни, премия доктора Поля Янссе по биомедицинским исследованиям, премия Якоба Хескеля Габбая (2014), награда принцессы Астурийской, премия Грубера в области генетики (2015), премия фонда Мюррелла Гелперта, премия Пауля Эрлиха и Людвиг Дармштадтера.

мии и биофизики от Нидерландской королевской академии искусств и наук, Международная премия канадского фонда Gairdner, премия Тан Тайваньской академии Sinica (2016), премия Японии, медаль Ф. Альберта Коттона за совершенные химические исследования (2017), премия Кавли с нанонауки Крунианская медаль и лекция от Лондонского королевского общества, премия Перла Мастера Грингарда от Университета Рокфеллера, медаль почета от Американского общества рака (2018), премия Ниренберга (2019), премия Вольфа по медицине (2020) и др. Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпентье в 2015 г. вошли в сотню самых влиятельных людей мира по версии журнала Time, в 2016 г. Дж. Дудна стала иностранным членом престижного Лондонского королевского общества, а в 2018 г. вошла в американский список 5 в области по технике по версии журнала Forbes [37].

В январе 2014 с помощью системы CRISPR/Cas9 китайские ученые модифицировали геном макака. От одной матери родились две обезьянки, которым успешно ввели мутации в ген Pparg, ответственный за отложение жира, а также в ген Rag1, связан с работой иммунной системы, а именно с процессом образования разнообразия антител [38]. После успеха с обезьянами все поняли, что настал черед человека.

И действительно, очень заманчиво, исправив всего одну нуклеотидную основу в ДНК, освободить человека от тяжелой наследственной болезни, например гемофилии. Последовательность ДНК длиной в 20 нуклеотидов, являющаяся «мишенью» для системы CRISPR/Cas9, как правило, не повторяется в геноме человека. После разрезания протеином Cas9 ДНК восстанавливается благодаря репарации по образцу правильной копии гена из парной хромосомы. Если парной хромосомы нет (например, при гемофилии ошибка находится в X-хромосоме, которая у мужчин только одна), то можно ввести в клетку вместе с crRNA и о теином Cas9 фрагмент с правильной последовательностью ДНК нужного гена. Кроме того, с помощью CRISPR/Cas9 можно выключать отдельные гены и идентифицировать ответственные за выживание клеток при раке [39]. А обнаружив

в отдельных клетках организма мутации, ведущие к развитию рака, можно с помощью CRISPR/Cas9 устранять их [40]. Для быстрого редактирования любых генов человека создана огромная библиотека, содержащая 73 000 различных РНК и охватывающая 80–90 % всех последовательностей генома [41]. Однако неизвестно, как отреагирует организм человека на вмешательство в геном. Поэтому возможность редактирования генов человека сразу поставила ряд этических проблем, особенно острых в случае редактирования генов эмбриона человека. Имеют ли право ученые или родители будущего ребенка принимать решение об изменении генов эмбриона, об изменении сущности человека, который должен родиться? Ведь у этого человека никто не спрашивает согласия, поскольку он еще не существует. Где гарантия, что принятые сейчас решение впоследствии окажутся такими разумными, какими они представляются сейчас? Готовы ли ученые взять на себя ответственность за непредвиденные последствия таких экспериментов? И что вообще станет с человеком, если он начнет менять свои гены как вздумается? Эти вопросы сейчас являются предметом жарких дискуссий, и пока они не имеют однозначных ответов.

Однако из-за чрезвычайно соблазнительных перспектив редактирования генома человека с помощью CRISPR/Cas9 возникли опасения, что его могут начать раньше, чем убеждаются в безопасности. Поэтому 24 января 2015 г. Дженнифер Дудна собрала в долине Напа в Калифорнии 18 авторитетных генетиков для обсуждения этой проблемы. В конференции принял участие нобелевский лауреат Пол Берг (Paul N. Berg), организовавший в 1975 г. на территории Государственного парка-пляжа Асиломар в городе Пасифик Гроув в Калифорнии знаменитую Асиломарскую конференцию, на которой были приняты правила работы в геномной инженерии и введен мораторий на использование технологий рекомбинантных ДНК. После этого моратории вводили еще дважды: в 1997 г. — на репродуктивное клонирование человека и в 2012 г. — на работы по мутагенезу вируса птичьего гриппа. Итоги конференции в долине Напа опубликованы 3 апреля 2015 г. в журнале Science в виде меморандума, призывающего запретить клинические эксперименты



по генетической модификации человека до тех пор, пока не будут понятны последствия и введены правила [42]. Комментируя выводы конференции в Напе, Джордж Черч метко заметил, что на ней скромно замалчивался главный вопрос: «Какой же сценарий нас волнует на самом деле: что методики редактирования генома будут работать недостаточно хорошо или что они, наоборот, будут работать очень хорошо?» [43].

Редактирование генома человека открыло теоретическую возможность не только лечить генетические заболевания, но и создавать людей с желательными признаками. Сразу воскресли забытые после Второй мировой войны идеи создания «сверх дины» и идеи евгеники — учение об улучшении человеческой породы, предложенное Фрэнсисом Гальтоном (Francis Galton), двум юридическим братьям Чарльза Дарвина. Но и в самом деле, почему бы не создать более совершенных людей: умнее, красивее, сильнее? Хотя при этом непременно появляются и идеи создания людей с определенным назначением, например идеальных солдат: сильных, выносливых, без чувства боли и страха. Страшно подумать, какие могут быть последствия таких фантастических возможностей науки. Поэтому, конечно, люди относятся к успехам генетики с предостережением. К сожалению, а может и к счастью, мы не имеем достаточно знаний по генетике сложных людей ских признаков. Возможно, генетика вообще не играет решающей роли в формировании таких признаков. Однако многие видят в технологии CRISPR/Cas9 первый шаг к созданию новой расы людей — генных мутантов, предрекают появление зомби, смешение видов и всеобщее генный апокалипсис.

В отчете по оценке мировых угроз для США от 9 февраля 2016 г. директор национальной разведки Джеймс Р. Клаппер (James R. Clapper) назвал редактирование генома потенциальным оружием массового уничтожения, поскольку биологические агенты или продукты, созданные в странах с нормативными или нравственными стандартами, «отличными от западных», могут оказаться вредными. В документе утверждается, что распространение, низкая стоимость и ускоренные темпы развития технологии CRISPR/Cas9, преднамеренное использование

умышленное злоупотребление ею может привести к дальновидным последствиям для экономической и национальной безопасности США [44]. В то же время простота технологии CRISPR/Cas9 и доступность в США реактивов для ее реализации позволили биохакерам вмешиваться в геном живых организмов в домашних условиях, не имея особых навыков и оборудования. Так, бывший ученый NASA Джозая Зайнер (Josiah Zayner), имеющий кандидатскую степень по биохимии Чикагского университета, заявил, что он является первым человеком, который пытался модифицировать свой собственный геном с помощью инновационной технологии редактирования генов CRISPR. По словам Зайнера, он начал экспериментировать с CRISPR в своем гараже летом 2016 г., вводя себе ген GFP, вызывающий свечение медуз. Сам он светиться не начал, но биопсия показала, что новый ген присутствует в его клетках. Компания Зайнера The Odin занимается продажей комплектов «Измени свои гены сам» стоимостью в \$20, однако FDA запретило распространение этого продукта, назвав его мошенническим. Теперь биохакер предлагает клиентам покупать инструменты для генного редактирования растений и животных. Таких случаев достаточно много: подростки, студенты, генетики-любители пытались применить технологию CRISPR для того, чтобы увеличить собственные мышцы, избавиться от герпеса или вылечить СПИД, однако эти попытки были безуспешными. Неконтролируемое распространение технологии CRISPR представляет большую опасность из-за возможности создания биологического оружия и угрозы биотерроризма. Исследователи из Университета Альберты в Эдмонтоне (Канада) воссоздали с нуля вымерший вирус черной оспы. Они приобрели у коммерческой компании фрагменты перекрывающиеся ДНК, сшили их вместе и ввели в клетки, зараженные другим типом поксви руса. Работа продолжалась пол года и стоила около \$100 тыс. Этот эксперимент свел на нет десятилетия дебатов относительно того, уничтожить ли два образца черной оспы в мире: в Центре контроля и профилактики болезней в Атланте (США) и в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» в Кольцове под

ученые, желающие экспериментировать с вирусом оспы, могут создать его самостоятельно. Подобные работы должны проводиться под строгим контролем со стороны государства, но это сложно сделать, поскольку значительная часть научных исследований осуществляется за деньги коммерческих организаций, а финансирование легко можно привлечь через вебсайты краудфандинга. Клонированные фрагменты ДНК можно заказать через специальные интернет-сайты (например, Science Exchange), однако вскоре и в этом не потребуются, поскольку на столе у каждого биохакера будет стоять принтер для синтеза ДНК BioXp 3200, который продается примерно за \$65 тыс. и напоминает струйный принтер, в котором вместо цветовой палитры СМΥК используются буквы генетического кода — AGTC. А свои домашние эксперименты биохикеры могут начать с ДНК-платформы от Amino Labs, генетической духовки Easy Bake, которая стоит меньше, чем iPad, или с набора для

редактирования генов CRISPR от The Odin за \$159 [45]. Несмотря на призывы о запрете экспериментов по генетической модификации человека, 14 апреля 2015 г. в журнале *Protein&Cell* появилась статья группы китайских генетиков под руководством Цзюньцзю Хуана (Junjiu Huang) из Университета Сунь Ятсена в Гуанч. использование системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома человеческого эмбриона [46]. Целью работы было исправление мутации в одном из генов гемоглобина, которое приводит к болезни крови – бета-талассемии. Это была первая в истории попытка генетически модифицировать человека. Журналы *Science* и *Nature* отказались от публикации настоящей статьи по этическим соображениям, хотя в эксперименте были использованы человеческие яйцо клетки, искусственно оплодотворенные двумя сперматозоидами для того, чтобы экспериментальные зародыши были заведомо нежизнеспособными и погибли из-за определенного количества разделений.

Эксперимент длился 48 часов, его прервали на стадии ось миклеточных эмбрионов. В результате из 86 оплодотворенных яйцеклеток мутация

процент успешных генных модификаций связан с триплоидностью клеток. Однако была еще одна неприятная новость: во всех клетках эмбрионов появилось значительное количество новых мутаций в других генах вследствие неспецифического взаимодействия crPНК с другими подобными последовательностями ДНК, а также из-за ошибок энзимов репарации.

