



Актуальные направления и риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома

О.А. Рачинская^{1,✉}, Е.В. Мельникова¹, В.А. Меркулов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Рачинская Ольга Анатольевна; Rachinskaya@expmed.ru

Резюме

Актуальность. В настоящее время разработано множество различных подходов к редактированию генома, основанных на применении разных систем редактирования, осуществлении модификаций генома с образованием одноцепочечных или двухцепочечных разрывов ДНК, *in vivo* или *ex vivo*, с восстановлением последовательности генома с помощью гомологичной рекомбинации или негомологичного соединения концов ДНК. Однако применение систем редактирования генома сопряжено с возможным возникновением целого ряда рисков вследствие сложной биологии таких препаратов и фундаментального значения цели их воздействия – молекулы ДНК.

Цель. Анализ актуальных направлений и рисков, связанных с применением препаратов на основе систем редактирования генома, способов снижения рисков и методов их исследования, используемых для выявления и контроля возникновения нежелательных эффектов.

Обсуждение. Анализ данных литературы показал, что нежелательные эффекты от применения препаратов на основе систем редактирования генома могут быть связаны как со способами доставки компонентов системы в клетку, так и с функциональной активностью самой системы (недостаточное целевое или нежелательное нецелевое действия). В обзоре обозначены основные риски при использовании систем редактирования генома. Установлено, что для снижения рисков применения систем редактирования генома предпочтительно проведение репарации разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации, использование обладающих большей специфичностью и точностью рестрикции систем редактирования генома и эндонуклеаз в их составе, увеличение специфичности гРНК (для CRISPR/Cas), контролируемая коррекция активности элементов системы регуляции клеточного цикла и апоптоза, регуляция продолжительности экспрессии и персистенции компонентов систем редактирования генома в клетках и др.

Заключение. Освещение основных рисков, связанных с применением этой группы препаратов, является актуальным в связи с необходимостью предоставления данных в регистрационном досье на высокотехнологичный лекарственный препарат, касающихся оценки качества, эффективности и безопасности.

Ключевые слова: генотерапевтические лекарственные препараты; редактирование генома; генетические мутации; нецелевые эффекты; риски; разрывы ДНК; CRISPR/Cas9

Для цитирования: Рачинская О.А., Мельникова Е.В., Меркулов В.А. Актуальные направления и риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):247–261. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-247-261>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. В.А. Меркулов – главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Current trends and risks associated with the use of therapies based on genome editing

Olga A. Rachinskaya^{1,✉}, Ekaterina V. Melnikova¹, Vadim A. Merkulov^{1,2}

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Olga A. Rachinskaya; Rachinskaya@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. To date, multiple approaches to genome editing have been developed based on different genome-editing systems (GESs) and genome modifications that result in single- or double-strand DNA breaks, either *in vivo* or *ex vivo*, followed by homologous recombination or non-homologous end joining to restore the sequence. However, the use of GESs is associated with a number of potential risks arising from the complex biology of such medicinal products and the fundamental role of their target, i.e. the DNA molecule.

Aim. This study analysed the most relevant trends and risks associated with medicinal products based on genome editing, the ways taken to overcome these risks, and the research methods used to identify and control the development of undesirable effects.

Discussion. According to the literature, the adverse effects of GESs may arise both from the methods used to deliver GES components into the cell and from the functional activity of the GES itself, which includes insufficient on-target or undesirable off-target effects. This review indicates the main risks associated with the use of GESs. Preferable strategies to mitigate the risks of using GESs include repairing DNA breaks by homologous recombination, selecting GESs and related endonucleases that have greater specificity and restriction accuracy, increasing guide RNA specificity (for CRISPR/Cas), correcting the activity of the system regulating the cell cycle and apoptosis in a controlled manner, regulating the duration of expression and persistence of GES components in cells, etc.

Conclusions. The requirement to include quality, efficacy, and safety data when submitting registration dossiers for advanced therapy medicinal products prompts the discussion of the main risks associated with such products.

Key words: gene therapy products; genome editing; genetic mutations; off-target effects; risks; DNA breaks; CRISPR/Cas9

For citation: Rachinskaya O.A., Melnikova E.V., Merkulov V.A. Current trends and risks associated with the use of therapies based on genome editing. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):247–261. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-247-261>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Внедрение новых технологий генной терапии в медицинскую практику вселяет большие надежды на создание новых инструментов для лечения редких (в большинстве случаев орфанных) генетически обусловленных заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми. Для многих таких заболеваний не существует адекватных методов лечения с использованием традиционных лекарственных препаратов (ЛП), а применяется лишь поддерживающая и паллиативная терапия. До недавнего времени генная терапия определялась как возможность добавления исправленных генетических последовательностей, способных экспрессировать функционально активный белок или РНК в клетки человека [1]. В отличие от такого подхода редактирование генома нацелено на модификацию самих генов пациента, мутации в которых приводят к развитию заболевания, путем изменения последовательности их нуклеотидов (в том числе полное выключение (нокаут) гена(ов)). Таким образом, редактирование генома, как и генную терапию в целом, можно отнести к персонализированной медицине, позволяющей подобрать индивидуальный подход к лечению заболеваний, которыми страдает небольшой процент людей или даже единственный пациент.

В руководствах по генотерапевтическим продуктам по применению технологий редактирования генома в Европейском союзе (European Medicines Agency, EMA)¹, США (U.S. Food and Drug Administration, FDA)² и Японии (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA)³ указываются два принципиально разных подхода к проведению процедуры редактирования генома соматических клеток (редактирование генома эмбрионов в данных руководствах не рассматривается). *In vivo* терапия основана на непосредственном введении системы редактирования генома (СРГ) в организм пациента, где с помощью специально разработанных механизмов доставки она попадет в целевые клетки. *Ex vivo* терапия подразумевает модификацию полученных от доноров клеток *in vitro* с последующим введением этих отредактированных клеток в организм пациента.

Согласно нормативно-правовым актам Евразийского экономического союза, в частности,

в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»⁴ (далее Решение Совета ЕЭК № 78), препараты на основе СРГ относятся к генотерапевтическим лекарственным препаратам (ГТЛП), при регистрации которых необходимо учитывать следующее: комплекс из системы доставки и последовательности ДНК самой СРГ, вводимый непосредственно в организм пациента для терапии *in vivo*, является активным веществом в составе ЛП, тогда как в случае терапии *ex vivo* этот же комплекс принято считать лишь исходным сырьем, а активным веществом являются клетки с отредактированным геномом, вводимые пациенту (п. 17.3.2.1.3–17.3.2.1.5).

