

# Технологии редактирования геномов

Аналитическая справка

2019

## Содержание

1. Термины «генное/ геномное редактирование»
  2. Основные существующие методы и подходы
  3. Потенциал применения методов на различных объектах
  4. Проблемы доставки/ адресность/ побочные эффекты
  5. Основные игроки на рынке
  6. Законодательство в мире, касающееся геномного редактирования, инициативы по изменению законов в РФ
  7. Существующие генотерапевтические препараты
  8. Дискуссия, которая идёт по данному поводу в мире, РФ
- Приложение А – Клинические исследования (на 2017 г) продуктов для генной терапии моногенных заболеваний печени
- Приложение Б – Технологии редактирования геномов – краткая аналитическая справка

### 1. Термины «генное/ геномное редактирование»

Редактирование генома, геномная инженерия (также называемое редактированием генов)<sup>1</sup> представляет собой группу технологий, которые дают возможность изменять ДНК организма. Эти технологии позволяют добавлять, удалять или изменять генетический материал в определенных местах генома. Редактирование генома, способно производить очень специфические изменения в последовательности ДНК живого организма, потенциально существенно изменяя его генетический состав.

Поскольку терминологические вопросы не являются принципиальными, термины «генное» и «геномное редактирование» можно считать равнозначными. В случае с «генной» и «геномной терапией», термины также могут считаться равнозначными, либо «геномная терапия» может рассматриваться как вариант «генной терапии», при котором изменяется именно ядерный геном (хромосомная ДНК). Понятие «генная терапия» шире, здесь может идти речь о модификации митохондриальной ДНК, либо модификация ДНК может отсутствовать в принципе: нужный ген может быть доставлен в виде плазмиды или матричной РНК (мРНК).

---

<sup>1</sup> <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/genomeediting>

## 2. Основные существующие методы и подходы

Существует множество методик направленного изменения сложных эукариотических геномов, однако, на практике используют несколько технологий:

- не индуцированную разрывом гомологичную рекомбинацию<sup>2</sup>
- сайт-специфичную рекомбинацию (рекомбиназы и транспозазы)<sup>3</sup>
- индуцированную сайт-специфичной нуклеазой репарацию, где в качестве нуклеазы используют:
  - искусственные (гибридные, индивидуальные) нуклеазы с доменами «цинковых пальцев» (zinc finger nucleases, ZFNs)<sup>4</sup>,
  - природные или гибридные эндонуклеазы генной конверсии или мегануклеазы (homing endonucleases, HEs)<sup>5</sup>,
  - искусственные (гибридные, «дизайнерские») нуклеазы с доменами аналогов активаторов транскрипции (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)<sup>6</sup>,
  - природные РНК-направляемые нуклеазы (RNA-guided nucleases, RGNs), в частности, CRISPR-ассоциированные нуклеазы (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9) с «дизайнерской» наводящей РНК<sup>7</sup> (данный метод набирает преимущественную популярность среди исследователей и практиков, об этом свидетельствует количество публикаций (рисунок 2)),
  - сочетания перечисленных подходов<sup>8</sup>.

Время появления новых технологий представлено на рисунке 1.

Любая из перечисленных технологий редактирования генома включает три компонента:

- ген-специфичный участок, ответственный за поиск нужного места в ДНК,
- эндонуклеаза осуществляет рестрикцию необходимого фрагмента (сшивание надреза происходит за счёт внутриклеточных систем репарации),
- модифицирующая последовательность (нужна в случае, если необходимо добавить или заменить фрагмент генома)

<sup>2</sup> Tang H et. al. *EMBO Mol Med.* 2016, 8(2): 83–5

<sup>3</sup> O'Gorman S. et. al., *Science.* 1991, 251 (4999): 1351–5; Karow M. et. al. *Expert Opin Biol Ther.* 2011, 11(10): 1287–96

<sup>4</sup> Pabo CO et. al. *Annu. Rev Biochem.*, 2001, 70: 313-40; Maeder ML et al. *Mol Cell.* 2008, 31(2): 294-301; Carroll D. *Genetics.* 2011, 188(4): 773-82

<sup>5</sup> Epinat JC. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31(11): 2952-62

<sup>6</sup> Boch J. *Nat Biotechnol.* 2011, 29(2): 135-6

<sup>7</sup> Mali P et. al. *Nat Methods.* 2013, 10(10): 957-63

<sup>8</sup> Boissel S, et al. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42 (4): 2591-601; Certo MT et al. *Nat Methods.* 2012, 9(10): 973–5; Delacôte F. et. al. *PLoS One.* 2013, 8(1): e53217

На сегодняшний день наиболее перспективными являются подходы, основанные на использовании искусственных (гибридных, или индивидуальных) сайт-специфичных нуклеаз: ZFNs, TALENs и CRISPR/Cas9 (таблица 1).