Такие результаты вызывали небезосновательные опасения, что систему CRISPR/Cas9 вообще никогда нельзя будет использовать для экспериментов на человеке. Можно ли как-то улучшить ее точность? Ведь при создании ГМО или даже стволовых клеток человека из большого количества неудачных вариантов можно выбрать наиболее подходящий, а эмбрион человека является уникальным, и в этом случае необходимо использовать максимально точный и абсолютно безопасный

инструмент. Для повышения точности системы CRISPR/Cas9 предлагали разные идеи. Например, был получен Cas9-никазу — модифицированный протеин Cas9, у которого работает только один нуклеазный центр, и поэтому он делает лишь одноцепочечные разрывы ДНК. Используя две такие никазы с разными sgPНК, можно значительно повысить точность разрезания ДНК в нужном месте [47]. Другая идея заключалась в использовании crPНК с укороченной спейсерной частью. Вероятно, что с ДНК-«мишенью» сначала связывается лишь небольшой участок спейсера, для которого комплементарность строго соблюдается, а лишь потом другая часть спейсера, для которой возможны отклонения до 3–5 пар нуклеотидов. Благодаря такой неточности бактерия может распознавать и обезвреживать мутированные фаги [48]. Одним из направлений работы по совершенствованию CRISPR/Cas9 стало изменение специфичности протеинов Cas9 различных видов бактерий относительно последовательностей PAM [49]. Еще один подход, позволивший повысить специфичность системы CRISPR/Cas9 в 140 раз, заключался в использовании вместо Cas9 гибридного протеина fCas9, состоящего из инактивированного

В 2016 г. прозвучало несколько громких заявлений о достижении цели — снижение количества ошибок системы CRISPR/Cas9 практически до нуля. Одни исследователи получили протеин eSpCas9 заменой трех положительно заряженных аминокислотных остатков на нейтральные в области протеина Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes*, которая взаимодействует благодаря своей положительно заряженной бороздке с отрицательно заряженной ДНК. Ослабление силы взаимодействия протеина Cas9 с ДНК привело к уменьшению количества неспецифических взаимодействий [51]. Другие исследователи получили высокоточный энзим SpCas9-HF1 и протестировали его с восемью разными crPNK. Он совершил лишь одну ошибку, тогда как исходный энзим Cas9 совершил семь ошибок [52]. Ученые из Питтсбургского университета (штат Пенсильвания, США) разработали подходы к условной активации функции протеина Cas9 с помощью малых молекул и света. Эти методы привели к повышению специфичности системы CRISPR/

Cas9 и позволили активировать ее в определенном месте и на определенный промежуток времени [53]. В августе 2017 г. были опубликованы обнадеживающие результаты исследований, проведенных большим коллективом ученых (31 исследователь из 10 научных учреждений США, Китая и Южной Кореи, половина — из Центра эмбриональной клетки и геномной инженерии Университета здоровья и науки Орего, США) под руководством Шухрата Миталипова (Shoukhrat Mitalipov) — уйгура по национальности родом из Казахстана, известного своими успешными экспериментами по клонированию приматов и человека, а также замене митохондриального генома в клетках их эмбрионов [54–57]. Исследователи изобрели способ целенаправленной коррекции мутаций генов в эмбрионах человека с помощью CRISPR/Cas9 и продемонстрировали его эффективность на примере редактирования гетерозиготной мутации MYBPC3, что вызывает гипертрофическую кардиомиопатию — наследственное заболевание сердца, которое неизбежно. Введение компонентов системы CRISPR/Cas9 в ооцит вместе

с образованием мозаичных эмбрионов, часть клеток которых имеет мутации в генах. Кроме того, такой подход позволил увеличить до 72,4% выход эмбрионов, несущих ген MYBPC3 дикого типа без признаков каких-либо мутаций, благодаря своевременной деградации компонентов системы CRISPR/Cas9, а также благодаря росту частоты репарации двухцепных разрывов ДНК за механизмом гомологически направленной репарации (HDR), которая восстанавливает ДНК точно по образцу гомологического гена матери дикого типа, в отличие от механизма негомологического соединения концов (NHEJ), который вносит ошибки в последовательность ДНК в месте разрыва и обычно менее эффективным [58]. В ноябре 2018 г. китайский исследователь Хэ Цзянькуй (He Jiankui) из Южного университета науки и техники в Шэньчжэне неожиданно заявил, что он создал первых в мире генетически отредактированных детей — девочек-близнюков Лулу и Нану, которые не способны заразиться вирусом иммунодефекта человека (ВИЧ) из-за модификации гена CCR5. В 2019 г. родился еще один модифицированный ребенок в рамках этого проекта. Эти заявления спровоцировали скандал и полицейское расследование в Китае и возмущению мировой научной общественности. Ученого обвинили в подделке документов по нравственному надзору, нарушении ряда китайских законов, в том, что он ради личной славы на самые тугие собранные средства организовал проектную группу из иностранцев и привлек 8 пар добровольцев (с ВИЧ-положительным отцом и ВИЧ-отрицательной матерью для проведения сомнительных экспериментов. Обвинения ученых основываются на отсутствии медицинской целесообразности такой модификации, ведь дети были здоровы, а для проверки успешности эксперимента их теперь нужно заразить ВИЧ [59]. На закрытом для общественности суде Хэ Цзянькуя было приговорено к трем годам заключения и оштрафовано на 3 млн юаней (\$430 тыс) за проведение «незаконной медицинской практики», его коллеги Чжан Рэнли (Zhang Renli) и Цинь Цзинь (Qin Jin) получили по 18 месяцев

исследованиях, связанных с репродуктивной медициной [60]. Однако дело Хэ Цзянькуя продолжает жить. В июне 2019 г. российский исследователь Денис Ребриков из Российского национального опытного медицинского университета им. М.И. Пирогова заявил, что также планирует создать младенцев с редактируемым геном, который будет предотвращать заражение детей ВИЧ от инфицированных матерей. Позже он изменил свои намерения, избрав «мишенью» ген GJB2, связанный с наследственной потерей слуха. В августе 2019 г. репродуктивный биолог из Нью-Йорка Джанпiero Палермо (Gianpiero D. Palermo) обнародовал свои планы по использованию технологии CRISPR для редактирования в клетках человеческой спермы гена, который увеличивает риск возникновения рака. Неизвестно, насколько эти планы близки к воплощению, однако такие заявления являются предупреждением о том, что в ближайшее время найдутся и другие люди, пытающиеся ввести в геном человека изменения, способные наследоваться будущими поколениями [61, 62].

Ученые, готовые создавать детей с редактируемыми генами, мечтают улучшить мир, избавить человечество от опасных заболеваний. Однако внесенные мутации, защищая от одной опасности, могут подвергать организм другим. Так, выяснилось, что мутации гена CCR5, кодирующего рецептор для ВИЧ, сокращают жизнь людей в среднем на 1,9 года. Причиной этого является многофункциональность большинства генов, которая в случае мутации гена приводит к изменению целого комплекса признаков, не всегда желаемых и полезных. Предполагается, что мутация гена CCR5 возникла на севере Европы для защиты от бубонной чумы (она почти не встречается в Азии, а в Великобритании ее имеют 10 % населения). Какое бы преимущество ни получал организм с мутированным CCR5 раньше, это не означает, что мутация полезна сегодня. Данные других исследователей свидетельствуют, что люди с мутантной версией CCR5 имеют большую вероятность смерти от гриппа [63]. На собрании ведущих ученых из семи стран мира по проблемам CRISPR, состоявшемся в марте 2019 г. под руководством

го математика и генетика Эрика Лендера (Eric Lander), известного как один из руководителей проекта «Геном человека», было решено призвать к пятилетнему международному мораторию на использование редактирования генов в клетках человеческой зародышевой линии в терапевтических целях. В августе 2019 г. ряд исследовательских групп, работавших в этой области, заявили о поддержке идеи моратория, а группа международных исследовательских обществ начала работу по составлению рекомендаций по соответствующим исследованиям, которую планируется завершить весной 2020 г. Однако новый экспертный консультативный комитет ВОЗ на своем заседании в августе 2019 г. обошел вопрос о моратории, но создал глобальный реестр для отслеживания всех видов исследований по редактированию генов человека и предложил консультации по управлению такими технологиями [62].

Внедрение любых технологических инноваций, в том числе генетической терапии, требует широкого коллективного обсуждения относительно допустимости его использования, предполагаемых последствий и регулирования. Более 40 стран приняли законодательство, запрещающее репродуктивное использование генетических модификаций человека. Это такой же глобальный вопрос, как изменение климата и многие другие проблемы, требующие согласованных действий разных государств и укрепление как международного права, так и возможностей глобального управления [64]. Серьезной проблемой остается отсутствие согласованного законодательства, которое регулировало бы вопросы генной модификации организмов. Во многих странах генетические работы с эмбрионами человека запрещены или не поощряются. В США запрещено давать государственные гранты на такие работы, но ими можно заниматься частным компаниям. Перспективными направлениями применения технологии CRISPR/Cas9 являются редактирование генома бактерий или дрожжей с целью синтеза совершенно новых веществ, а также создание животных моделей заболеваний человека, позволяющих изучать патогенез заболеваний и разрабатывать новые подходы к лечению. Ученые пытаются применить тех-

логию CRISPR/Cas9 для решения наиболее актуальных проблем настоящего, в частности для борьбы с антибиотикорезистентностью микроорганизмов, обезвреживание насекомых-вредителей и переносчиков инфекций (например, малярийных комаров), решение проблемы недостатка в норских органах для трансплантации, защиты от опасных вирусов (в том числе ВИЧ), лечение онкологических заболеваний и др.

Рост количества штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам, угрожает прогрессу медицины, который наблюдался в течение последних десятилетий. Особо остро эта проблема стоит при лечении туберкулеза. Экспериментально подтверждено, что систему CRISPR/Cas9 можно успешно применять для разрушения генов энзимов, обеспечивающих устойчивость бактерий к действию антибиотиков [65]. Например, с помощью CRISPR/Cas9 в клетках вирулентного золотистого стафилококка были разрушены плазмиды, содержащие гены устойчивости к антибиотикам, а в клетках неvirulentных стафилококков создан иммунитет против таких плазмид. На модели колонизации стафилококками кожи мыши продемонстрировано повышение эффективности действия противомикробных препаратов [66]. Даже получены бактериофаги, которые избирательно обезвреживают бактерии, устойчивые к антибиотикам [67]. Одной из важных задач сейчас является создание универсальных бактериофагов, способных инфицировать широкий ряд видов бактерий.