Возникающие споры относительно применения СРГ касаются ряда существующих этических моментов, которые могут быть нарушены при внедрении подобных технологий в медицинскую практику. При осуществлении редактирования эмбрионов существует риск передачи непредвиденных и побочных эффектов из поколения в поколение, и нет определенности в порядке возложения ответственности за принятие решения о проведении процедуры пренатального редактирования на родителей, врача либо третью сторону [2]. Нарушение этических норм, возможно, произошло при получении Jiankui He с коллегами эмбрионов человека, устойчивых к ВИЧ-инфекции [3], что вызвало неоднозначную оценку данного события и серьезные опасения по поводу целесообразности применения данной технологии в связи с отсутствием анализа соотношения «польза – риск» и существованием сомнений в функциональной активности модифицированного белка подобно аномальному белку CCR5Δ32, встречающемуся у небольшого процента людей, устойчивых к ВИЧ [4]. Поэтому анализ и оценка рисков применения препаратов на основе технологий редактирования генома является основным критерием в случае принятия решения об их разработке и внедрении в практику.

Цель работы – анализ актуальных направлений и рисков, связанных с применением препаратов на основе систем редактирования генома,

¹ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev.1-corr). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified_en-0.pdf

² Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.

³ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

⁴ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

способов снижения рисков и методов их исследования, используемых для выявления и контроля возникновения нежелательных эффектов.

Следует уточнить, что в настоящей работе рассматриваются исключительно препараты для редактирования соматических клеток, за исключением клеток эмбрионов, редактирование которых в России запрещено⁵.

Виды редактирования генома

Редактирование генома с внесением двухцепочечного разрыва ДНК

Данные технологии редактирования генома основаны на внесении двухцепочечных разрывов в определенные участки ДНК и механизмах их репарации. Существуют два основных механизма репарации повреждений ДНК в клетках: гомологичная рекомбинация (ГР) и негомологичное соединение концов (НСК). При ГР для восстановления отсутствующего участка ДНК в клетку вводится последовательность ДНК (ДНК матрица), гомологичная локусу разрыва, и используются эндогенные механизмы рекомбинации самой клетки. При НСК репарация осуществляется путем сшивания концов ДНК без использования матрицы. И ГР, и НСК могут применяться при модификации генома в терапевтических целях. Существуют особенности применения обоих подходов: так, к НСК можно прибегнуть практически в течение всего клеточного цикла, в то время как к ГР – только на стадии репликации ДНК (в фазах S/G2) [5]. При этом даже при корректной процедуре репарации в обоих случаях могут возникнуть непреднамеренные генетические аномалии в последовательности ДНК [6, 7].

Высокая способность к гомологичной рекомбинации отмечается в эмбриональных стволовых клетках⁶ [8]. Точное редактирование генома с последующим восстановлением двухцепочечного разрыва посредством ГР оказалось довольно эффективным и для ряда линий опухолевых клеток [9]. Напротив, редактирование геномов нетрансформированных клеток труднее осуществить из-за возникающего с большой долей вероятности апоптоза в ответ на повреждение ДНК и/или более вероятного осуществления

репарации ДНК по принципу НСК [10, 11]. В настоящее время разработано несколько перспективных подходов к повышению эффективности редактирования генома клеток посредством ГР, основанных на увеличении концентрации матрицы репарационной ДНК, доставке ингибиторов НСК и оптимизации методов трансфекции ДНК матрицы [12–14].

Для одновременного нокаута более чем одного гена или проведения более эффективной ГР разработано редактирование генов с осуществлением двух или более двухцепочечных разрывов ДНК. Такой подход приводит к повышению вероятности возникновения крупных хромосомных aberrаций, например транслокаций и делеций, поэтому в японском руководстве по ГТЛП, получаемых с использованием СРГ, приводятся рекомендации по проведению исследований для выявления возникающих хромосомных аномалий⁷.

Редактирование генома без внесения двухцепочечного разрыва ДНК

Для предотвращения образования хромосомных aberrаций возможно применение технологии редактирования генома без осуществления двухцепочечных разрывов ДНК. С помощью каталитически инактивированной нуклеазы Dead Cas9, фермента дезаминазы или с помощью эпигенетических модификаций генома, таких как метилирование ДНК, можно добиться разрезания только одной цепи целевой последовательности ДНК с последующей заменой азотистых оснований. Однако эти технологии редактирования генома могут также вызывать неблагоприятные события, характерные и для редактирования генома с двухцепочечными разрывами: длительное сохранение активности фермента или нецелевой (off-target) эффект⁸ [11].

Системы редактирования генома

Наиболее широкое распространение получили СРГ трех типов: ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9 [15]. Системы редактирования генома «цинковые пальцы» (zinc-finger nucleases, ZFN) и TALEN (transcription activator-like effector nucleases) [16] содержат в качестве фермента рестрикции

⁵ Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Федеральный закон от 20.05.2002 № 54-ФЗ «О временном запрете на клонирование человека». Приказ Минздрава России от 30.08.2012 № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

⁶ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

⁷ Там же.

⁸ Там же.

эндонуклеазу FokI, которая осуществляет двухцепочечные разрывы в специфических сайтах целевых последовательностей ДНК. Распознавание определенных последовательностей ДНК осуществляется данными СРГ с помощью ДНК-связывающих белковых доменов, конструирование которых требует существенных материальных и трудовых затрат.

В международном реестре клинических исследований (КИ)⁹ представлены в настоящее время КИ (параметры поиска: ключевые слова – zinc-finger nuclease; статус КИ – все, за исключением «Unknown» и «Withdrawn») с применением системы ZFN преимущественно для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов (NCT02388594, NCT03617198, NCT01044654, NCT02500849, NCT03666871, NCT01252641, NCT02225665, NCT04201782, NCT01543152). Кроме того, ZFN применяется в единичных КИ для лечения β-талассемии (NCT03432364), серповидноклеточной анемии (NCT03653247), гемофилии (NCT02695160) и мукополисахаридоза 1 и 2 типов (NCT03041324, NCT02702115, NCT04628871). Все перечисленные КИ проводились или проводятся исключительно в США. В большинстве представленных КИ (n=12) с СРГ ZFN спонсором является компания Sangamo Therapeutics.