Рисунок 1 – Хронология развития технологий геномного редактирования<sup>9</sup>

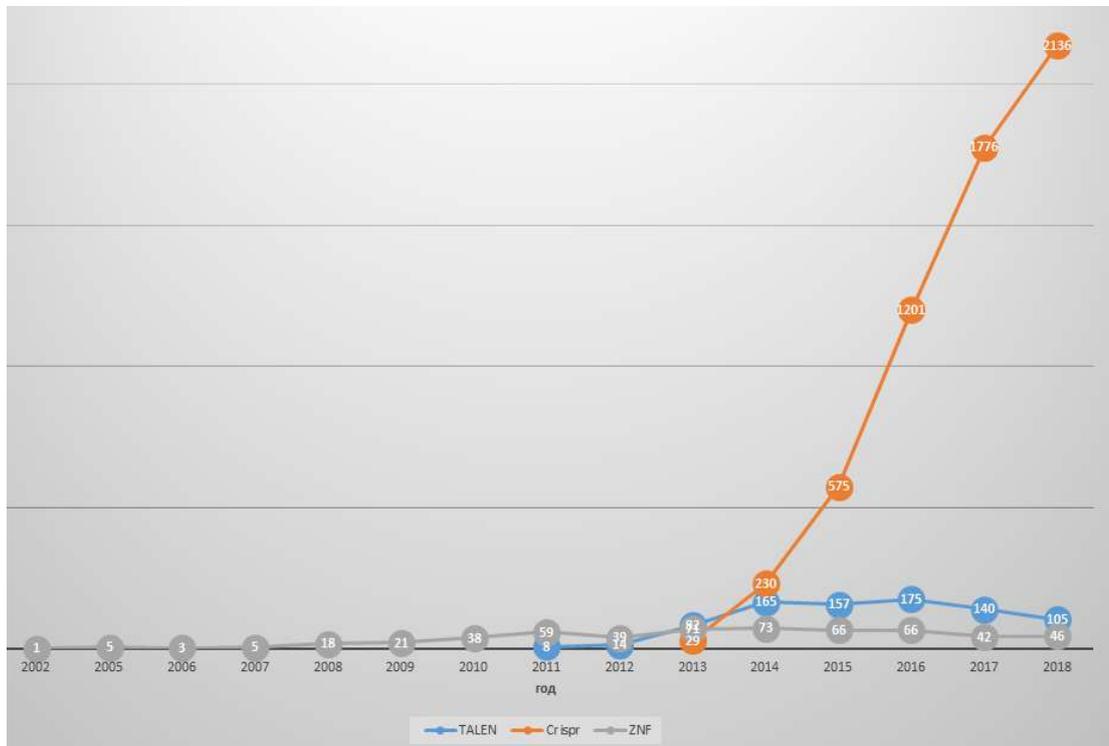


Рисунок 2 – Количество публикаций основных технологий геномного редактирования

<sup>9</sup> Doudna JA et. al. *Science*. 2014, 346(6213): 1258096; Ребриков Д. Вестник РГМУ, 2016, 3, 1-17

Таблица 1 – Особенности наиболее перспективных подходов редактирования геномов

Технология	Ограничения	Ген-специфичный участок	Эндонуклеаза	Двухцепочечный разрыв обеспечивает:
ZFNs	Практически нет	3–6 белковых домена типа «цинковый палец»	Неспецифичная к последовательности эндонуклеаза (например FokI)	Искусственный гетеродимер
HEs	Ограниченный набор сайтов	Мегануклеаза	Мегануклеаза	естественный зеркальный мономер или гомодимер
TALEN	Практически нет	12–20 белковых доменов от «активаторов транскрипции»	Неспецифичная к последовательности эндонуклеаза (например FokI)	Искусственный гетеродимер
RGNs (CRISPR/Cas9)	Нет	РНК длиной около 40 нуклеотидов	Нуклеаза Cas9 естественный	мономер

В основе метода ZFNs («цинковые пальцы») лежат небольшие домены, стабилизированные одним или несколькими ионами цинка, способные эффективно и довольно специфично связывать ДНК, РНК, белки и липиды<sup>10</sup>. Один «цинковый палец» специфично связывает триплет нуклеотидов. Объединение 3-6 «цинковых пальцев» в один белок даёт возможность точно распознать последовательность ДНК в 9-18 п.о. В совокупности с эндонуклеазой (используют неспецифичный к последовательности и вносящий одноцепочечный разрыв каталитический домен нуклеазы FokI из *Flavobacterium okeanoikoites*), система позволяет осуществлять точечные разрывы нити ДНК. Для получения двухцепочечного разрыва создают комплекс из 2-х ферментов (рисунок). Преимущество метода – универсальность; недостатки – высокая сложность генно-инженерной сборки, токсичность, иммуногенность. Использование ZNFs постепенно прекращается.

Метод HEs (рисунок) основан на использовании мегануклеаз (найлены у архей, бактерий, фагов, дрожжей, водорослей и некоторых растений) – небольшие белки, зеркальные мономеры или гомодимеры с очень длинным сайтом распознавания последовательности двухцепочечной ДНК (10-40 п.о.). Преимущество метода – высокая сайт-специфичность и самопроизвольная сборка димера. Недостаток – крайняя ограниченность выбора сайта воздействия.