Генно-модифицированные насекомые могут стать новым оружием против переносчиков инфекций и вредителей сельскохозяйственных культур. Так, человечество давно и безуспешно борется с малярией — опасным заболеванием, вызываемым одноклеточным паразитом — малярийным плазмодием и передаваемому человеку от комаров. Ежегодно от малярии умирает 670 тыс. человек, большинство из которых дети в возрасте до пяти лет. В 2015 г. китайская исследовательница Юю Ту (Youyou Tu) была присуждена Нобелевской премии за эффективный противомаларийный препарат артемизинин. Однако болезнь преодолеть так и не удалось из-за недостаточного уровня развития системы здравоохранения в регионе, где распространена малярия. Энтони Джеймс (Anthony James)

из Калифорнийского университета в Ирвайне предлагал способ обезвреживания малярийных комаров с помощью CRISPR/Cas9. В геноме комара встраивают активную систему CRISPR/Cas9, которая может вставлять себя и ген антитела, блокирующего развитие малярийного плазмодия. В первом поколении комаров модифицированная хромосома запускает CRISPR/Cas9 и делает вторую хромосому такой же. В следующем поколении почти все потомки (а не половина) получают модифицированную хромосому, и процесс повторяется. Таким образом, способность производить антитела против плазмодия быстро распространяется среди популяции комаров [68]. Хотя высказываются опасения, что применение методов с использованием системы CRISPR/Cas9 вроде метода мутагенной цепной реакции (MCR), который дает возможность генерировать в автокаталитическом режиме мутации, превращая гетерозиготное состояние в гомозы готовое, может иметь непредсказуемые изменения, например виды и нарушить экологическое равновесие [69]. Биотехнологическая компания

Oxitec (Оксфорд, Великобритания) использует CRISPR/Cas9 для создания генно-модифицированных комаров, которые после спаривания со своими дикими родственниками приводят к гибели части их потомков. В октябре 2019 г. в городе Индьятуба (Бразилия) было успешно проведено испытание модифицированных комаров, созданных для борьбы с малярией. Также проведено испытание модифицированных бриллиантовых молей, которые являются вредителями разных видов капусты. Ученые встроили в геном насекомых-самцов ген tTAV (транскрипционный активатор, контролируемый тетрациклином), созданный слиянием генов тетрациклин-связывающего домена (tetR) бактерии *Escherichia coli* и активатора транскрипции вируса простого герпеса (VP6). При отсутствии тетрациклина продукт гена tTAV усиливает свою экспрессию и приводит к гибели насекомого. После спаривания модифицированных самцов с дикими самками этот ген передается их потомкам, среди которых все самки погибают на стадии личинки, а половина самцов

становятся носителями гена. Таким образом, популяция уничтожается за три поколения. Недостатками этого подхода является большая сложность и стоимость по сравнению с опрыскиванием инсектицидами, а также запрет на использование генетически модифицированных насекомых на органических фермах. Несмотря на это, сейчас продолжается разработка аналогичных методов борьбы с двумя мотыльками-вредителями, устойчивыми к инсектицидам: соевой совкой и кукурузной листовой совой, которые составляют большую проблему в Бразилии и Африке [70].

Люди давно ищут возможность использовать животных как доноров органов для трансплантации. Во-первых, людей, которые могут быть донорами, гораздо меньше, чем нуждающихся в трансплантации. Около 22 человек в день погибают в ожидании трансплантации. Во-вторых, с этической точки зрения не очень хорошо, когда человек вынужден долго ждать в очереди, надеясь на смерть другого человека. По анатомическим особенностям наиболее пригодными для трансплантации человеку могли бы быть органы свиней. Однако ученые отказались от этой идеи из-за наличия в клетках свиней эндогенных ретровирусов PERV, которые могут инфицировать человека. Другой проблемой стало наличие на клетках свиней молекул углеводов, которые являются метками для немедленного уничтожения антителами человека. Об этой проблеме еще в начале 1980-х годов узнали хирурги, пересадив свиное сердце бабуину; они были шокированы, когда бабу он умер за считанные минуты. В конце

2015 г. китайские и американские ученые под руководством Джорджа Черча из Гарвардского университета (Кембридж) продемонстрировали возможность удаления с помощью CRISPR/Cas9 из генома клеток эпителия почек свиньи 62 копий вируса PERV [71], а в августе 2017 г. опубликовали потрясающие результаты исследований по клонированию генно-модифицированных свиней, в которых полностью инактивированы вирусы PERV [72]. Доктор Черч основал компанию eGenesis, надеясь продавать генетически измененные органы свиней. Исследователи из Университета

Алабамы в Бир Мингеме (США) использовали редактирование ге

нов и клонирование для создания свиней без специфических углеводов на поверхности их органов. Бабуины, которым были пересажены сердца и почки от этих свиней, прожили больше года [73]. В 2018 г. эта группа ученых заменила ген свиного тромбомодулина человеческим с целью расширения возможностей ксенотрансплантации аорты [74]. Возможно, сочетание нескольких подходов в скором будущем позволит широко использовать органы свиней для пересадки людям. Система CRISPR/Cas9 может быть

использована также для борьбы с опасными вирусными инфекциями. В экспериментах на мышах показано, что система CRISPR/Cas9 способна ингибировать репликацию вируса гепатита В [75]. Конечно, предпринимались неоднократные попытки применить технологию CRISPR/Cas9 для борьбы с ВИЧ. В результате получены положительные результаты: геном ВИЧ-1 успешно был удален из ДНК латентно инфицированных человеческих CD4+T-клеток, причем, T-клетки человека не только избавились от ВИЧ, но и оказались устойчивыми к новому заражению этим вирусом [76]. Однако некоторые исследователи сообщали, что через две недели после подобных экспериментов в клетках начинали размножаться мутированные вирусы, которые избегали распознавания системой CRISPR/Cas9. Даже высказывалось при предположении, что это происходит не только из-за повышенной склонности ВИЧ к мутагенезу, но и потому, что сама система CRISPR/Cas9 при разрезании вирусной ДНК провоцирует возникновение дополнительных мутаций вследствие последующей по ложной репарации ДНК [77]. Предлагают различные способы устранения этой проблемы: применение CRISPR/Cas9 для одновременного обезвреживания нескольких генов вируса, для изменения генов T-клеток с целью предотвращения проникновения вируса или использования CRISPR/Cas9 в комбинации с противовирусными лекарствами. Результаты исследований по редактированию в клетках эмбриона человека гена CCR5, кодирующего рецептор для проникновения ВИЧ-1 в T-клетки, были успешными лишь частично, и они подтвердили необходимость усовершенствования применяемой технологии [78]. В августе 2017 г. опубликовано

результаты исследований китайских ученых, успешно введших систему редактирования CRISPR/Cas9 в стволовые клетки человека, являющиеся предшественниками клеток крови, с целью редактирования гена CCR5. На модели трансгенных мышей был продемонстрирован длительный (свыше года) эффект устойчивости к ВИЧ-1 *in vivo*, проявлявшийся в значительном уменьшении титра вируса и обогащении популяции CD4+T-клеток человека [79]. А в июле 2019 г. опубликованы результаты исследований американских ученых из Медицинской школы Льюиса Катца при Университете Темпл в Филадельфии (штат Пенсильвания) и Медицинского центра Университета Небраски, которые полностью удалили ВИЧ из T-клеток, были инфицированы ВИЧ, соединив технологию CRISPR/Cas9 и антиретровирусную терапию длительного действия. После испытания новой методики на обезьянах в 2020 г. запланированы первые испытания с участием людей [80]. Система CRISPR/

Cas9 является также ценным инструментом для создания вирусов с определенными свойствами, например ослабленных вирусов для вакцин или онколитических вирусов для лечения рака [81]. Инактивация с помощью CRISPR/Cas9 генов E6 или E7 вируса папилломы вызывает гибель клеток цервикальной карциномы путем апоптоза [82]. Также с помощью этой системы могут быть усовершенствованы иммунотерапевтические подходы к лечению рака. Одна из стратегий предполагает создание генно-модифицированных T-клеток с причудливыми антигенными рецепторами (CAR-T), в состав которых входит scFv-антитело против определенного антигена раковых клеток. Особенно успешным оказался способ лечения B-клеточной лимфомы с помощью T-клеток с причудливыми рецепторами против антигена CD19: соответствующий препарат Kymriah (Tisagenlecleucel) производства Novartis (Швейцария) одобрен FDA в 2017 г. [83]. На основе CRISPR/Cas9 в 2018 г. была разработана система, которая без использования вирусных векторов позволила быстро и эффективно вставлять большие последовательности ДНК (более 1 килобазы) в определенные участки генома T-клеток человека, сохраняя их

жизнеспособность и функции [84]. Благодаря этому сейчас исследуются и проходят клинические испытания более 300 различных вариантов терапии CAR-T, в частности терапия TanCAR с биспецифичными причудливыми антигенными рецепторами, предотвращающими так называемое «бегство» опухолевого антигена вследствие мутаций; системы универсальных антигенных рецепторов (например, SUPRA CAR), в которых можно легко изменить специфичность scFv-антитела, а также терапия panCAR на основе однодоменных наноантител, которые благодаря малому размеру решают проблемы агрегации и иммуногенности scFv [85]. Кроме T-клеток разработаны также генно-модифицированные макрофаги (CARMA), природные киллеры (CAR-NK) и другие типы клеток, в том числе синтетические клетки, имитирующие T-клетки и происходящие из клеток почек, выделенных из мочи, или стволовых клеток, полученных при липосакции [86]. В промышленных масштабах клетки CAR-T также получают из генетически модифицированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs), которые можно бесконечно долго размножить, а перед лечением превращать в зрелые клетки CAR-T с помощью гой искусственного тимуса — органа, в котором называются чай T-клетки развиваются из стволовых клеток крови [87]. Онкологические заболевания, как правило, возникают из-за мутации в различных генах, которые приводят к стимулированию клеточной пролиферации, потере функции опухолевых супрессоров, регулирующих клеточный рост, индукции метаболических энзимов, которые придают устойчивость к химиотерапевтическим агентам и т.п. Технология CRISPR/Cas9 открывает реальные возможности устранения таких мутаций, что очень важно при лечении рака [88]. В октябре 2016 г. игру па китайских ученых под руководством онколога Лу Ю (Lu You) из Университета Сычуань в Чэнду в рамках клинического испытания впервые ввела CRISPR/Cas9 T-клетки, модифицированные по гену PD-1, тормозящего клеточный иммунный ответ, пациенту с агрессивным раком легких. Результаты этих исследований побудили США начать проведение подобных испытаний [89]. В 2019 г. технологию CRISPR

было использовано для определения генов, критичных для выживания рака. В ходе исследования были поочередно повреждены почти 20 000 генов в клетках 300 моделей рака, относящихся к 30 типам рака. В результате исследователи отобрали 600 самых перспективных «мишеней» для разработки новых противораковых препаратов. Главной «мишенью» для нескольких различных типов рака оказался синдром RecQ хеликазы Вернера (WRN), который необходим для выживания раковых клеток с нарушениями путей репарации ДНК, называемых еще раком с микросателлитной нестабильностью. К нему относятся многие типы рака, в том числе 15 % типов рака толстой кишки и 28 % типов рака желудка [90]. Для того, чтобы использовать систему CRISPR/Cas9 в практической медицине для лечения наследственных заболеваний, вызванных единичной мутацией в определенном гене (таких как гемофилия, муковисцидоз, болезнь Гантингтона, серповидноклеточная анемия, лейкемия и т.п.), необходимо совершенствовать технологию, сделав ее для человека, решить проблему доставки компонентов CRISPR/Cas9 к отдельным клеткам в организме. Вероятно, самым простым вариантом для применения CRISPR/Cas9 в медицине является заболевание крови, для которых технологии клеточной терапии уже хорошо отработаны. Генную терапию гемопоэтических стволовых клеток успешно применяют для лечения наследственных иммунодефицитов в течение последних 20 лет. Сначала для введения ДНК в клетки использовали гамма-ретровирусные векторы, иногда вызывавшие лейкемию. Впоследствии разработали более безопасные векторы, проходящие сейчас клинические испытания [91]. В экспериментах на мышах уже получены положительные результаты использования CRISPR/Cas9 для генной терапии гемофилии [92] и миодистрофии Дюшена [93]. А в конце прошлого года группа ученых из Калифорнийского университета в Беркли сообщила об успешном использовании CRISPR/Cas9 для исправления генетической мутации в стволовых клетках пациентов с серповидноклеточной анемией [94]. Поэтому неудивительно, что биотехноло-

гические компании вкладывают все больше и больше денег в разработку технологии CRISPR/Cas9 и реализацию идей относительно ее медицинского застоя.