Необходимо отметить, что по состоянию на июнь 2023 г. для системы TALEN все КИ (параметры поиска: ключевое слово – TALEN, статус КИ – все, за исключением «Unknown» и «Withdrawn») имеют статус «Набор пациентов (Recruiting)», а заболевания, для которых они используются, включают только онкологические: злокачественные новообразования, связанные с инфицированием вирусом папилломы человека (NCT03226470, Китай); рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома (NCT04142619, США); рецидивирующий/рефрактерный острый миелоидный лейкоз (NCT03190278, США); В-клеточные неходжкинские лимфомы (NCT05607420, США, Франция, Испания); В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (NCT04150497, США, Франция); рецидивирующая/рефрактерная крупноклеточная лимфома (NCT04416984, США). В четырех из шести входящих в реестр КИ спонсором является компания Collectis S.A., в Китае КИ проводится Хуачжунским университетом науки и техники.

Метод коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных кластерами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), с CRISPR-ассоциированным белком

(CRISPR-associated proteins, Cas) [17] предполагает другой подход к распознаванию последовательности ДНК – использование однопитевой гидовой РНК (гРНК). Конструкция CRISPR/Cas характеризуется простотой использования и относительно невысокой стоимостью [18].

Система CRISPR/Cas была применена для борьбы с целым рядом генетических заболеваний [19–23]. Например, она использовалась для исправления мутации в гене дистрофина, приводящей к развитию мышечной дистрофии Дюшенна, что позволило восстановить нормальную экспрессию гена [21]. Восстановление морфологических и функциональных свойств мышечной ткани было продемонстрировано на моделях мелких [24] и крупных животных [25] при доставке нуклеазы в клетки пораженной мышцы с помощью вирусного вектора. Также система CRISPR/Cas была использована для получения пролонгированного терапевтического эффекта посредством редактирования генома гемопоэтических стволовых клеток при исправлении мутаций, приводящих к развитию серповидноклеточной анемии [26].

В настоящее время на информационном портале ClinicalTrials.gov¹⁰ КИ при использовании СРГ CRISPR/Cas9 (параметры поиска: ключевое слово – CRISPR; статус КИ – все, за исключением «Unknown» и «Withdrawn») посвящены лечению различных по своей этиологии заболеваний, например: трансфузионно-зависимой β-талассемии и серповидноклеточной анемии (NCT03655678 – США, Канада, Германия, Италия, Великобритания; NCT03745287 – США, Канада, Германия, Италия, Великобритания, Бельгия, Франция; NCT05356195 – США, Канада, Германия, Италия, Великобритания; NCT05329649 – США, Германия, Италия, Великобритания; NCT05477563 – США, Италия; NCT05444894 – США; NCT04853576 – США, Канада); метастатического рака желудочно-кишечного тракта (NCT04426669 – США); наследственного ангионевротического отека (NCT05120830 – Франция, Нидерланды, Новая Зеландия, Великобритания); рецидивирующих или рефрактерных Т- или В-клеточных злокачественных новообразований (NCT04502446 – США, Австралия, Канада; NCT04438083 – США, Австралия, Канада, Нидерланды; NCT04035434 – США, Австралия, Канада, Германия, Испания); транстиретиновой семейной амилоидной полинейропатии и кардиомиопатии, связанных с транстиретиновым амилоидозом (NCT04601051 – Франция, Новая Зеландия, Швеция, Великобритания);

⁹ U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>

¹⁰ Там же.

инфицированных ВИЧ-1 пациентов с авиремией, получающих стабильную антиретровирусную терапию (NCT05144386 – США); рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломы (NCT04244656 – США, Австралия, Канада, Испания); семейной гиперхолестеринемии и сердечно-сосудистых заболеваний (NCT05398029 – Новая Зеландия, Великобритания); амвроза Лебера типа 10 (NCT03872479 – США). Причем необходимо отметить, что спонсорами КИ с применением CRISPR/Cas9 для лечения генетических заболеваний являются следующие компании: в 5 КИ – Vertex Pharmaceuticals Incorporated, в 2 КИ – Intellia Therapeutics, в 2 КИ – Editas Medicine, Inc., в 1 КИ – Intellia Therapeutics.

В официальном национальном реестре КИ Китая¹¹ (параметры поиска: ключевые слова – zinc-finger nuclease, ZFN, TALEN, CRISPR, gene editing) на июнь 2023 г. содержится информация только о трех (недиагностических) КИ с использованием СРГ CRISPR/Cas9: для лечения пациентов с трансфузионно-зависимой β -талассемией (ChiCTR2100053406, ChiCTR2100052858) и для лечения дефектов хряща (ChiCTR2100041827).

Таким образом, можно сделать вывод, что препараты на основе ZFN используются в большинстве КИ для лечения пациентов с ВИЧ, продукты на основе TALEN – для лечения онкогематологических заболеваний, а препараты на основе CRISPR/Cas – преимущественно для лечения генетических и онкологических заболеваний. Спонсорами, проводящими большинство КИ, содержащихся в реестре КИ, с системой ZFN является компания Sangamo Therapeutics, с системой TALEN – Collectis S.A., с системой CRISPR/Cas9 – Vertex Pharmaceuticals Incorporated.

Способы доставки компонентов системы редактирования генома в клетку

Компоненты СРГ могут быть доставлены в целевые клетки в виде последовательности ДНК, с которой будет осуществляться экспрессия желаемых белков, в сочетании с системой доставки или без нее; в виде мРНК, с последующей трансляцией желаемого белка; или в виде уже готовых белковых продуктов¹² [11].

Выбор оптимального способа доставки компонентов СРГ в клетку необходим для осуществления эффективной трансфекции при сохранении достаточного количества жизнеспособных трансфицированных клеток. При этом важно учитывать преимущества и недостатки имеющихся систем доставки.