В основе технологии TALEN лежит способность белка TALE узнавать определенный сайт в ДНК за счет серии небольших доменов, каждый из которых узнает

<sup>10</sup> Kim YG et. al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93(3): 1156–60

один-единственный нуклеотид в последовательности сайта. Для редактирования определённых участков генома используют нуклеотид-специфичные домены, соединённые в серии по 12–20 штук. В остальном технология аналогична ZNFs (рисунок), включая преимущества и недостатки.

В системе CRISPR/Cas9 (рисунок 3) в качестве сайт-специфического компонента выступает молекула РНК (single guide RNA, sgRNA) длиной около 40 нуклеотидов, состоящая из двух частей: собственно наводящей crRNA и адаптерной (трансактивационной) tracrRNA. Последовательность РНК можно менять без потери нуклеазной активности фермента Cas9. На данный момент система CRISPR/Cas9 является наиболее перспективным инструментом редактирования. Достоинства метода: универсальность, отсутствие необходимости в генно-инженерной сборке фермента, способность нуклеазы Cas9 разрезать обе цепи ДНК, возможность встроить генетический материал для замены в РНК. Недостаток – потенциальная иммуногенность чужеродного белка.

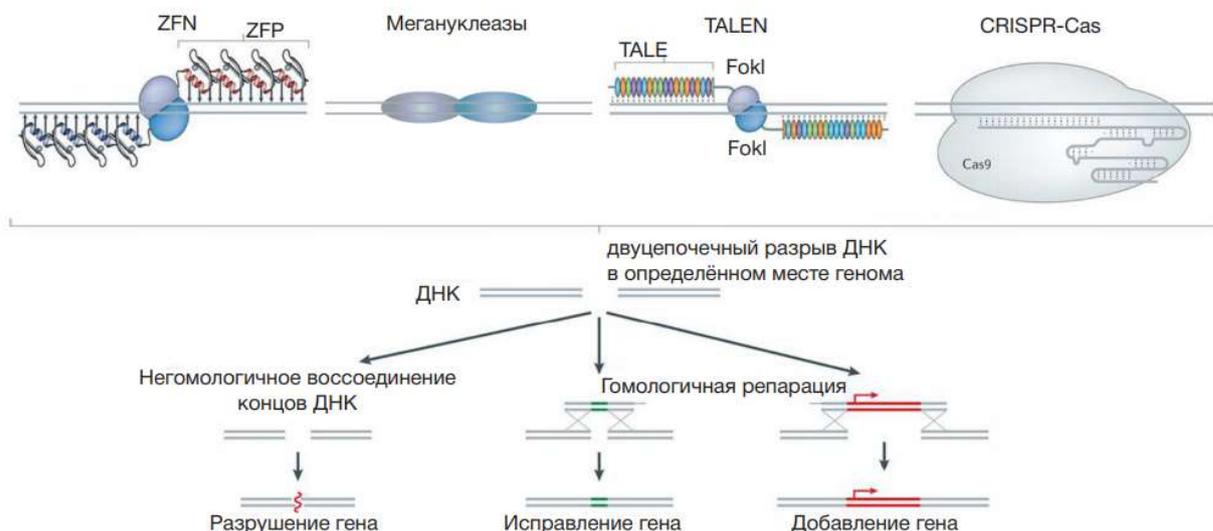


Рисунок 3 – Схема геномного редактирования на основе гибридных нуклеаз с «цинковыми пальцами», мегануклеаз, гибридных нуклеаз с TALE и CRISPR/Cas9<sup>11</sup>

### 3. Потенциал применения методов на различных объектах

Генную терапию условно можно разделить на три группы:

- фетальная генотерапия (модификация генома гамет/зиготы/бластомеров – получение целого организма из одной измененной клетки);
- клеточная соматическая генотерапия (модификация генома отдельных соматических клеток с целью последующего возврата в организм клеток с изменённым геномом);
- тканевая соматическая генотерапия (модификация генома отдельных групп (или всех) соматических клеток непосредственно в многоклеточном организме).

<sup>11</sup> Ребриков Д. Вестник РГМУ, 2016, 3, 1-17

Следует отметить, что методы генной терапии (не геномной) используют с начала 1990-х гг., они позволяют восстановить синтез белка, ген которого нефункционален в обеих копиях на хромосоме. При этом изменение (или удаление) участков ДНК непосредственно в структуре хромосомы только недавно начало входить в практику. На сегодняшний день предложены варианты лечения пигментного ретинита, глаукомы, гемоглинопатий, мышечных дистрофий (таблица).

Наиболее активно развивается фетальное направление для целей редактирования геномов в случае, если у пары индивидов не может быть отобран эмбрион с потенциально здоровым генотипом. В 2015-2016 гг. о своих планах по модификации геномов человеческих эмбрионов при помощи технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 заявило множество лабораторий в США, Китае, Великобритании и ряде других стран, а также несколько биотехнологических компаний: Ovascience (США), Editas Medicine (США) и др.<sup>12</sup>

В 2015 г. в Китае при помощи системы CRISPR/Cas9 на уровне зиготы восстановили мутантный ген бета-глобина. Из 86 взятых в эксперимент зигот восстановление произошло в 4-х случаях<sup>13</sup>.