Ученые, внесшие наибольший вклад в изобретение технологии CRISPR/Cas9, стали соучредителями первых четырех компаний, развивающих применение этой технологии в медицинской практике. Во-первых, это Intellia Therapeutics (США), возглавляемая Дженнифером Дудной; во-вторых, Caribou Biosciences (США), которую возглавляет Рудольф Баррангоу, а соучредителями являются Дженнифер Дудна и Мартин Джинек; в-третьих, CRISPR Therapeutics со штаб-квартирами в Швейцарии, Великобритании и США во главе с Эммануэль Шарпентье; в-четвертых, Editas Medicine (США), основанная Фэн Чжаном и Джорджем Черчем — авторами первых результатов редактирования клеток эукариотов и человека. Сначала Дж. Дудна также была соучредителем Editas Medicine, но вынуждена была разорвать отношения с компанией, поскольку Фэн Чжан неожиданно оформил на себя и свой институт патент на применение технологии CRISPR/Cas9 в клетках эукариот (в том числе людей). Судебная тяжба за приоритет, стоившая десятки миллионов долларов, длилась несколько лет и в феврале 2017 г. завершилась решением патентного ведомства США в пользу Фена Чжана из Института Броуд в Кембридже. Однако Европейское патентное ведомство выдало патент на применение технологии CRISPR/Cas9 в клетках всех типов, в том числе эукариотических, Дж. Дудни и Калифорнийскому университету в Беркли. После многочисленных апелляций решение американского суда долгое время осталось неизменным. И только после последнего скандального апелляционного заявления Дудны, сделанного в июне 2019 г., с обвинениями во лжи и подтасовке фактов в адрес сотрудников Института Броуд [95] было принято решение о предоставлении команде Дудна-Шарпентье в конце 2019 г. генетически модифицированных клеток посредством редактирования генов CRISPR-Cas9 и о дальнейшем расширении патентного портфеля весной 2020 г. [96]. Или



закончится на этом противостояние, неизвестно, ведь фармацевтические компании уже вложили в вышеупомянутые стартап-компании более \$300 млн. Деньги предоставили Билл Гейтс, Google Ventures и еще несколько ведущих венчурных фондов. И это не предел. В случае получения обнадеживающих результатов, инвестиции возрастут, а применение в медицинской практике обещает миллиардные прибыли.

Учитывая такую перспективу добиться глобального запрещения экспериментов по генетической модификации человека, скорее всего, не удастся. С другой стороны, вряд ли стоит их запрещать, поскольку всегда найдутся люди, готовые нарушить любые запреты ради собственных интересов. Даже если подобные эксперименты запрещены в США или Европе, то они все равно будут реализовываться в Китае, поскольку из-за местных культурно-религиозных особенностей там не видят большой проблемы в экспериментах с человеческими эмбрионами, ведь по учению Конфуция человек становится человеком (т.е. получает душу) только после рождения. В

Великобритании генетические манипуляции с эмбрионами официально разрешены. 29 октября 2015 г. в этой стране принят закон, позволяющий при искусственном оплодотворении пересаживать в оплодотворенную яйцеклетку митохондрии от третьего лица — донора [97]. А с 1 февраля 2016 г. разрешили проведение исследований с использованием технологии CRISPR/Cas9 и жизнеспособных эмбрионов человека [98]. В своем отчете от 2018 г. Наффилдский совет по биоэтике (Великобритания) отметил, что использование наследственного редактирования генома «может быть этически приемлемым при некоторых обстоятельствах». Социальные опросы показали, что в США почти три четверти населения поддерживают использование редактирования генома для лечения серьезных наследственных заболеваний у новорожденных детей [99].

Генеральный директор Центра рождаемости New Hope в Нью-Йорке Джон Чжан (John Zhang) одним из первых решил коммерциализировать метод митохондриальной заместительной терапии (МЗТ), которую часто называют «зачатием от трех родителей». Стоимость инновационной процедуры ученый оценил примерно в \$100 тыс. В 2016 г. он помог женщине зачать и выносить

здорового ребенка, используя метод МЗТ. После этого Чжан создал стартап Darwin Life, призванный помогать женщинам старше 40 лет родить ребенка. Чжан просил у FDA разрешение на проведение клинических испытаний, однако в 2017 г. получил отказ в виде открытого письма. Несмотря на это, Чжан на сайте компании Darwin Life продолжает рекламировать процедуру, которая может быть проведена в мексиканских отделениях клиники [100], и призывает других ученых развивать эту отрасль в Великобритании, Украине и Китае, где подобные исследования разрешены [101]. Долгое время FDA не позволяло проведение федеральных средств клинических испытаний системы CRISPR/Cas9, в отличие от другого инструмента геномного редактирования — ZFN. Компания Sangamo BioSciences (Ричмонд, штат Вирджиния, США) использовала ZFN в клинических испытаниях с целью лечения гемофилии типа В, мукополисахаридоза, бета талассемии и вирусного иммунодефицита человека [102]. Администрация президента Дональда Трампа внесла предложения к правилам FDA, которые выдвигали более жесткие требования к контролю за организмами, модифицированными с помощью CRISPR/Cas9, даже за сельскохозяйственными животными и растениями, не говоря уже о людях. Ученые считали эти предложения «сумасшедшими» и опасались, что многие организации откажутся от создания генно-инженерных животных. Однако в начале 2019 г. на остальном было официально одобрено проведение первого клинического испытания. В этом году фармацевтические компании CRISPR Therapeutics и Vertex приступили к испытаниям терапии CTX001, предназначенной для лечения бета-и лассемии и серповидной анемии, которые обусловлены мутацией в одном гене. Эта терапия предполагает модификацию стволовых клеток пациента путем внесения единственного гена, что приведет к повышению уровня гемоглобина в эритроцитах плода. Относительно проведенных испытаний на территории Китая следует отметить, что никаких результатов этих исследований не было опубликовано, а последние отчеты свидетельствуют об выявлении значительных процедурных проблем [103].

В США сейчас проводят более 20 клинических испытаний терапевтических препаратов на основе CRISPR для ряда заболеваний, таких как редкие моногенные гематологические и глазные болезни, а также полигенные онкологические заболевания [104]. Среди наследственных заболеваний, обусловленных точечной мутацией, внимание ученых привлекают прежде всего врожденный амавроз Лебера 10 (поражение сетчатки глаза), синдром Ушера (глухота с постепенной потерей зрения), мышечная дистрофия Дюшена, муковисцидоз (кост тозный фиброз), дефицит транстретина (поражение периферической нервной системы), амилоидоз альфа-1 и первичная гипероксалурия I типа (поражение почек). Следует отметить, что для лечения подобных заболеваний разрабатывают также препараты на основе антисенс-олигонуклеотидов, функционирующих по принципу интерферирующих РНК. На сегодняшний день разрешение FDA получили 7 таких препаратов: в 1998 г. — Витравен (Vitravene, фомивир сен) для терапии цитомегаловирусного ретинита у ВИЧ-инфицированных (в 2006 г. выведен с рынка благодаря эффективной антиретровирусной терапии); в 2004 г. — Макуджен (Macugen, пегаптаниб) для лечения неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации; в 2013 г. — Кинамро (Kympro, мипомерсен) для лечения гомозиготной семейной гиперхолестеринемии; в 2016 г. — Эксондис 51 (Exondys 51, этеплирсен) для лечения мышечной дистрофии Дюшена с подтвержденной мутацией гена дистрофина, которая может быть исправлена на пропуске экзона 51; в 2016 г. — Спинраза (Spinraza, нусинерсен) для лечения спинальной мышечной атрофии; в 2018 г. — Тегседид (Tegsedi, инотерсен) и Онпатро (Onpatro, патисиран) для лечения наследственного транстретического амилоидоза с полинейропатией [105]. Долгое время общество с недоверием относилось к перспективам генной терапии, особенно после того, как в 1999 г. в США в результате лечения впервые умер человек — 18-летний парень Джесси Джелсинджер (Jesse Gelsinger), имевший генетическое заболевание печени, связанное с X-хромосомой, — дефицит орнитиндекарбоксилазы, проявляющийся в виде

дджировать аммиак. Он умер, вероятно, из-за нарушения некоторых правил проведения клинических испытаний и вследствие генерализованной иммунной реакции на пробное введение аденовирусного вектора со здоровым геном [106]. Впервые генную терапию официально разрешили в Китае 16 октября 2003 г. (препарат Gendicine компании SiBiono GeneTech Co из Шэньчжэня, провинция Гуандун), позже, в 2006 г., на рынке появился препарат Oncorine (H101) компании Sunway Biotech Co Ltd, Шанхай. Оба препарата предназначены для лечения головы и шеи. В 2011 г. в России разрешили использование препарата Neovasculogen для лечения атеросклероза и ишемии [107]. Первым генно-терапевтическим препаратом на территории Европы или США, который был рекомендован в июле 2012 г. Европейским агентством по лекарственным средствам и одобрен Еврокомиссией в ноябре 2012 г., был препарат Glybera (алипоген типорволек), разработанный биотехнологической компанией uniQure). Этот препарат предназначен для лечения чрезвычайно редкого (1–2 случая на миллион) наследственного заболевания — дефицита липопротеинлипазы (ЛПЧ), или семейной хиломикронемии. Недостаток энзима ЛПЧ приводит к нарушению обмена жиров в организме: отложению жиров в коже, сетчатке глаз и печени, а также острому воспалению поджелудочной железы (панкреатита). Glybera с помощью вируса AAV1 обеспечивает доставку в мышечные клетки невредаемой копии гена ЛПЛ, которая не встраивается в геном, но компенсирует врожденный дефект. Параллельно с инъекциями препарата проводится иммуносупрессивная терапия для предотвращения иммунной реакции на вирус. Розница на цена этого лекарства стала рекордной и составляла в Германии 53 тыс. за флакон, а курс терапии обходился более чем в 1 млн. Препарат изготавливали по индивидуальному заказу на заводе uniQure в Амстердаме. Продажа этого лекарства начата только в 2014 г., когда были получены результаты шестилетнего наблюдения за пациентами. Данные клинических исследований пока не позволяют утверждать, что препарат способен

от 3 до 12 недель. Производитель надеялся, что в 2018 г. Glybera выйдет на американский рынок [108]. Однако в апреле 2017 г. компания отозвала свою заявку и из-за высокой стоимости выделила препарат с европейского рынка, продав его только один раз в Германии и объявив его коммерческой ошибкой [109].