При редактировании генома *in vivo* доставка компонентов СРГ чаще всего осуществляется с помощью вирусных векторов и наночастиц [27, 28]. В случае применения вирусных векторов выбор вектора зависит от предельного размера нуклеиновой кислоты, которая должна быть доставлена в клетку. Кроме того, следует учитывать тропность вектора к целевым клеткам и тканям, а также возможность ограничения попадания трансгена в ткани, не являющиеся мишенями. Важным моментом является возможность регуляции экспрессии компонентов СРГ, например с помощью использования тканеспецифичных промоторов и низкомолекулярных ингибиторов. Вирусные векторы могут поддерживать длительную экспрессию трансгена, в то время как наночастицы используются для кратковременной экспрессии. С помощью плазмиды или вирусного вектора, например сконструированного на основе аденоассоциированного вируса (ААВ), также можно доставить в клетку и матрицу ДНК, с которой будет осуществляться гомологичная рекомбинация при репарации опосредованного нуклеазой разрыва ДНК¹³.

При редактировании генома *ex vivo* доставку компонентов системы в клетку в большинстве случаев осуществляют с помощью электропорации и других физических методов. В этом случае компоненты СРГ могут быть доставлены в клетки в виде не только ДНК, но и мРНК или белкового комплекса¹⁴ [29].

Риски, связанные с использованием систем редактирования генома

Многочисленные исследования редактирования генома с помощью СРГ как на клеточных культурах, так и на эмбрионах выявили возможность возникновения целого ряда неблагоприятных последствий [30–33]. В связи с этим необходимо проведение предварительных

¹¹ Chinese clinical trial registry. <https://www.chictr.org.cn/searchprojEN.html>

¹² White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>
Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev.1-corr). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified_en-0.pdf

¹³ Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.

¹⁴ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

исследований с целью оценки рисков и снижения частоты развития нежелательных явлений от применения препаратов такого типа, а также оптимизации методов, позволяющих обнаруживать такие явления.

1. Риски, связанные с использованием векторов и других способов доставки компонентов систем редактирования генома в клетку

Риск трансдукции нецелевой популяции клеток. Продукты генной терапии для редактирования генома с использованием вирусного или плазмидного вектора требуют дополнительной доклинической оценки безопасности, аналогичной исследованиям, проводимым для любого продукта генной терапии, в связи с возможным риском трансдукции нецелевой популяции клеток при применении препаратов *in vivo*. При этом следует оценивать тропность вирусного вектора (природную или модифицированную) и биораспределение векторных конструкций в определенных типах клеток или тканей. Частоту генетической модификации клеток-мишеней и нецелевых клеток необходимо анализировать посредством оценки коэффициента инфекционности вектора¹⁵.

Инсерционный мутагенез. Инсерционный мутагенез является существенным риском для ряда генотерапевтических ЛП. Он сопряжен со встраиванием трансгена в геном клетки-хозяина, например при использовании в качестве способа доставки трансгена в клетки лентивирусных и ретровирусных векторов. Для способов невирусной доставки элементов СРГ в целевые клетки, получивших наибольшее распространение при терапии *ex vivo*, таких как нуклеофекция [30], электропорация [34], липофекция, а также доставки с помощью вирусных векторов на основе аденовирусов и AAV [35], интродукция трансгена в геном клетки-хозяина не характерна, и поэтому проблема инерционного мутагенеза, считается маловероятной.

Риск модификации генов в клетках зародышевой линии. Риск попадания вирусного вектора и трансгена в клетки зародышевой линии и осуществление в них целевой активности СРГ характерен для группы препаратов, осуществляющих редактирование генома *in vivo*, применяемых у детей и пациентов репродуктивного возраста, что требует отдельного обоснования при подтверждении безопасности применения таких препаратов [36], а также возможной оценки влияния произведенной процедуры на последующие поколения.

2. Риск подавления экспрессии трансгена

Даже при эффективной доставке СРГ с помощью вектора в целевые клетки экспрессия РНК и белков системы СРГ может оказаться угнетена. Такой эффект может стать результатом генетической или эпигенетической нестабильности, а также результатом активации механизмов подавления экспрессии самой клетки [37].

3. Риски, связанные с целевым действием систем редактирования

Возникновение хромосомных перестроек. Целевое действие СРГ, приводящее к активации природных механизмов репарации поврежденной ДНК, может стать причиной возникновения мутагенеза. Восстановление двухцепочечного разрыва, индуцированного нуклеазой, путем негомологичного соединения концов может привести к образованию делеций и инсерций. Такие мутации часто имеют небольшой размер, иногда всего в один нуклеотид [38], однако возможно выпадение и больших участков ДНК, измеряемых уже тысячами пар нуклеотидов [39]. Возникновение крупных хромосомных перестроек было продемонстрировано в работе по редактированию одноклеточных зигот мыши [40] и в исследовании *in vivo*, в котором система CRISPR/Cas9 использовалась для исправления мутации в гене *Otc*. В результате было выявлено, что 6,5% отредактированных клеток несли крупные делеции [41]. Такие крупные мутации могут привести к дезактивации целых генов или вызвать нарушение регуляции соседних экспрессируемых последовательностей.

Восстановление последовательности ДНК между двумя или более двухцепочечными разрывами (если редактирование генома подразумевает образование разрывов в нескольких участках одной хромосомы) также может приводить к делетированию последовательности ДНК между этими разрывами (что может само по себе стать целью эксперимента) или образованию инверсий или дупликаций данного локуса с последующей инсерцией дублированного района в различные участки генома [32]. При образовании разрывов ДНК в разных участках генома могут возникнуть межхромосомные транслокации, которые, в свою очередь, могут сопровождаться дезактивацией генов-супрессоров опухолей или стать причиной образования химерных белков, приводящих к развитию рака, таких как, например, конститутивно активная тирозинкиназа — продукт экспрессии химерного гена *BCR-ABL*, образованного в результате

¹⁵ Там же.

реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22 [42].

Инициация апоптоза клеток. Образование разрыва ДНК в результате нуклеазной активности может привести к остановке клеточного цикла и, при нарушениях механизмов репарации, ее апоптозу. По этой причине редактирование генов часто сопровождается цитотоксичностью, а эффективность модификации генома может оказаться намного ниже предполагаемой.

Однако если клетка, подвергающаяся процедуре редактирования генов с помощью СРГ, несет нарушения в генах системы репарации или в генах, отвечающих за регуляцию клеточного цикла, она может избежать апоптоза и приобрести селективное преимущество перед клетками без таких мутаций при культивировании или при делении в организме пациента.