Описано применение системы CRISPR/Cas9 для борьбы с вирусом гепатита В<sup>14</sup>.

Предложены варианты использования системы CRISPR/Cas9 для лечения саркомы, рака легких<sup>15</sup> (вариант исправления или удаления мутантного варианта гена EGFR при помощи доставляемой вирусом системы CRISPR/Cas9).

В перспективе развитие технологий позволит вносить направленные изменения в геномы организмов, придавая им необходимые элементы фенотипа, например, увеличивать силу или выносливость. Применение данных технологий приводит к возникновению многих этических вопросов, которые предстоит решить.

Примеры заболеваний, для лечения которых используют геномное редактирование на основе нуклеаз приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Примеры заболеваний, для лечения которых используют геномное редактирование на основе нуклеаз<sup>16</sup>

Область действия	Принципы	Методы
Наследственные заболевания глаз	Разрушение гена	TALENs, CRISPR/Cas9
Гемоглинопатии (серповидноклеточная анемия, β-талассемия)	Вставка рабочего гена β-глобина	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9

<sup>12</sup> Ребриков Д. Вестник РГМУ, 2016, 3, 1-17

<sup>13</sup> Liang P et al. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72

<sup>14</sup> Zhu W et. al. *Virus Res*. 2016, 217: 125–32

<sup>15</sup> Liu T et. al. *Cancer Lett*. 2016, 373 (1): 109–18; Tang H, Shrager JB. *EMBO Mol Med*. 2016, 8(2): 83–5

<sup>16</sup> Ребриков Д. Вестник РГМУ, 2016, 3, 1-17

Мышечные дистрофии	Вставка рабочего гена дистрофина или удаление «плохого» экзона в имеющемся гене	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9
Онкология	Удаление или исправление мутантного варианта гена	TALENs, CRISPR/Cas9
ВИЧ	Вырезание копии ДНК вируса из генома человека или удаление гена рецептора, через который вирус проникает в клетку	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9
Вирус гепатита В	Уничтожение генома вируса	CRISPR/Cas9
Генетический допинг	Добавление требуемого аллеля гена	TALENs, CRISPR/Cas9
Репрогенетика	Все виды изменений	TALENs, CRISPR/Cas9

#### 4. Проблемы доставки/ адресность/ побочные эффекты

Доставка в клетку генетического материала, как правило, происходит в виде генно-инженерных конструкций, в составе которых присутствует сигнал ядерной локализации, сайт-специфический белок, нуклеаза, генетический материал (для замены). Вектор экспрессируется собственными клеточными системами.

Средства доставки могут различаться: вирусные (системы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и вируса простого герпеса) и невирусные системы (электропорация, липосомы, катионные полимеры и др.).

В области разработки средств адресной доставки наблюдаются определённые успехи. На рисунке 4 представлена эффективность различных методов геномного редактирования в сочетании со средствами доставки. Так, методы CRISPR/Cas9, TALEN и ZNFs в сочетании с гидродинамическими инъекциями и доставкой с использованием аденоассоциированными вирусами имеют эффективность до 70%.

Основным побочным эффектом геномного редактирования является возникновение нецелевых модификаций ДНК (off-target genome editing). Проблема заключается в недостаточной специфичности белка Cas9, а также в природе продукта CRISPR, молекулы-гида – это короткие РНК (sgRNA). Хорошо известно, что таргетирование по принципу комплементарности имеет недостаток в виде побочных продуктов от связывания исследовательского олигонуклеотида с последовательностями, похожими на целевую. Каждая из нецелевых мишеней взаимодействует с CRISPR РНК хуже, чем основная, однако учитывая размер человеческого генома и его разнообразие, избежать образование off-target продуктов представляется затруднительным. В случае с ПЦР или эндонуклеазами рестрикции *in vitro* эта проблема решается специальным этапом ферментативной очистки, но такой метод неприменим при работе с развивающимся живым организмом. В данный момент ведутся активные исследования разнообразия CRISPR/Cas систем, например, в 2017 году было предсказано и затем экспериментально подтверждено существование несколько

новых подтипов<sup>17</sup>. Среди неизвестных сейчас систем могут оказаться такие, которые перспективны с практической точки зрения и свободны от недостатков систем на основе Cas9. Также совершенствуются методы математического моделирования спейсеров CRISPR, что позволяет повысить специфичность технологии.