В конце 2015 г. в США, а затем и в Европе был утвержден препарат на основе онколитического вируса герпеса Imlygic (T-Vec) транснациональной компании Amgen (со штаб квартирой в Калифорнии, США) для лечения неоперабельной меланомы стоимостью \$65 тыс. Однако статистически достоверных доказательств эффективности лечения им до сих пор не получено [110], хотя отмечался рост в 2 раза количественных пациентов с регрессией опухоли при комбинированном применении Imlygic и Yervoy — человеческого моноклонального антитела против CTLA-4, что стало первым лекарственным средством чекпойнтов [111].

27 мая 2016 г. в Европе был одобрен первый генно-терапевтический препарат для лечения детей - Strimvelis, разработанный итальянскими учеными и биотехнологической фирмой GlaxoSmithKline (Великобритания), сейчас передан Orchard Therapeutics Limited (Великобритания). Этот препарат создан для лечения редкого комбинированного иммунодефицита ADA-SCID, вызываемого дефицитом аденозиндеаминазы — энзима, утилизирующего пурины. У больных детей перестают формироваться лейкоциты, поэтому они должны находиться в стерильных условиях и редко живут более двух лет. Ежегодно в Европе рождается около 15 детей с этим заболеванием. В марте 2017 г. первый ребенок из европейской страны (данные о котором не разглашаются) прошел лечение Strimvelis. Стоимость лечения составила 594 тыс. (\$648 тыс.), на сегодняшний день уже более \$700 тыс., тогда как заместительная терапия энзимом в течение 10 лет требует еженедельных инъекций и стоит около \$4,25 млн. Пока лечение возможно только в Милане (Италия), поскольку генно-модифицированные стволовые клетки остаются пригодными к трансплантации в течение 6 ч [112]. Компания Orchard

Therapeutics Limited при исследовании возможности криогенной заморозки и транспортировки клеток пациентов разработала новый препарат OTL-101, который является усовершенствованным вариантом Strimvelis, который в 2019 г. успешно завершил двухлетние испытания на 20 словно летях и в 2020 г. будет заявлен для распространения на рынке США [113]. Однако высокая стоимость подобных препаратов может стать препятствием для их широкого использования: ни государственные бюджеты, ни страховые компании не готовы к таким расходам. Вероятно, благодаря успешному внедрению CRISPR/Cas9 в клиническую практику наследственные заболевания не исчезнут, а

станут признаком бедности. На сегодняшний день уже много известно о системе CRISPR/Cas9, хотя эти знания недостаточны. Некоторые фундаментальные вопросы остаются пока без ответа. Неизвестно, откуда берется большинство спейсеров в CRISPR, ведь лишь несколько процентов из них имеют вирусное происхождение, и для чего они нужны бактерии. Есть сведения, что система CRISPR/Cas может активно участвовать в регуляции эндогенных бактериальных генов, в частности при взаимодействии бактерий с эукариотическим организмом, в котором они паразитируют. Например, протеин Cas9 из *Francisella novicida* использует CRISPR/Cas-ассоциированную малую РНК (scaRNA) для при гнета эндогенного транскрипта mPHK, кодирующего бактериальный липопротеин. Это позволяет ослабить иммунный ответ хозяина и повысить вирулентность бактерии [114]. Непонятно, как возникла система CRISPR/Cas в ходе эволюции (есть предположение, что она происходит от так называемых прыгающих генов — транспозонов — участков ДНК, кодирующих протеины, необходимые для перемещения этих участков в геноме) [115]. Сейчас известно 6 различных типов CRISPR/Cas (CRISPR/Cas9 относится ко II типу). Не исключено, что есть и другие, пока неизвестные, системы CRISPR/Cas. Важно изучение на биохимическом и структурном уровнях различных природных форм главного компонента системы — протеина Cas9, среди которых могут оказаться протеины, более персп

ного механизма распознавания ДНК-«мишени» и ее разрезания благодаря получению кристаллических структур комплексов Cas1-Cas2 или R-петли Cas9 с фрагментами чужеродной ДНК в локе CRISPR [116, 117]. Очевидно, что благодаря пристальному вниманию ученых всего мира к CRISPR/Cas9 все невыясненные фундаментальные вопросы будут подробно исследованы в ближайшем будущем. Недостатками CRISPR/Cas9 является не только значительное количество ошибок редактирования, но и не эффективность редактирования ДНК вне клетки, а также значительный размер энзима Cas9, что затрудняет его доставку в клетку и обуславливает сильные иммуногенные свойства. Поэтому ученые активно ищут и исследуют другие протеины Cas, которые могут оказаться эффективными. В последнее время их внимание все больше привлекают представители семейства Cas12a (Cpf1), особенно протеины LbCpf1 и AsCpf1, встречающиеся соответственно у бактерий семейства Lachnospiraceae и рода Acidaminococcus. Эти зимы, в отличие от Cas9, разрезают ДНК с образованием «липких» концов, а не «тупых», что позволяет легко вырезать и вставлять целые гены [118]. Такая возможность очень ценна для генной терапии заболеваний, связанных с многоразовым повреждением гена, например болезнью Альцгеймера, когда ген легче заменить, чем отредактировать [119]. На основе Cpf1 впервые была создана система для редактирования ДНК в бесклеточном экстракте, которая может стать диагностическим инструментом для выявления генетических мутаций в опухолевых клетках больных раком [120]. Перспективными для генной инженерии могут оказаться и другие недавно открытые компоненты систем защиты бактерий, например небольшие по размеру протеины-аргонавты CasX и CasY [121], способные разрезать чужеродную ДНК (они были обнаружены у глубоководных прокариот Хрустального гейзера (C2A)), еще меньшие (40–70 кДа) протеины Cas14(a, b, c), способные к расщеплению равноцепной ДНК без необходимости взаимодействия с PAM, которые были открыты в архей [123], протеины Cas13a (C2c2) [124], Cas13b [125], Cas13c и Cas13d [126], обезвреживающих РНК вирусов,

или протеин ScCas9 *Streptococcus canis*, имеющий сродство к минимальным 5'-NNG-3' по последовательностям PAM и более широкие возможности редактирования генома [127]. Недавно разработанная система CRISPR/Cas3 типа I, которая может вырезать длинные участки ДНК, дополнила арсенал инструментов для редактирования генома [128]. А в 2018 г. ученые из Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе разработали усовершенствованную технологию CRISPR-библиотек, что позволило одновременно редактировать геном тысячами разных способов, наблюдая при этом, как любые возможные мутации обуславливают положительное или отрицательное влияние на клетки [129]. Сочетание системы CRISPR/Cas с другими технологиями также дает интересные результаты. Со крема, компания Eurofins DiscoverX недавно предложила соединить CRISPR/Cas9 с методом анализа комплементарности фрагментов фермента (EFC) [130], что позволило создать биосенсор для количественной оценки изменения уровня определенного эндогенного протеина под влиянием терапевтических средств [131]. Этот биосенсор может быть использован для проведения массового скрининга новых средств для лечения того или иного заболевания, особенно актуальным для нового класса терапевтических препаратов, известных как целевые деградаторы протеина, например PROTAC — бифункциональных молекул, которые нацелены на специфические для заболевания протеины и способны разрушать их с помощью клеточной системы убиквитин-протеасомы. В последнее время значительный интерес вызывают PROTAC для обезвреживания бро модомена Brd4, распознающего ацетилированные остатки лизина на хроматине и регулирующего экспрессию многих онкогенов [132]. Появляются новые способы совершенствования технологии CRISPR/Cas9: компания GenScript (США) предлагает использовать в качестве шаблона одноцепочечную ДНК (ssDNA или ssODN), что повышает эффективность редактирования и снижает вероятность интеграции вне целевого участка [133]. Недавно группа под руководством Фена Чжана открыла новую технику редактирования генов, которая позволяет встав

ДНК без ее разрезания с помощью CRISPR ассоциированной транспозазы из цианобактерий *Scytonema hofmannii* (ShCAST), состоящей из Tn7-подобных субъединиц транспозазы и энзима Cas12k [134]. В 2019 г. большой интерес (более 400 научных публикаций) вызвал метод, разработанный еще в 2012 г. немецкими учеными Торстенем Стаффорстом (Thorsten Stafforst) и Мариусом Шнайдером (Marius F.). Schneider) из Тюбингенского университета [135], который тогда остался без внимания, поскольку был омрачен сенсационным открытием CRISPR/Cas9. Этот метод позволяет изменять протеины путем редактирования РНК, а не ДНК, что решает проблему рисков, связанных с внесением постоянных изменений в ДНК человека и вероятностью отягощения его ошибками редактирования. Изменения в мРНК вносят с помощью аденозиновых деаминаз ADAR (adenosine deaminases acting on RNA), находящихся в комплексе с РНК гидами (adRNAs — ADAR guide RNAs) и способны в образованной двухцепочечной РНК изменять аденозин на инозин, который при синтезе протеина считается. Важным преимуществом использования человеческих энзимов ADAR по сравнению с протеином Cas9, имеющим бактериальное происхождение, является отсутствие нежелательных реакций со стороны иммунной системы. Сейчас уже известны и другие средства редактирования РНК: цитидиновые деаминазы APOBEC изменяют цитозин на уридин; определенные энзимы винограда изменяют цитидин на уридин, а некоторые энзимы опухолей могут изменять гуанозин на аденозин и т.д. Несмотря на ограниченность способов изменения последовательности РНК и проблемы с доставкой РНК к клеткам, несколько стартап-компаний уже начали использовать системы редактирования РНК для разработки средств лечения рака, мышечной дистрофии и других заболеваний (не только генетических), а также для коррекции.

различных патологических состояний, таких как острая боль или высокий уровень холестерина [136]. Сейчас мы переживаем бум увлечения технологий CRISPR/Cas9. За последние 7 лет опубликовано около 17 тыс. научных статей на эту тему, в среднем по 100 статей в день.