В работе E. Naaraniemi с соавт. [43] было показано, что редактирование генома с помощью CRISPR-Cas9 индуцирует p53-опосредованный ответ на повреждение ДНК, что приводит к остановке клеточного цикла. Наблюдаемый эффект зависит от экспрессии генов белков апоптоза p53, p21 и pRB. Ген pRB опосредует остановку клеточного цикла в фазе G1 в ответ на накопление белка p21 [44]. Для запуска остановки клеточного цикла достаточно даже небольшого количества повреждений ДНК. Нуклеаза Cas9 при этом может оставаться связанной с местом разрыва в течение более 6 часов, возможно, препятствуя успешному восстановлению клеточного цикла и/или вызывая остановку вилок репликации. Ингибирование передачи сигналов о повреждении ДНК может повысить эффективность точного редактирования генома в нормальных нетрансформированных клетках. Однако ингибирование p53-опосредованного механизма также повышает вероятность возникновения в геноме клетки хромосомных аномалий.

В работе R.J. Ihry с соавт. [45] было показано, что редактирование плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека сложно осуществить. В большинстве ПСК с интегрированной нуклеазой Cas9, осуществляющей двухцепочечные разрывы ДНК, наблюдались проявления цитотоксичности с последующей гибелью клеток. Было выявлено, что токсический ответ на двухцепочечный разрыв является p53-опосредованным и эффективность геномного редактирования ПСК человека с геном TP53 дикого типа была сильно снижена. Однако в популяции ПСК человека с приобретенной мутацией в гене TP53 в среднем осуществление целевых инсерций или делеций было достигнуто в 80 % клеток.

В дальнейшем, отбирая клетки, в которых процедура редактирования генома была успешной, исследователи ненамеренно могут селектировать клоны клеток, потенциально обладающие туморогенностью, которые при использовании в терапевтических целях могут привести к возникновению опухолей у пациентов. Данная проблема, возникающая с частотой, превышающей даже вероятность нецелевого метагенеза, вызвала сомнения в целесообразности применения всей технологии редактирования генома в целом.

Биаллельное редактирование. Высокая активность нуклеаз СРГ часто может приводить к редактированию обеих аутомомных копий гена-мишени. Это представляется возможным в случаях, когда полная потеря функции гена является целью для достижения терапевтического эффекта, однако часто возникают ситуации, когда необходимо воздействовать только на одну копию гена, в частности при попытке исправить или удалить доминантные гетерозиготные мутации. Хотя современные методы молекулярной биологии позволяют сконструировать СРГ для исправления определенной аномальной копии гена, толерантность систем к небольшим несоответствиям в последовательности ДНК может затруднить способность различать мутантную и нормальную копии гена. Следует обратить внимание, что множество мутаций, приводящих к развитию заболевания, представляют собой однонуклеотидные замены в гене, отличить которые от последовательности генов дикого типа для СРГ весьма затруднительно, что может привести к образованию разрывов в нормальной копии гена или даже повторному редактированию ранее репарированной мутации [32].

Отсутствие целевой активности систем редактирования генома. Отсутствие целевой активности СРГ – ситуация обратная биаллельному редактированию гетерозиготной мутации, при которой происходит узнавание СРГ и внесение разрыва нуклеазой только в одном аллеле целевого гена при сохранении интактным другого аллеля. Именно такое явление было показано при проведении исследования доктором Jiankui He по генетическому редактированию гена CCR5 у эмбрионов с помощью CRISPR/Cas9 с целью их защиты от ВИЧ-инфекции [32]. При этом у одного из эмбрионов была выявлена делеция в 15 п.н. только в одном аллеле гена, тогда как другой аллель остался интактным. Как следствие, интактный аллель гена CCR5 остался экспрессионно активным и с него происходила транскрипция хемокинового рецептора дикого типа, который делал Т-клетки

одной из родившихся девочек восприимчивыми к инфицированию ВИЧ [32].

Риск длительной персистенции в организме пациента. Чем дольше время персистенции компонентов СРГ (в первую очередь нуклеазы), тем выше риск возникновения непреднамеренных модификаций генома, особенно нецелевого редактирования и возникновения хромосомных перестроек. Поэтому для снижения нежелательных эффектов необходимо, чтобы длительность персистенции компонентов, по возможности, не превышала время, требующееся для достижения желаемой модификации генома.

4. Риски, связанные с нецелевыми эффектами

Нецелевое действие систем редактирования генома (нежелательный мутагенез). Случаи возникновения нежелательных мутаций в нецелевых сайтах стали регистрироваться учеными с начала применения СРГ [30]. Показано, что использование СРГ сопряжено с риском осуществления нежелательной рестрикционной активности фермента в локусах генома, сходных по последовательности с целевым участком ДНК [30, 46].

Следует отметить, что специфичность действия разных СРГ и отдельных их компонентов может сильно варьировать. Так, нуклеаза FokI – фермент, входящий в состав систем ZFN и TALEN, – разрезает только одну цепь ДНК (в отличие от Cas9), поэтому для распознавания последовательности ДНК выше и ниже целевого сайта расщепления требуются две СРГ. Таким образом, при осуществлении одного двухцепочечного разрыва происходит распознавание последовательности от 18 до 40 оснований, что в два раза превышает размер последовательности нуклеотидов, необходимой для специфического узнавания. Это делает специфичность распознавания ДНК-мишени как ZFN, так и TALEN достаточно высокой. В свою очередь, гРНК системы CRISPR/Cas может осуществить связывание с последовательностью ДНК-мишени даже при наличии несовпадений вплоть до пяти пар оснований, что связано с ошибками распознавания гРНК и образованием комплекса гРНК с последовательностью ДНК с низкой аффинностью [30].

С целью уменьшения нецелевых эффектов CRISPR/Cas было исследовано влияние на точность редактирования длины гРНК или вторичной структуры последовательности ДНК-мишени [47, 48]. Однако надежная стратегия для увеличения специфичности системы пока не выработана. В связи с этим ведутся активные исследования с целью создания более высокоспецифичных гРНК. В работе D.D. Kosak

с соавт. [49] показано увеличение специфичности CRISPR/Cas9 путем изменения вторичной структуры (создание шпилечной структуры) в спейсерной области гРНК.