Disease	Type of genetic alteration	Gene editing treatment	Gene editing platform employed (preclinical)	Delivery method (preclinical)	Efficiency (preclinical)	Therapeutic threshold (preclinical)
Haemophilia	Loss of function mutations in <i>Factor IX</i>	Correction or integration of <i>Factor IX</i> through HDR	ZFNs	AAVs	7%	Yes (>1%)
Tyrosinemia	Loss of function mutations in <i>FAH</i>	Correction or integration of through HDR	CRISPR/Cas9	Hydrodynamic injections; or viral and lipid particles	0.4–6%	Yes
Alpha 1 antitrypsin deficiency	Loss of function mutations in <i>SERPINA1</i>	Correction or integration of <i>SERPINA1</i> through HDR				
Hemochromatosis	Loss of function mutations in <i>HFE</i>	Correction or integration of <i>HFE</i> through HDR				
Wilson disease	Loss of function mutations in <i>ATP7B</i>	Correction or integration of <i>ATP7B</i> through HDR				
Hypercholesterolemia	Gain of function mutations in <i>PCSK9</i>	Correction or deletion of <i>ATP7B</i> through HDR and NHEJ, respectively.	CRISPR/Cas9	AAVs	50%	Yes
Hepatitis B infection	Exogenous DNA	Deletion or mutation of viral DNA through NHEJ	CRISPR/Cas9, TALENs, ZFNs	Hydrodynamic injections; AAVs	27%–70%	Yes

Рисунок 4 – Эффективность различных методов геномного редактирования в сочетании со средствами доставки<sup>18</sup>.

Доставка системы генного редактирования может считаться успешной при соблюдении следующих условий:

- высокая эффективность редактирования;
- система не должна встраиваться в геном клетки-хозяина и длительно в нём присутствовать, чтобы не вызывать иммунный ответ;
- количество нецелевых продуктов должно быть минимальным;
- способ доставки должен быть воспроизводим.

Доставка с помощью аденовирусов высокоэффективна и практически не встраивается в геном хозяина. Однако такой способ может вызывать сильный иммунный ответ, а также развитие аутоиммунных заболеваний. Другой вирусный носитель – аденоассоциированные вирусы, не обладает столь выраженной иммуногенностью, однако его эффективность несколько ниже<sup>19</sup>. Для вирусных векторов в целом характерен высокий

<sup>17</sup> Shmakov S et al. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Mar;15(3):169-182

<sup>18</sup> M. Galarreta, *J Hepatology*, 2017, 67, 818-828

<sup>19</sup> Nelson CE et al. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2016 Jun 7; 7():637-62

уровень инсерционного мутагенеза, приводящего к канцерогенезу. Более новыми и безопасными методами являются: гидродинамические инъекции плазмид и одноцепочечных ДНК<sup>20</sup>, а также рибонуклеопротеиновых комплексов<sup>21</sup> и липидных наночастиц<sup>22</sup>.

Относительно иммунного ответа клетки на введение редактирующей системы существует множество противоречивых данных. Поскольку белок Cas9 бактериальной природы, он естественным образом активирует МНС-I опосредованную реакцию. Показано, что иммунитет может реагировать даже не на вирусный вектор, а именно на редактирующую каспазу<sup>23</sup>. В связи с этим, рибонуклеопротеиновые комплексы представляются наиболее перспективными способами доставки, поскольку быстро деградируют в клетке и обладают низкой иммуногенностью.

Важным критерием при выборе средства доставки является возможность вместить достаточно большие по размерам фермент Cas9 или кодирующую его мРНК, а также одну или несколько гидовых РНК. Зачастую компоненты системы вынужденно распределены по нескольким агентам доставки, что снижает эффективность редактирования<sup>24</sup>.

Ещё одной проблемой, с которой сталкиваются исследователи при дизайне рибонуклеопротеиновых носителей являются свойства этих супрамолекулярных систем. Белок Cas9 обладает положительным зарядом, в то время как гидовые РНК – отрицательным. Существенную роль играет количество CRISPR-продуктов, а также наличие или отсутствие замещающей одноцепочечной ДНК. Существуют химерные белки Cas9, электростатически напоминающих РНК, однако их эффективность *in vivo* пока не показана<sup>25</sup>.

По сравнению с результатами, полученными *in vitro*, эффективность геномного редактирования в животных моделях не столь высока. К примеру, относительно гидродинамических инъекций максимальная показанная эффективность 1:250 клеток<sup>26</sup>. В целом, эффект CRISPR/Cas систем варьируется от 20 до 80%, в то время как для терапии многих заболеваний необходим 100%-ое действие. Эффективность редактирования во многом зависит от эффективности системы доставки, а этот параметр, к сожалению, редко указывается в публикуемых исследованиях.

Важной проблемой является необходимость системного введения генно-терапевтических препаратов. При внутримышечных или внутривенных инъекциях добиться необходимого уровня специфичности крайне затруднительно, кроме того, возрастает риск побочных эффектов. С этой точки зрения, применение геномного редактирования наиболее безопасно именно на ранних стадиях эмбрионального развития. Ещё одним доводом в пользу раннего вмешательства служит тот факт, что иммунный ответ

---

<sup>20</sup> Latella MC et al. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016 Nov 22; 5(11):e389

<sup>21</sup> Ran Y, Liang Z, Gao C. *Sci China Life Sci*. 2017; 60(5):490-505

<sup>22</sup> J. Finn et al. *Cell reports*, 2018, 22(9): 2227-2235

<sup>23</sup> Chew WL et al. *Nat Methods*. 2016, 13(10):868-74

<sup>24</sup> Liao HK et al. *Cell*. 2017,171(7):1495-1507.e15

<sup>25</sup> Mout R et al. *ACS Nano*. 2017, 11(3):2452-2458

<sup>26</sup> Yin H et al. *Nat Biotechnol*. 2014, 32(6):551-3

организма может быть направлен на элиминацию клеток, подвергшихся действию бактериальных ферментов, а это, в свою очередь, делает генную терапию безрезультатной.