постоянно растет. Неудивительно, что авторитетный научный журнал Science выпустил обзор достижений в этой области под названием «The CRISPR Craze» (Криспер-безумие) [137]. Ожидается, что к 2025 г. в мире на развитие технологии CRISPR/Cas9 и редактирование геномов с ее помощью будет израсходовано более \$5,3 млрд [138]. Сегодня сложно давать какие-либо прогнозы относительно того, какими будут результаты практического использования системы CRISPR/Cas9 через несколько десятилетий. Однако уже сейчас ясно, что CRISPR/Cas9 — это не очередная модная «игрушка», которой ученые поиграют и вскоре о ней забудут. Нет сомнений, что эта технология является революционной, и ее ждет большое будущее. Технология CRISPR/Cas9 существенно упростила и удешевила технику редактирования геномной ДНК, что в перспективе может значительно ускорить темпы развития генной терапии и экспериментальной биологии. С открытием CRISPR/Cas9 вместе с тем появилось множество возможностей для решения наболевших проблем человечества, с которыми наука до сих пор не могла справиться. Эта технология дала шанс избавиться от генетических заболеваний, создать «умные» антибиотики, ценные ГМО для сельского хозяйства, промышленности и медицины, нейтрализовать переносчиков инфекционных болезней и т.п. Однако чтобы реализовать все эти возможности в полной мере, необходимо сделать технологию безопасной: исключить все побочные эффекты, а также усовершенствовать системы доставки компонентов CRISPR/Cas9 к клеткам. Когда это будет сделано, редактирование геномов животных станет привычным делом, а идея применения CRISPR/Cas9 к эмбрионам человека для избавления от тяжелых заболеваний, вероятно, уже не будет казаться такой сомнительной. Если задуматься над тем, что изменения, внесенные в ДНК эмбрионов, могут быть переданы будущим поколениям, то приходит осознание факта, что технология CRISPR/Cas9 может изменить направление эволюции человека, предоставить нам беспрецедентную возможность переписать собственный код жизни. Многие сейчас говорят:

## REFERENCES

## [СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ]

1. Meselson M., Yuan R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Натура*. 1968. 217(5134): 1110–1114. DOI: <https://doi.org/10.1038/2171110a0>
2. Weiss B., Richardson CC Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks в DNA в качестве энзимной системы от *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proc. Natl. ACAD. Sci. США*. 1967. 57(4): 1021–1028. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.57.4.1021>
3. Дельчѐва Е., Чилинский К., Шарма КМ, Гонзалес К., Чао И., Пирзада З. А., Экерт М., Вогель J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation по trans-encoded малой RNA и host factor RNase III. *Натура*. 2011. 471(7340): 602– 607. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09886>
4. Вестра EP, Семенова Е., Датенко КА, Джексон PH, Виенденхефт Б., Северинов К., Brouns SJ Type IE CRIS PR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet*. 2013. 9(9): e1003742. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003742>
5. Ишино Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of *iap* gene, в дпов дальний для alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, и идентификации gene product. *J. Bacteriol*. 1987. 169(12): 5429–5433. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987>
6. Наката А., Amemura M., Makino K. Нестандартный nucleotide arrangement with repeated sequences в *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol*. 1989. 171(6): 3553–3556. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.171.6.3553-3556.1989>
7. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D., van Embden JD *Натура* DNA polymorphism в прямом повторении cluster *Mycobacterium* application for strain differentiation по novel typing method. *Mol. Microbiol*. 1993. 10(5): 1057–1065. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
8. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. Биологическая значимость семейства регулярно spaced repeats в genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol*. 2000. 36(1): 244–246. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
9. Jansen R., Эмбден JD, Гаастра В., Школы Л.М. *Mol. Microbiol*. 2002. 43(6): 1565–1575. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
10. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C., Garcia-Martínez J., Сория Е. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 2005. 60(2): 174–182. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
11. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR элементы в *Yersinia pestis* обретают новые положения, являющиеся preferential update of bacteriophage DNA, и provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005. 151(3): 653–663. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
12. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich SD Clustered регулярно interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) имеют spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005. 151(8): 2551–2561. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
13. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Ричардс М., Boyaval P., Moineau S., Romero DA, Horvath P. CRISPR производит полученную резистентность против viruses в prokaryotes. *Science*. 2007. 315(5819): 1709–1712. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
14. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M., Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koo nin EV, van der Oost J. Немного CRISPR RNAs дает защиту противопоказания в прокариотах. *Science*. 2008. 321(5891): 960–964. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
15. Marraffini LA, Sontheimer EJ CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci targeting DNA. *Science*. 2008. 322(5909): 1843–1845. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
16. Sontheimer E., Marraffini L. Target DNA interference with crRNA. US Provisional Patent Application 61/009, 317, filed September 23, 2008; later published as US2010/0076057 (abandoned).
17. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna JA, Charpentier E. Программируемый дуально-RNA-соединенный DNA endonuclease в adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012. 337(6096): 816–821. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
18. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage для adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. ACAD. Sci. США*. 2012. 109: E2579–E2586. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
19. Mali P., Yang L., Esvelt KM, Aach J., Guell M., DiCarlo JE, Norville JE, Church GM RNA-управляемый человеческим человеком инжинирингования с Cas9. *Science*. 2013. 339(6121): 823–826. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1232033>

20. Cong L., Ran FA, Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu PD, Wu X., Jiang W., Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013. 339(6121): 819–823. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
21. Cho SW, Kim S., Kim JM, Kim JS Targeted genome engineering в человеческих клетках с Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2013. 31(3): 230-232. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>
22. Meganuclease. Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Meganuclease>
23. O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, Восточный Селетский А., Kaplan M., Doudna JA Programmable RNA Recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Натура*. 2014. 516(7530): 263–266. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13769>
24. Nelles DA, Fang MY, O'Connell MR, Xu JL, Markmiller SJ, Doudna JA, Yeo GW Programmable RNA ездить в пустые клетки с CRISPR/Cas9. *Cell*. 2016. 165(2): 488–496. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.054>
- Vandenberghe LH Addgene: молекулярная терапия переписки с Мелиной Фан и Карен Гуерин. [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(18\)30582-3](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(18)30582-3) org/ DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.001>
26. Brown KV Why than you think. <https://gizmodo.com/why-crispr-edited-food-may-be-in-supermarkets-sooner-th-1822025033>
27. Lee J., Wang F. Gene-edited baby by Chinese scientist: opener of pandora's box. *Science Insights*. 2018. 2018:e000178. DOI: <https://doi.org/10.15354/si.18.co015>
28. Reardon S. CRISPR gene-editing creates wave of exotic model organisms. *Натура*. 2019. 568(7753): 441–442. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01300-9>
29. Wade N. Genes color a butterfly's wings. Новые деятели пытаются сделать это. <https://www.nytimes.com/2017/09/18/science/butterfly-wing-color-patterns-gene-editing.html>
30. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA Repurposing CRISPR как RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013. 152(5): 1173–1183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
31. Kungulovski G., Jeltsch A. Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet*. 2016. 32(2): 101–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.12.001>
32. Pefanis E., Wang JG, Rothschild G., Lim J., Kazadi D., Sun JB, Federation A., Chao J., Elliott O., Liu ZP, Economidis AN, Bradner JE, Rabadan R., Basu U. RNA exosome-регулируемый долгосрочный лозунг RNA передача контроля super-enhancer activity. *Cell*. 2015. 161(4): 774–789. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.034>
33. Elling R., Chan J., Fitzgerald KA. *Eur. J. Immunol.* 2016. 46(3): 504–512. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201444558>
34. Chen B., Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J., Zhang W., Li GW, Park J., Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B. оптимизированный CRISPR/Cas system. *Cell*. 2013. 155(7): 1479–1491. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
35. Hajian R., Balderston S., Tran T., deBoer T., Etienne J., Sandhu M., Wauford NA, Chung JY, Nokes J., Athaiya M., Paredes J., Peytavi R., Goldsmith B., Murthy N., Conboy IM, Aran K. Открытие отложенных данных генов с помощью CRISPR-Cas9, иммобилизованного на графеном поле-эффекте предшественника. *Nat. Biomed. Eng.* 2019. 3(6): 427–437. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0371-x>
36. CRISPR's future for point-of-care diagnostics. <https://www.diagnosticsworldnews.com/news/2020/02/18/crispr-future-for-point-of-care-diagnostics>
37. List of awards and honors был удостоен Jennifer Doudna. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_awards\\_and\\_honors\\_received\\_by\\_Jennifer\\_Doudna](https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_awards_and_honors_received_by_Jennifer_Doudna)
38. Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang AP, Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li H., Huang X., Ji W., Sha J. Generation gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014. 156(4): 836–843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>
39. Shalem O., Sanjana NE, Hartenian E., Shi X., Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D., Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014. 343(6166): 84–87. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1247005>
40. Raphael BJ, Dobson JR, Oesper L., Vandin F. Identifying driver mutations in sequenced cancer genomes: computational approaches to enable precision medicine. *Genome Med.* 2014. 6(1): 5. DOI: <https://doi.org/10.1186/gm524>
41. Wang T., Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES Genetic screens in human cells using CRISPR/Cas9 system. *Science*. 2014. 343(6166): 80–84. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1246981>

42. Baltimore D., Berg P., Botchan M., Carroll D., Charo RA, Church G., Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M., Greely HT, Jinek M., Martin GS, Penhoet E., Puck J., Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR Biotechnol ogy. Находящийся путь forward для genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015. 348(6230): 36–38. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aab1028>
43. Vogel G. Bioethics. Embryo engineering alarm. *Science*. 2015. 347(6228): 1301. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.347.6228.1301>
44. Clapper JR Worldwide threat assessment of the US intelligence community. [https://www.dni.gov/files/documents/SASC\\_Unclassified\\_2016\\_ATA\\_SFR\\_FINAL.pdf](https://www.dni.gov/files/documents/SASC_Unclassified_2016_ATA_SFR_FINAL.pdf)
45. Baumgaertner E. As DIY gene editing gains popularity, 'Someone is going to get hurt'. <https://www.nytimes.com/2018/05/14/science/biohackers-gene-editing-virus.html>
46. Лиан П., Xu Y., Цзян X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv. Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015. 6(5): 363–372. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
47. Ran FA, Hsu PD, Лин CY, Гуттенберг JS, Конерманн S., Trevino AE, Скотт DA, Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Двухякий ликвидация RNA-GUID CRISPR Cas9 для улучшенного genome editing specificity. *Cell*. 2013. 154(6): 1380–1389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
48. Fu Y., Sander JD, Reyon D., Cascio VM, Joung JK Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol*. 2014. 32(3): 279–284. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2808>
49. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z., Gonzales AP, Li Z., Peterson RT, Yeh JR, Aryee MJ, Young JK Engineered CRISPR/Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Натура*. 2015. 523(7561): 481–485. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14592>
50. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR Fusion catalytically inactive Cas9 к FokI nuclease improves specificity genome modification. *Nat. Biotechnol*. 2014. 32(6): 577–582. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2909>
51. Slaymaker IM, Gao L., Zetsche B., Скотт DA, Yan WX, Zhang F. Рационально созданы Cas9 Nucleases with improved specificity. *Science*. 2016. 351(6268): 84–88. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
52. Kleinstiver BP, Pattanayak V., Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zhen Z., Joung JK High-fidelity CRISPR/Cas9 Nucleases with no detectable -wide off-target effects. *Натура*. 2016. 529(7587): 490–495. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature16526>
53. Zhou W., Deiters A. Кондициональный контроль CRISPR/Cas9 Function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2016. 55(18): 5394–5399. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201511441>
54. Бирна JA, Педерсен DA, Clepper LL, Нелсон M., Сангер WG, Гокхалле S., Wolf DP, Mitalipov SM, производящий плодовые эмбрионические сметные аппараты по соматической цепи nuclear transfer. *Натура*. 2007. 450(7169): 497–502. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06357>
55. Tachibana M., Sparman M., Sritanandomchai H., Ma H., Clepper L., Woodward J., Li Y., Ramsey C., Kolotushkina O., Mitalipov S. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Натура*. 2009. 461(7262): 367–372. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08368>
56. Tachibana M., Amato P., Sparman M., Gutierrez NM, Tippner-Hedges R., Ma H., Kang E., Fulati A., Lee HS, Sritanandomchai H., Masterson K., Larson J., Eaton D., Садлер-Фредд К., Battaglia D., Lee D., Wu D., Jensen J., Patton P., Gokhale S., Stouffer RL, Wolf D., Mitalipov S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013. 153(6): 1228–1238. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.042>
57. Kang E., Wu J., Gutierrez NM, Koski A., Tippner-Hedges R., Agaronyan K., Platero-Luengo A., Martinez-Redondo P., Ma H., Lee Y., Hayama T., Van Dyken C., Wang X., Luo S., Ahmed R., Li Y., Ji D., Kayali R., Cinnioglu C., Olson S., Jensen J., Battaglia D., Lee D., Wu D., Huang T., Wolf DP, Темиаков D., Белмонте JC, Amato P., Mitalipov S. Mitochondrial replacement в human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Натура*. 2016. 540(7632): 270–275. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20592>
58. Ma H., Marti-Gutierrez N., Park SW, Wu J., Lee Y., Suzuki K., Koski A., Ji D., Hayama T., Ahmed R., Darby H., Van Dyken C., Ли И., К. Э., Парк AR, Ким Д., Ким С.Т., Gong J., Гу., Belmonte JC, Amato P., Kim JS, Kaul S., Mitalipov S. Проверка pathogen и gene mutation in human embryos. *Натура*. 2017. 548(7668): 413–419. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature23305>
59. Second woman carrying gene-edited baby, Chinese authorities confirm. <https://www.theguardian.com/science/2019/jan/22/second-woman-carrying-gene-edited-baby-chinese-authorities-confirm>
60. CRISPR практикующий получает три года тревоги для создания gene-edited babies. <https://gizmodo.com/crispr-scientist-gets-three-years-of-jail-time-for-crea-1840724277>
61. Act now on CRISPR babies. *Натура*. 2019. 570(137). DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01786-3>