Другим подходом к решению проблемы возникновения нецелевых эффектов является разработка ферментов, обладающих большей избирательностью, например использование модифицированных Cas [49–51]. Примером такой модификации может быть внесение единственной точечной мутации (p.R691A) в последовательность эндонуклеазы Cas9, в результате чего при редактировании мутации (p.E6V), приводящей к развитию серповидноклеточной анемии, был применен ее высокоточный (HiFi Cas9) аналог [52]. Также было показано, что ортологи нуклеазы Cas9, полученные из альтернативных видов бактерий, могут обладать большей точностью внесения разрывов в ДНК [51, 53].

Риск возникновения нежелательного мутагенеза также может возрасти при высокой концентрации и длительной персистенции нуклеазы в организме [54], поэтому более предпочтительным является использование нуклеазы с ограниченной активностью и коротким сроком персистенции [55]. Показано, что сокращение периода активности нуклеазы Cas9 снижает уровень мозаицизма, возникающего в результате редактирования генома в клетках эмбрионов нечеловекообразных приматов [56].

Большое значение имеет и выбор в целевом гене сайта рестрикции с максимально уникальной последовательностью нуклеотидов, для чего в биоинформатике разработан ряд алгоритмов, позволяющих провести оценку возможности возникновения разрывов в нецелевых сайтах генома [57, 58]. Однако подобные алгоритмы не способны учитывать внутривидовой полиморфизм однонуклеотидный полиморфизм (single-nucleotide polymorphism, SNP) [59]. Эту проблему можно решить лишь при адаптации СРГ в рамках персонализированного подхода.

5. Риск иммуногенности

Риск развития иммуногенности в ответ на применение препаратов на основе СРГ может быть вызван как введением векторной системы доставки, так и элементами самой СРГ, например нуклеазами. Иммуногенность нуклеаз обусловлена их бактериальным происхождением, как в случае с нуклеазами Cas. Поэтому даже при генной терапии *ex vivo* клетки, введенные пациенту, экспрессируют ферменты, которые распознаются иммунной системой реципиента как гетерологичные антигены. Возникающая иммуногенность может дополнительно

сопровождаться иммунотоксичностью, ослаблением терапевтического эффекта продукта и развитием анафилаксии¹⁶.

6. Риск использования аллогенных клеток при *ex vivo* терапии

В случае если препарат содержит аллогенные клетки, отредактированные *ex vivo*, и может быть применен для многих пациентов, целесообразным является проведение дополнительных исследований, например скрининга доноров клеток с целью снижения риска передачи инфекционных заболеваний. Также важным аспектом является проведение анализа процесса редактирования генома в целевых и нецелевых сайтах и дополнительные испытания на выявление туморогенного потенциала.

Производство препаратов для аллогенного применения вообще и в случае продуктов на основе СРГ в частности требует создания аттестованных банков клеток (главного и рабочего банков) и паспортизации хранящихся в них клеточных линий.

Подходы к анализу эффективности и безопасности редактирования генома и методы выявления нежелательных последствий

Рассмотренные выше риски, связанные с применением ГТЛП, основанных на применении СРГ, требуют определенных подходов при подтверждении эффективности и безопасности их использования. В настоящее время регуляторные органы в США, Европейском союзе и Японии разрабатывают рекомендации для производителей, содержащие основные подходы к оценке эффективности и безопасности применения этих продуктов. Необходимые характеристики препаратов на основе СРГ, которые должны быть определены согласно проекту руководства FDA¹⁷, представлены на *рисунке 1*.

Для выявления нежелательных эффектов, возникающих в результате действия СРГ, существует целый арсенал методов молекулярно-генетического анализа. Каждый отдельный метод предназначен для конкретных целей и имеет ограничения в применении и пределы обнаружения, которые необходимо учитывать.

Мелкие мутации, чаще всего представленные делециями, могут быть идентифицированы с помощью гетеродуплексного анализа. Этот метод, основанный на ПЦР, наилучшим образом подхо-

дит для анализа коротких геномных фрагментов с известной последовательностью. С другой стороны, гетеродуплексный анализ не подходит для полногеномного скрининга. В этом случае лучшей альтернативой может быть секвенирование, которое в зависимости от характера анализируемой последовательности генома может быть целевым (таргетным) или полногеномным.

Целевое секвенирование, позволяющее установить последовательность нуклеотидов в ампликонах, является одним из предпочтительных подходов для изучения определенных областей генома. При неоднородности популяция клеток для анализа решающее значение приобретает охватываемый диапазон ампликонов для секвенирования: если нежелательную мутацию несет только небольшой процент клеток, низкий диапазон последовательностей может не позволить выявить нежелательные геномные варианты, как и в случае с гетеродуплексным анализом. Недостатком целевого секвенирования является то, что оно позволяет анализировать только небольшую часть генома и не исключает наличия мутаций за пределами выбранной области.

Использование полногеномного секвенирования (whole-genome sequencing, WGS) возможно при изучении клональных и гомогенных клеточных популяций, в которых большинство клеток имеет одинаковый геномный профиль. Преимуществом WGS является его способность обнаруживать мутации независимо от их природы и положения в геноме. Однако данный метод характеризуется длительностью анализа. Внедрение автоматической очистки ДНК с последующей подготовкой библиотеки и секвенированием способствовало значительному сокращению времени проведения анализа [60] и позволило методу полногеномного секвенирования получить статус «рутинного».

Полное и достоверное выявление изменений в геноме (в том числе хромосомных перестроек) возможно лишь при комплексном подходе с использованием разнообразных методов анализа: стратегии генотипирования на основе ПЦР, секвенирования следующего поколения (NGS) с использованием коротких или длинных прочтений, саузерн-блоттинга, методов цитогенетического анализа (G-бэндинг, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), в том числе многоцветная FISH (mFISH)), а также метода сравнительной геномной гибридизации (CGH). Но следует учитывать, что риск не выявить ано-

¹⁶ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

¹⁷ Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.



Рис. 1. Подходы к оценке эффективности и безопасности препаратов на основе систем редактирования генома (СРГ) (подготовлен авторами по данным руководства FDA¹⁸).