Одним из недавно выявленных побочных эффектов геномного редактирования является активация сигналинга p53 в ответ на повреждение ДНК. Этот защитный механизм существенно снижает эффективность CRISPR/Cas<sup>27</sup>.

Дискуссионным остается вопрос относительно эпигенетических изменений, сопровождающих геномное редактирование. Такие инструменты как цинковые пальцы или TALEN обладают свойствами транскрипционных факторов: связываясь с целевыми участками ДНК, они могут изменять уровень экспрессии соответствующих генов. Плохо изучено влияние точечных нуклеотидных модификаций на паттерн метилирования и на структуру хроматина. Учитывая необходимость разрушения ковалентных связей для редактирования, повышается вероятность образования неканонических структур ДНК. В целом, на текущий момент нет уверенности, что вносимые изменения не запускают долгосрочных необратимых эпигенетических изменений, которые в итоге могут привести к развитию новых патологий.

## 5. Основные игроки на рынке

Во многих ведущих фармацевтических компаниях мира считают, что в будущем геномное редактирование станет главным инструментом здравоохранения. Согласно некоторым прогнозам, в ближайшие пять лет глобальный рынок геномного редактирования вырастет вдвое и достигнет объема в 6,28 миллиарда долларов<sup>28</sup>.

В начале этого года британское правительство объявило о том, что инвестирует 60 млн фунтов стерлингов (76 млн долларов) в создание центра клеточной и генной терапии, чтобы ускорить создание новых методов лечения.

Большинство мелких компаний генной терапии делают это в партнерстве с гигантами фармацевтического рынка, такими как Bayer, GlaxoSmithKline, Pfizer, Merck и Novartis (и часто на их деньги). Ниже приведены несколько компаний, занимающихся исследованием и внедрением в практику методов геномного и геномного редактирования (рисунок 5).

**Intellia Therapeutics** (2014 г., Массачусетс, США, публичная, NASDAQ: NTLA) разрабатывает методы геномного редактирования на основе технологии CRISPR-Cas9. Партнёры – Novartis и Regeneron.

**Editas Medicine** (Массачусетс, США) (публичная, NASDAQ: EDIT), основана в 2013 году, специализируется на разработке методов лечения на основе технологий редактирования генов CRISPR-Cas9 и CRISPR/Cpf1 (или Cas12a). Разработки компании представлены на рисунке 6.

Компания сотрудничает с Allergan Pharmaceuticals Int. Ltd (стратегическое партнёрство с 2017 года). 30 октября 2018 года FDA приняло приложение EDIT-101 – новый

<sup>27</sup> Naapaniemi, E. et. al. *Nat. Med.* 2018, 24, 927–930

<sup>28</sup> <https://www.bbc.com/russian/vert-cap-46289151>

препарат на основе технологии CRISPR-Cas9, предназначенный для лечения Амавроза Лебера (ухудшение или полная потеря зрения, МКБ-10 – H53.0)<sup>29</sup>.