62. Collins FS NIH Director on Human Gene Editing: 'Вы должны не знать, что наша технология к эклипу нашего человека'. <https://www.discovermagazine.com/health/nih-director-on-human-gene-editing-we-must-never-allow-our-technology-to>
63. Gene mutation meant to protect from HIV 'raises risk of early death'. <https://www.theguardian.com/science/2019/jun/03/gene-mutation-protect-hiv-raises-risk-early-death>
64. Andorno R., Yamin AE Право на создание babies? Human rights and bioethics. <https://www.openglobalrights.org/the-right-to-design-babies-human-rights-and-bioethics/>
65. Citorik RJ, Mimee M., Lu TK Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases . Nat. Biotechnol. 2014. 32(11): 1141-1145. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3011>
66. Bikard D., Euler CW, Jiang W., Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X., Fischetti VA, Marraffini LA Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. Nat. Biotechnol. 2014. 32(11): 1146-1150. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3043>
67. Yosef I., Manor M., Kiro R., Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill in tibiotic-resistant bacteria. Proc. Natl. ACAD. Sci. США. 2015. 112(23): 7267-7272. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>
68. Гантс В.М., Ясинскиен Н., Татаренкова О., Фазекас А., Макиас В.М., Б.Э., Джеймс А.А. Proc. Natl. ACAD. Sci. США. 2015. 112(49): E6736-E6743. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1521077112>
69. Gantz VM, Bier E. Мутагоничный язык реагирования: метод для проведения heterozygous к homozygous mutations. Science. 2015. 348(6233): 442-444. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaa5945>
70. Stokstad E. Genetically engineered moths can knock down crop pests, но они будут идти? <https://www.sciencemag.org/news/2020/01/genetically-engineered-moths-can-knock-down-crop-pests-will-they-take> DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb1078>
71. Yang L., Güell M., Niu D., George H., Lesha E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J., Cortazio R., Wilkin son RA, Фишман JA, Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). Science. 2015. 350(6264): 1101-1104. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad1191>
72. Ниу D., Wei HJ, Лин Л., Джорджа Х., Wang T., Lee IH, Zhao HY, Wang Y., Kan Y., Shrock E., Lesha E., Wang G., Luo Y., Qing Y., Jiao D., Zhao H., Zhou X., Wang S., Wei H., G ell M., Church GM, Yang L. Inactivation por cine endogenous retrovirus в ремнях с помощью CRISPR-Cas9. Science. 2017. 357(6357): 1303-1307. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aan4187>
73. Gene editing spurs hope for transplanting pig organs into humanos. <https://www.nytimes.com/2017/08/10/health/gene-editing-pigs-organ-transplants.html>
74. Nunes Dos Santos RM, Carneiro D'Albuquerque LA, Reyes LM, Estrada JL, Wang ZY, Tector M., Tector AJ CRISPR/Cas and recombinase-based human-to-pig ortotopic gene exchange for xenotransplantation. J. Surg. Res. 2018. 229: 28-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.03.051>
75. Dong C., Qu L., Wang H., Wei L., Dong Y., Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA в CRISPR/Cas9 Nu clease efficiently inhibits viral replication. Antiviral Res. 2015. 118: 110-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.015>
76. Камински Р., Кен И., Фишер Т., Тедадьди Е., Наполи А., Жан Y., Карн J., Hu W., Khalili K. Устранение HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing. Sci. Rep. 2016. 6: 22555. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep22555>
77. Wang Z., Pan Q., Gendron P., Zhu W., Guo F., Cens. Cell Rep. 2016. 15(3): 481-489. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.078>
78. Kang X., He W., Huang Y., Yu Q., Chen Y., Gao X., Sun X., Fan Y. 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. J. Assist. Reprod. Genet. 2016. 33(298): 1-8.
79. Xu L., Yang H., Gao Y., Chen Z., Xie L., Liu Y., Liu Y., Wang X., Li H., Lai W., He Y., Yao A., Ma L., Shao Y., Zhang B., Wang C., Chen H., Deng H. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. Mol Ther. 2017. 25(8): 1782-1789. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.027>
80. Дашь ПК, Каминский Р., Белла Р., Су., Лин З., Хильер JR, Бануб М., Эланг М., Гаутам Н., Мосли RL, Пол Уектова LY, McMillan J., Баде AN, Gorantla S., Sariyer IK, Burdo TH, Young WB, Amini S., Gordon J., Jacob-

son JM, Edagwa B., Khalili K., Gendelman HE Sequential LASER ART и CRISPR изменения eliminate HIV-1 в subset of infected humanized mice. *Nat. Commun.* 2019. 10(1): 2753. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10366-y>

81. Yuan M., Webb E., Lemoine NR, Wang Y. CRISPR-Cas9 является мощным инструментом для эффективного создания oncolytic viruses. *Вирусы.* 2016. 8(3): E72. DOI: <https://doi.org/10.3390/v8030072>

82. Кеннеди EM, Корнепати AV, Goldstein M., Богерд HP, Полинг BC, Whisnant AW, Кастан MB, Cullen BR

Ухудшение человеческого papillomavirus E6 или E7 gene в cervical carcinoma bunches, используя бактерицидный CRISPR/Cas RNA, контролируемый эндокрукацией. *J. Virol.* 2014. 88(20): 11965-11972. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01879-14> 83. Miller JF, Sadelain

M. Живопись от убеждений в интеллектуальной иммунологии к фактору иммунотерапии. *Cancer*

*Cell.* 2015. 27(4): 439-449. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.007>

84. Pot TL, Puig-Saus C., Yu R., Shifrut E., Carnevale J., Li PJ, Hiatt J., Saco J., Krystofinski P., Li H., Tobin V., Nguyen DN, Lee MR, Putnam AL, Ferris AL, Chen JW, Schickel JN, Pellerin L., Carmody D., Alkorta-Aran buru G., Del Gaudio D., Matsumoto H., Morell M., Mao Y., Cho M., Quadros RM, Gurumurthy CB, Smith B., Haugwitz M., Hughes SH, Weissman JS, Schumann K., Esensten JH, May AP, Ashworth A., Купеп GM, Grey ley SAW, Vacchetta R., Meffre E., Roncarolo MG, Ромберг Н., Херольд К.С., Рибас А., Леонетти MD, Марсон А.Г.

Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Натура.* 2018. 559(7714): 405-409. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0326-5>

85. Zaroff S. CAR T-Cell therapies with bispecific twist. *Genet. Eng. Biotech. N.* 2018. 38(13). <https://www.genengnews.com/magazine/car-t-cell-therapies-with-a-bispecific-twist/> DOI: <https://doi.org/10.1089/gen.38.13.09> 86. Kojima R., Scheller L., Fussenegger M. Nonimmune

cells equipped with T-cell-receptor-like signaling for cancer cell ablation. *Nature Chemical Biology.* 2018. 14: 42-49. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2498> 87. Монтель-Хаген А., Комитет CS, Лис. Lopez S., Chen HC, He C., Chin CJ, Casero D., Crooks GM Organoid-induced differentiation of conventional T cells from human pluripotent stem cells.

*Cell Stem Cell.* 2019. 24(3): 376-389.e8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.011>

88. White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget.*

2016. 7(11): 12305-12317. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7104> 89. Cyranoski

D. CRISPR gene-editing tested в человеке для первого времени. *Nature News.* 2016. 539(7630): 479.

DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2016.20988> 90. New

cancer drug targets accelerate path to precision medicine. <https://www.drugtargetreview.com/news/42672/new-cancer-drug-targets-accelerate-path-to-precision-medicine/>

91. Booth C., Gaspar HB, Thrasher AJ Treating immunodeficiency через HSC gene therapy. *Trends Mol. Med.* 2016.

22(4): 317-327. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.02.002>

92. Guan Y., Ma Y., Li Q., Sun Z., Ma L., Wu L., Wang L., Zeng L., Shao Y., Chen Y., Ma N., Lu W., Hu K., Han H., Yu Y., Huang Y., Liu M., Li D.

CRISPR/Cas9-медиатизированный соматический коррекция новейшего coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol. Med.* 2016. 8(5): 477-488. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.201506039>

93. Нелсон CE, Хаким CH, Ousterout DG, Thakore PI, Мореб EA, Castellanos Rivera RM, Madhavan S., Pan X., Ran FA, Yan WX, Asokan A.,

Zang F., Duan D., Gersbach CA In vivo genome editing improves muscle function in mouse model of Duchenne muscular dystrophy.