Fig. 1. Approaches to assessing the efficacy and safety of medicinal products based on genome-editing systems (GES) (compiled by the authors using the FDA guidance¹⁸).

малию сохраняется даже при таком подходе вследствие ограничений применения каждого

метода [32]. Например, G-бэндинг и окрашивание хромосом при mFISH можно произвести

¹⁸ Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.

только на клетках на стадии метафазы митоза. При этом требуется провести анализ большого количества клеток. Многоцветная FISH позволяет увидеть межхромосомные транслокации, однако с трудом выявляет внутривхромосомные перестройки небольшого размера, например инверсии. С помощью CGH возможно анализировать аномальные амплификации и делеции генов, когда они характерны для большого числа клеток, однако чувствительность CGH слишком низка для обнаружения aberrаций ДНК, которые не являются клональными или встречаются лишь в небольшом проценте клеток [61].

Заключение

Системы редактирования генома позволяют проводить специфичную модификацию генома эукариотических клеток. В настоящее время ученые и разработчики генотерапевтических лекарственных препаратов, созданных с применением технологий редактирования генома, используют в основном три типа систем редактирования генома: ZFN, TALEN и CRISPR/Cas (с различными модификациями), направленных, прежде всего, на преодоление нежелательных последствий от их применения (например, нецелевого редактирования, возникновения нежелательного мутагенеза или отсутствия целевой активности системы редактирования генома). Препараты, созданные с применением ZFN, разрабатываются преимущественно для лечения пациентов с ВИЧ, TALEN – с гемобластомами,

CRISPR/Cas – для терапии как генетических, так и онкологических заболеваний.

Для снижения рисков, связанных с использованием систем редактирования генома, предпочтительным становится проведение репарации разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации, применение обладающих большей специфичностью и точностью рестрикции систем редактирования генома и эндонуклеаз в их составе, увеличение специфичности гРНК (в случае системы CRISPR/Cas), контролируемая коррекция активности элементов системы регуляции клеточного цикла и апоптоза (например, контролируемое функционирование гена p53), регуляция продолжительности экспрессии и персистенции компонентов систем редактирования генома в клетках и другие молекулярно-генетические подходы.

Анализ рисков, связанных с применением препаратов, созданных на основе геномного редактирования, может быть использован при формировании пакета документов регистрационного досье о качестве, эффективности и безопасности препарата согласно Решению Совета ЕЭК № 78. Выявление основных рисков позволит обосновать отсутствие, сокращение или добавление некоторых исследований при разработке высокотехнологичных лекарственных препаратов и предоставление результатов исследований в материалах регистрационного досье на препараты данной группы.

Литература/References

1. Ребриков ДВ. Редактирование генома человека. *Вестник РГМУ*. 2016;(3):4–15.
Rebrikov DV. Human genome editing. *Bulletin of RSMU*. 2016;(3):4–15 (In Russ.).
EDN: [WFOBMX](#)
2. Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Front Oncol*. 2020;10:1387.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>
3. Cyranoski D. The CRISPR-baby scandal: what's next for human gene-editing. *Nature*. 2019;566(7745):440–2.
<https://doi.org/10.1038/d41586-019-00673-1>
4. Cohen J. Did CRISPR help—or harm—the first-ever gene-edited babies? *Science*. 2019.
<https://doi.org/10.1126/science.aay9569>
5. Cox D, Platt R, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015;21(2):121–31.
<https://doi.org/10.1038/nm.3793>
6. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(9):712–20.
<https://doi.org/10.1038/nrm1202>
7. Guirouilh-Barbat J, Lambert S, Bertrand P, Lopez BS. Is homologous recombination really an error-free process? *Front Genet*. 2014;5:175.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00175>
8. Choi EH, Yoon S, Koh YE, Seo Y-J, Kim KP. Maintenance of genome integrity and active homologous recombination in embryonic stem cells. *Exp Mol Med*. 2020;52:1220–9.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0481-2>
9. Creeden JF, Nanavaty NS, Einloth KR, Gillman CE, Stanbery L, Hamouda DM, et al. Homologous recombination proficiency in ovarian and breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1154.
<https://doi.org/10.1186/s12885-021-08863-9>
10. Lai JKH, Toh PJY, Cognart HA, Chouhan G, Saunders TE. DNA-damage induced cell death in yap1;wwtr1 mutant epidermal basal cells. *Elife*. 2022;11:e72302.
<https://doi.org/10.7554/eLife.72302>
11. Yamaguchi T, Uchida E, Okada T, Ozawa K, Onodera M, Kume A, et al. Aspects of gene therapy products using gene editing technology in Japan. *Hum Gene Ther*. 2020;31(19–20):1043–53.
<https://doi.org/10.1089/hum.2020.156>