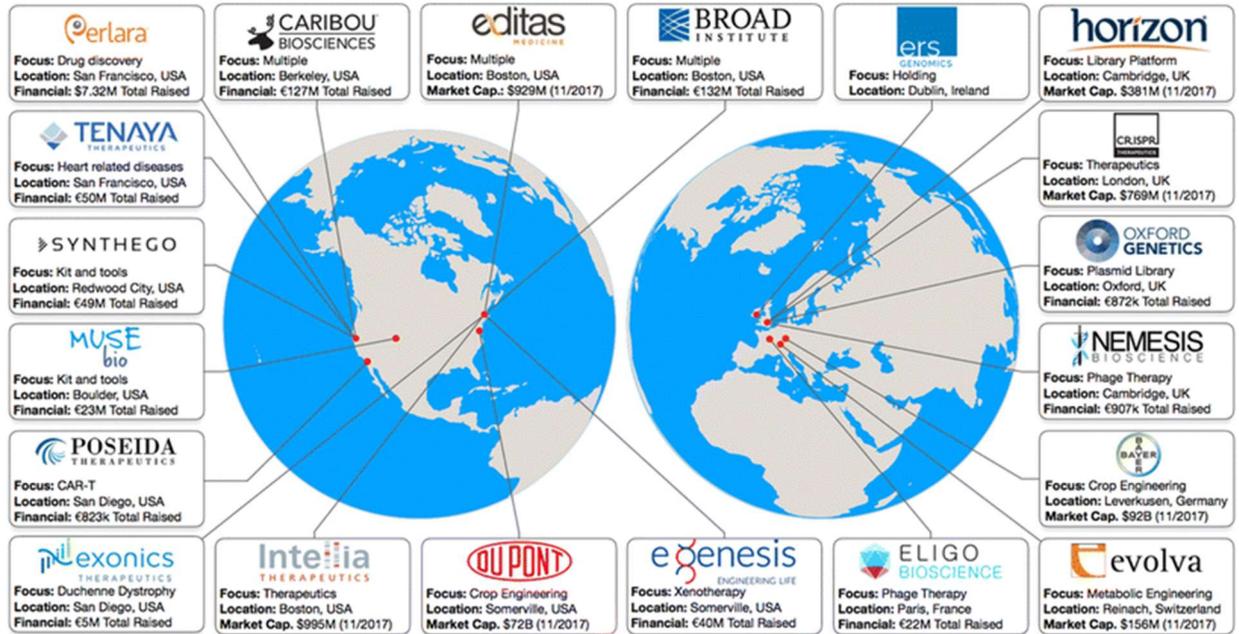


Рисунок 5 – Основные игроки на рынке редактирования геномов<sup>30</sup>

Our Programs	Editing Mechanism	Delivery Mode	Commercial Rights	Discovery
<b>Eye Diseases</b>				
Leber Congenital Amaurosis 10	NHEJ - Small Deletion	AAV local injection	editas	→
Genetic and Infectious Disease(s) of Eye <i>Usher Syndrome 2a, HSV-1</i>	NHEJ	AAV local injection	editas	→
<b>Engineered T Cells</b>				
Gene Editing in T Cells to Treat Cancer	NHEJ	RNP ex vivo	juno	→
<b>Additional Research Programs</b>				
Non-Malignant Hematologic Diseases <i>Beta Thalassemia, Sickle Cell</i>	NHEJ & HDR	RNP ex vivo	editas	→
Genetic Disease(s) of Muscle <i>Duchenne Muscular Dystrophy</i>	NHEJ - Small & Large Deletion	AAV or LNP	editas	→
Genetic Disease(s) of Lung <i>Cystic Fibrosis</i>	NHEJ & HDR	AAV or LNP	editas	→
Genetic and Infectious Disease(s) of Liver <i>Alpha-1 Antitrypsin Deficiency</i>	NHEJ & HDR	AAV or LNP	editas	→

Рисунок 6 – Разработки компании Editas, указаны: тип патологий, механизм редактирования, средства доставки, коммерческие права).

<sup>29</sup> <http://ir.editasmedicine.com/news-releases/news-release-details/editas-medicine-announces-fda-acceptance-ind-application-edit>

<sup>30</sup> R. Ferreira et. al. J Ind Microbiol Biotechnol. 2018, 45(7), 467-480

**Sangamo Therapeutics (Калифорния, США)** (публичная, NASDAQ: SGMO), основана в 1995 году, специализируется на генной, геномной и клеточной терапии, а также регуляции генов. По данным компании, указанными методами вылечено 109 человек<sup>31</sup>. Продукты компании в различных стадиях разработки представлены на рисунке 7. Методы геномной терапии разрабатываются для лечения мукополисахаридоза I и II типов (синдром Гурлера<sup>32</sup>, синдром Хантера<sup>33</sup>), гемофилии<sup>34</sup>.

Компания проводит активные клинические исследования препаратов, предназначенных для генной терапии моногенных заболеваний печени (таблица в приложении 1).



Рисунок 7 – Продукты компании в различных стадиях разработки<sup>35</sup>.

Компания разрабатывает новую платформу (ZNF 2.0, согласно пресс-релизу, в 20 раз более активную, по сравнению с существующей) на основе технологии геномного редактирования ZNFs и доставки генетического материала с использованием аденоассоциированных вирусов и мРНК.

Дочернии компании – в Великобритании (Sangamo Therapeutics UK Ltd., бывшая Gendaq Ltd., 1999-2018 гг.) и Франции (TxCell).

<sup>31</sup> По состоянию на декабрь 2018 года

<sup>32</sup> <https://www.sangamo.com/patients/mps-i-ii>

<sup>33</sup> <https://www.bbc.com/russian/vert-cap-46289151>

<sup>34</sup> <https://www.sangamo.com/patients/hemophilia>

<sup>35</sup> [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)

TxCell – публичная компания, разрабатывает методы иммунотерапии на основе технологии CAR-T для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний (болезнь Крона, язвенный колит, ревматоидный артрит, множественный склероз и др.).

## **6. Законодательство в мире, касающееся геномного редактирования, инициативы по изменению законов в РФ**

Хотя в целом вмешательство в геном человека в мире не приветствуется, началась международная гонка, направленная на широкое распространение в клинической медицине редактирования человеческого генома<sup>36</sup>. «Национальный фонд» и «Национальный институт здоровья» 23 января начал свою программу по редактированию соматических клеток, выделив в течение следующих 6 лет около 190 млн. долл. США на финансирование развития данной тематики в практической медицине.

В Китае к настоящему моменту 86 пациентов уже изменили свои гены в рамках клинических испытаний для лечения ряда заболеваний, включая онкологические. Выводы из этих исследований еще не сообщаются в рецензируемых журналах. Серьезная критика подобных исследований в Китае не приветствуется (негласное правило) с целью ускоренного развития технологий без существенного пересмотра нормативных актов.