*Science.* 2016. 351(6271): 403-407. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5143>

94. DeWitt MA, Magis W., Bray NL, Wang T., Berman JR, Urbinati F., Heo SJ, Mitros T., Mu oz DP, Boffelli D., Kohn DB, Walters MC, Carroll D., Martin DI, Corn JE Selection-free genome editing sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci. Transl. Med.*

2016. 8(360): 360ra134. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9336> 95. CRISPR patent fight turns ugly as UC accuses Broad

researchers из lying about claims. <https://www.genomeweb.com/business-news/crispr-patent-fight-turns-ugly-uc-accuses-broad-researchers-lying-about-claims> 96. Sanders R. UC rings out 2019 with its 20th CRISPR patent. <https://news.berkeley.edu/2019/12/31/uc-rings-out-2019-with-its-20th-crispr-patent/> 97. Craven L., Herbert M., Murdoch A., Murphy J., Lawford Davies J., Turnbull DM Research in policy:

brief his tory of mitochondrial donation. *Stem Cells.* 2016. 34(2): 265-267. DOI: <https://doi.org/10.1002/stem.2221> 98. Callaway E. UK

scientists gain license к edit genes in human embryos. *Nature News.* 2016. 530(7588): 18.

DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2016.19270> 99. Mills

P. Genome editing and human reproduction: The Nuffield Council on Bioethics' report. [https://www.bionews.org.uk/page\\_137343](https://www.bionews.org.uk/page_137343)

DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2016.19270>

100. Becker R. The 'three-parent baby' fertility doctor требуется к stop marketing the procedure, FDA says. <https://www.theverge.com/2017/8/5/16100680/three-parent-baby-fertility-doctor-fda-letter-violations>
101. Эта практика врача является подъемом множества человеческой репродукции, с малой регуляцией. [https://www.washingtonpost.com/national/health-science/this-fertility-doctor-is-pushing-the-boundaries-of-human-reproduction-with-little-regulation/2018/05/11/ea9105dc-1831-11e8-8b08-027a6ccb38eb\\_story.html](https://www.washingtonpost.com/national/health-science/this-fertility-doctor-is-pushing-the-boundaries-of-human-reproduction-with-little-regulation/2018/05/11/ea9105dc-1831-11e8-8b08-027a6ccb38eb_story.html)
102. Sangamo ZFN Technology Platform. 2018. [https://www.sangamo.com/application/files/6915/3002/3307/IR\\_Technology\\_v06.12.18\\_1.pdf](https://www.sangamo.com/application/files/6915/3002/3307/IR_Technology_v06.12.18_1.pdf)
103. Haridy R. First CRISPR терапия administered in landmark human trial. <https://newatlas.com/crispr-trial-under-way-vertex-gene-therapy/58643/>
104. The Future of CRISPR. <http://www.fwreports.com/dossier/the-future-of-crispr/#.XmgL-kFR2Uk>
105. «Tegsedī»: an oligonucleotide drug against familial amyloid polyneuropathy. (в Russian). <https://mosmedprepara.ru/news/16897>  
[«Тегседы»: олигонуклеотидное лекарство против семейной амилоидной полинейропатии.]
106. Stolberg SG. The biotech Death of Jesse Gelsinger. <http://www.nytimes.com/1999/11/28/magazine/the-biotech-death-of-jesse-gelsinger.html>
107. Bersenev A. История gene therapy drug approval на рынке. <http://stemcellassays.com/2011/12/history-gene-therapy-drugs-approval-market/>
108. Morrison C. 1-миллионный метку набора для Glybera gene therapy. *Nature Biotechnology*. 2015. 33: 217-218. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0315-217>
109. Kozubek J. Who will pay for CRISPR? <https://www.statnews.com/2017/06/26/crispr-insurance-companies-pay/>
110. Talimogene laherparepvec. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Talimogene\\_laherparepvec](https://en.wikipedia.org/wiki/Talimogene_laherparepvec)
111. Kegel M. Imlygic-Yervoy combo twice как эффективный как Yervoy в борьбе с melanoma, study finds. <https://immunoncologynews.com/2017/10/12/melanoma-investigational-therapy-combo-imlygic-yervoy-twice-as-effective-yer-voy-alone-study-finds/>
112. Mullin E. Gene therapy, что curas rare genetic disease just got its first customer, year after it was approved. <http://www.businessinsider.com/gsk-strimvelis-gene-therapy-used-for-the-first-time-after-approval-2017-5>
113. Al Idrus A. Orchard Therapeutics' 2019: Pipeline progress, breaking ground on ero \$90M manufacturing site. <https://www.fiercebitech.com/biotech/orchard-therapeutics-2019-pipeline-progress-breaking-ground-its-90m-manufacturing-site>
114. Sampson TR, Сарой SD, Левеллин AC, Тээн YL, Weiss DS A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Натура*. 2013. 497(7448): 254–257. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12048>
115. Koonin EV, Krupovic M. Развитие adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nat. Rev. Genet.* 2015. 16(3): 184–192. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3859>
116. Wright AV, Liu JJ, Knott GJ, Doxzen KW, Nogales E., Doudna JA Structures of CRISPR genome integration complex. *Science*. 2017. 357(6356): 1113–1118. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aao0679>
117. Jiang F., Taylor DW, Chen JS, Kornfeldt JE, Zhou K., Thompson AJ, Nogales E., Doudna JA Structures of CRISPR/Cas9 R-loop complex primed для DNA cleavage. *Science*. 2016. 351(6275): 867–871. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad8282>
118. Зетче Б., Гуотенберг Й.С., Абудайев ОО, Слаймакер И.М., Макарова К.С., Еслетбиклер П., Уолз SE, Джон Дж., van der Oost J., Regev A., Koonin EV, Жан. -guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015. 163(3): 759-771. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
119. Gleeson A., Sawyer A. CRISPR/Cas9: gold standard of genome editing? *Biotechniques*. 2018. 64(6): 239–243. DOI: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0066>
120. Сансбури БМ, Вагнер А.М., Низсан Э., Габи Т., Кмеичный ЕВ CRISPR, directed in vitro gene editing plasmid DNA catalyzed by Cpf1 (Cas12a) Nuclease and mammalian cell-free extract. *CRISPR J.* 2018. 1(2): 191–202. DOI: <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0006>
121. Burstein D., Harrington LB, Strutt SC, Probst AJ, Anantharaman K., Thomas BC, Doudna JA, Banfield JF New CRISPR-Cas systems от uncultivated microbes. *Натура*. 2017. 542(7640): 237–241. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature21059>
122. Hegge JW, Swarts DC, van der Oost J. Prokaryotic Argonaute proteins: novel genome-editing tools? *Nat. Rev. Microbiol.* 2017. 16(1): 5–11. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.73>
123. Harrington LB, Burstein D., Chen JS, Paez-Espino D., Ma E., Witte IP, Cofsky JC, Kyrpides NC, Banfield JF, Doudna JA Programmed DNA Destruction by Miniature CRISPR-Cas14 Enzymes. *Science*. 2018. 362(6416): 839–842. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aav4294>

124. Абудайев ОО, Гуотенберг JS, Konermann S., Joung J., Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S., Makarova KS, Semenova E., Минакин L., Severinov K., Regev A., Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 является единственным компонентом программируемого RNA-прикрепленного RNA-приложения CRISPR effector. *Science*. 2016. 353(6299): aaf5573. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
125. Smargon AA, Cox DB, Pyzocha NK, Zheng K., Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayeye OA, Essletzbichler P., Shmakov S., Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. Cas13b является типом VI-B -associated RNA guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol. Cell*. 2017. 65(4): 618–630.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.023>
126. Yan WX, Chong S., Zhang H., Makarova KS, Koonin EV, Cheng DR, Scott DA Cas13d является компактным RNA Targeting type VI CRISPR эффектор positively modulated по WYL-domain-containing accessory protein. *Mol Cell*. 2018. 70(2): 327–339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.028>
127. Chatterjee P., Jakimo N., Jacobson JM Minimal PAM specificity of highly similar SpCas9 ortholog. *Sci. Adv*. 2018. 4(10): eaau0766. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau0766>
128. New DNA 'shredder' technique goes beyond CRISPR's scissors. <https://www.drugtargetreview.com/news/42518/new-dna-shredder-technique-goes-beyond-crisprs-scissors/>
129. Саду MJ, Bloom JS, Day L., Siegel JJ, Kosuri S., Kruglyak L. Highly parallel genome variant engineering with CRISPR-Cas9. *Nat. Genet*. 2018. 50(4): 510-514. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0087-y>
130. Enzyme fragment complementation assay technology. <https://www.discoverx.com/technologies-platforms/enzyme-fragment-complementation-technology>
131. Biosensor development using CRISPR для интеллектуального эндогенного протеина, modulated by targeted protein degraders. <http://www.healthtech.com/eurofins-biosensor-Development-using-crispr/>
132. Zengerle M., Chan K.-H., Ciulli A. Selective male molecule induced degradation BET bromodomain protein BRD4. *ACS Chem. Биология*. 2015. 10(8): 1770. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00216>
133. Single-stranded DNA synthesis service. <https://www.genscript.com/new-single-stranded-dna-synthesis-service.html>
134. Strecker J., Ladha A., Gardner Z., Schmid-Burgk JL, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. RNA-guided DNA inserció с CRISPR-associated transposases. *Science*. 2019. 365(6448): 48–53. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aax9181>
135. Stafforst T., Schneider MF An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2012. 51(44): 11166–11169. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201206489>
136. Reardon S. Step как CRISPR, RNA editing is taking off. *Натура*. 2020. 578(7793): 24–27. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00272-5>
137. Pennisi E. The CRISPR craze. *Science*. 2013. 341(6148): 833–836. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.341.6148.833>
138. Gene editing like CRISPR — это важное значение для того, чтобы помочь студентам или другим. <https://www.theguardian.com/comment-isfree/2019/oct/22/gene-editing-crispr-scientists>

SV Комисаренко, SI Романюк

Паладин Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

GENOME EDITING, OR CRISPR/CAS9 — PANACEA FOR MANY INCURABLE DISEASES OR THE FIRST STEP TO A GENE APOCALYPSE?

Оценка дискуссии о истории discovery, rapid development and further prospects for use of new powerful genome editing tool, CRISPR/Cas9. За допомогою одного з елементів в бактерійній системі захисту, biologists have created a simple, inexpensive a fast method altering the DNA of plants, animals and humans. Недалеко от человеческой личности должен сохнуть при помощи инструмента для gene manipulation, це з'єднання з великими можливостями для охорони і охорони багатьох людей. При том же времени, есть чрезвычайный разговор в обществе: будет CRISPR/Cas9 bring good or evil to humanity? Как новенька технология, gene editing raises concerns and raises number of serious ethical issues, regarding specifyly its use on germline bugs and genome of human embryos. However, це є загальним clear, що CRISPR/Cas9 не є нічим фантастиком "toy" для практикуючих, а революційна технологія, яка буде змінювати нашу майбутню.

Keywords: CRISPR/Cas9, genomic DNA editing, gene therapy, genetically modified organisms.