12. Richardson C, Ray G, DeWitt M, Curie G, Corn J. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):339–44. <https://doi.org/10.1038/nbt.3481>
13. DeWitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med.* 2016;8(360):360ra134. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9336>
14. Lee K, Mackley VA, Rao A, Chong AT, Dewitt MA, Corn J, Murthy N. Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering. *Elife.* 2017;6:e25312. <https://doi.org/10.7554/eLife.25312>
15. Горяев АА, Савкина МВ, Мефед КМ, Бондарев ВП, Меркулов ВА, Тарасов ВВ. Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018;18(3):140–9. Goryaev AA, Savkina MV, Mefed KM, Bondarev VP, Merkulov VA, Tarasov VV. Genome-editing and biomedical cell products: current state, safety and efficacy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2018;18(3):140–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-140-149>
16. Kim M-S, Kini AG. Engineering and application of zinc finger proteins and TALEs for biomedical research. *Mol Cells.* 2017;40(8):533–41. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0139>
17. Yuanyuan X., Zhanjun Li. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:2401–15. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
18. You L, Tong R, Li M, Liu Y, Xue J, Lu Y. Advancements and obstacles of CRISPR-Cas9 technology in translational research. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;13:359–70. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.02.008>
19. Pinjala P, Tryphena KP, Prasad R, Khatri DK, Sun W, Singh SB, et al. CRISPR/Cas9 assisted stem cell therapy in Parkinson's disease. *Biomater Res.* 2023;27(1):46. <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00381-y>
20. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
21. Erkut E, Yokota T. CRISPR therapeutics for Duchenne muscular dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1832. <https://doi.org/10.3390/ijms23031832>
22. Graham C, Hart S. CRISPR/Cas9 gene editing therapies for cystic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2021;21(6):767–80. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1869208>
23. Porteus MH. A new class of medicines through DNA editing. *N Engl J Med.* 2019;380(10):947–59. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1800729>
24. Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2016;351(6271):403–7. <https://doi.org/10.1126/science.aad5143>
25. Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2018;362(6410):86–91. <https://doi.org/10.1126/science.aau1549>
26. Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2018;24(8):1216–24. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
27. Chandrasekaran AP, Song M, Kim KS, Ramakrishna S. Different methods of delivering CRISPR/Cas9 into cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;159:157–76. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.05.001>
28. Chen F, Alphonse M, Liu Q. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2020;12(3):e1609. <https://doi.org/10.1002/wnan.1609>
29. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release.* 2017;266:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>
30. Fu Y, Foden J, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):822–6. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
31. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4(11):e264. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
32. Davies B. The technical risks of human gene editing. *Hum Reprod.* 2019;34(11):2104–11. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez162>
33. Zuccaro MV, Xu J, Mitchell C, Marin D, Zimmerman R, Rana B, et al. Allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos. *Cell.* 2020;183(6):1650–64.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.025>
34. Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* 2013;12(4):393–4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.006>
35. Obermeier M, Vadolas J, Verhulst S, Goossens E, Baert Y. Lipofection of non-integrative CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins in male germline stem cells: a simple and effective knockout tool for germline genome engineering. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:891173. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.891173>
36. Bittlinger M, Hoffmann D, Sierawska AK, Mertz M, Schambach A, Strech D. Risk assessment in gene therapy and somatic genome-editing: An expert

- interview study. *Gene and Genome Editing*. 2022;3-4:100011.
<https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2022.100011>
37. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to *EV11* activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. 2010;16(2):198–204.
<https://doi.org/10.1038/nm.2088>
 38. Taheri-Ghahfarokhi A, Taylor BJM, Nitsch R, Lundin A, Cavallo AL, Madeyski-Bengtson K, et al. Decoding non-random mutational signatures at Cas9 targeted sites. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(16):8417–34.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky653>
 39. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*. 2018;36(8):765–71.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4192>
 40. Boroviak K, Fu B, Yang F, Doe B, Bradley A. Revealing hidden complexities of genomic rearrangements generated with Cas9. *Sci Rep*. 2017;7(1):12867.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12740-6>
 41. Yang Y, Wang L, Bell P, McMenamin D, He Z, White J, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*. 2016;34(3):334–8.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3469>
 42. Breese EH, Buechele C, Dawson C, Cleary ML, Porteus MH. Use of genome engineering to create patient specific MLL translocations in primary human hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136644.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136644>
 43. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*. 2018;24(7):927–30.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>
 44. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(2):93–115.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
 45. Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, Frias E, Ho D, Theriault K, et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*. 2018;24(7):939–46.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0050-6>
 46. Anderson KR, Haeussler M, Watanabe C, Janakiraman V, Lund J, Modrusan Z, et al. CRISPR off-target analysis in genetically engineered rats and mice. *Nat Methods*. 2018;15(7):512–4.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0011-5>
 47. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
 48. Tycko J, Myer VE, Hsu PD. Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. *Mol Cell*. 2016;63(3):355–70.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004>
 49. Kocak DD, Josephs EA, Bhandarkar V, Adkar SS, Kwon JB, Gersbach CA. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nat Biotechnol*. 2019;37(6):657–66.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0095-1>
 50. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016;351(6268):84–8.
<https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
 51. Teng F, Cui T, Feng G, Guo L, Xu K, Gao Q, et al. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov*. 2018;4:63.
<https://doi.org/10.1038/s41421-018-0069-3>
 52. Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2018;24(8):1216–24.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
 53. Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):863–8.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3609>
 54. Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2015;33(1):73–80.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3081>
 55. Shen C-C, Hsu M-N, Chang C-W, Lin M-W, Hwu J-R, Tu Y, Hu Y-C. Synthetic switch to minimize CRISPR off-target effects by self-restricting Cas9 transcription and translation. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(3):e13.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1165>
 56. Tu Z, Yang W, Yan S, Yin A, Gao J, Liu X, et al. Promoting Cas9 degradation reduces mosaic mutations in non-human primate embryos. *Sci Rep*. 2017;7:42081.
<https://doi.org/10.1038/srep42081>
 57. Hodgkins A, Farne A, Perera S, Grego T, Parry-Smith DJ, Skarnes WC, Iyer V. WGE: a CRISPR database for genome engineering. *Bioinformatics*. 2015;31(18):3078–80.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv308>
 58. Haeussler M, Schönig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaudet J-B, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol*. 2016;17(1):148.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
 59. Lessard S, Francioli L, Alfoldi J, Tardif JC, Ellinor PT, MacArthur DG, et al. Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(52):E11257–66.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1714640114>
 60. Miller NA, Farrow EG, Gibson M, Willig LK, Twist G, Yoo B, et al. A 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diseases. *Genome Med*. 2015;7:100.
<https://doi.org/10.1186/s13073-015-0221-8>
 61. Рачинская ОА, Меркулов ВА. Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества

клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):25–32.
Rachinskaya OA, Merkulov VA. Use of cytogenetic analysis methods for assessing the quality of cell

lines in biomedical cell products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):25–32. (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-25-32>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.А. Рачинская** – обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; **Е.В. Мельникова** – критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **В.А. Меркулов** – критическое обсуждение и окончательное утверждение текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **O.A. Rachinskaya** reviewed and analysed literature data and drafted the manuscript. **E.V. Melnikova** participated in the critical discussion of the manuscript and edited it. **V.A. Merkulov** participated in the critical discussion of the manuscript and approved its final version for publication.

Об авторах / Authors

Рачинская Ольга Анатольевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>
Rachinskaya@expmed.ru

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
Melnikovaev@expmed.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
Merkulov@expmed.ru

Поступила 14.04.2023

После доработки 16.06.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Olga A. Rachinskaya, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>
Rachinskaya@expmed.ru

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
Melnikovaev@expmed.ru

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
Merkulov@expmed.ru

Received 14 April 2023

Revised 16 June 2023

Accepted 13 September 2023