Заявки на первые клинические испытания в области редактирования генома человека в США и Европе были поданы соответственно в FDA и Европейское агентство по лекарственным средствам, чтобы начать набор пациентов. Первоначально планировалось начать испытания в 2016 году, этим исследованиям, частично, мешали проблемы регулирования и безопасности.

### *Нормативная база, касающаяся редактирования генов*

Поскольку согласованная международная нормативная база, касающаяся редактирования генов отсутствует<sup>37</sup>, каждая страна находится в процессе оценки того, соответствуют ли действующие нормативные акты исследованиям, а также приложениям и продуктам, связанным с редактированием генов, и в какой степени. Известна, однако, “Конвенция о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины”, принятая европейскими странами в 1997 году, ст. 13 которой запрещает внесение изменений в геном, которые могут быть переданы по наследству<sup>38</sup>.

Общая тема: большинство стран пытаются оценить, может ли редактирование генов быть или не быть отличным от классической геномной инженерии – как с точки зрения исследований, приложений, так и с точки зрения продукта. Наиболее спорные области дебатов, похоже, вращаются вокруг генетически модифицированных сельскохозяйственных и пищевых продуктов: должны ли они регулироваться иначе, чем генетически модифицированные организмы.

Спорные и нерешенные дебаты также окружают редактирование зародышевой линии человека. Некоторые страны, в том числе Соединенные Штаты, ещё не ввели каких-

<sup>36</sup> [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(18\)30153-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(18)30153-3/fulltext)

<sup>37</sup> <https://thebulletin.org/2018/06/crispr-goes-global-a-snapshot-of-rules-policies-and-attitudes/>

<sup>38</sup> <http://hrlibrary.umn.edu/russian/euro/Rz37.html>

либо правил по редактированию генов<sup>39</sup>, в то время как Европейский суд в конце июля 2018 года постановил, что изменение живых существ с использованием технологий редактирования генома, включая простое устранение функций генов, следует считать генной инженерией и соответствующим образом регулироваться<sup>40</sup>. В отношении растений, американский регулятор не предполагает какого-либо ужесточения законодательства<sup>41</sup>.

В ответ на растущую обеспокоенность по поводу возможных последствий редактирования генов, новая «всеобъемлющая инновационная стратегия» правительства Японии, которая была официально одобрена Кабинетом министров в июне, требует уточнения правового статуса и трактовки продуктов с отредактированным геномом к концу марта 2019<sup>42</sup>.

На сегодняшний день, на «Федеральном портале проектов нормативных правовых актов» <http://regulation.gov.ru/projects> нами не было найдено ни одной инициативы по ключевым словам геномное/генетическое редактирование в Российской Федерации.

#### Законодательство в области редактирования гамет и эмбрионов

В настоящее время общественность и государства рассматривают перспективы либерализации законодательства в области редактирования гамет и эмбрионов, поскольку это сулит большие перспективы в области медицины.

Например, ранее в Канаде редактирование гамет и эмбрионов было запрещено<sup>43</sup>, сейчас наблюдаются движения в сторону либерализации данного правила.

В Германии работа с эмбрионами всегда вызывало дебаты и сейчас весьма ограничено благодаря «Акту о защите эмбрионов<sup>44</sup>», принятому в 1990 г.<sup>45</sup>. Закон запрещает выращивание и использование эмбрионов для фундаментальных исследований, а также запрещает сбор эмбриональных клеток. Тем не менее, Закон о защите эмбрионов не предусматривает явной защиты эмбрионов, которые не являются жизнеспособными. Поэтому юридический объем «прав» нежизнеспособных эмбрионов в экспериментах по редактированию генома в Германии остается неясным.

Закон Южной Кореи о биоэтике и биобезопасности запрещает генетическое экспериментирование и модификацию человеческих эмбрионов, в то время как в Законе об уведомлении запрещается использование любого продукта, который изменяет гены. Эти законы ограничивают то, что южнокорейские ученые могут делать с точки зрения исследований на людях и клинических испытаний с участием эмбрионов человека<sup>46</sup>.

В некоторых странах исследования по редактированию генов подчиняются не только формальным правилам, но и различным механизмам местного контроля. В Китае этический комитет больницы подписал протокол клинического исследования, связанного с

<sup>39</sup>Скорее США придерживаются моратория на редактирования генома зародышевых клеток

<sup>40</sup> <https://www.sciencemag.org/news/2018/07/european-court-ruling-raises-hurdles-crispr-crops>

<sup>41</sup> <https://www.usda.gov/media/press-releases/2018/03/28/secretary-perdue-issues-usda-statement-plant-breeding-innovation>

<sup>42</sup> <http://www.asahi.com/ajw/articles/AJ201808210024.html>

<sup>43</sup> <http://www.cihir-irsc.gc.ca/e/50158.html>

<sup>44</sup> <http://www.ethikrat.org/dateien/pdf/trilaterales-treffen-21-10-2016-merkel.pdf>

<sup>45</sup> <https://www.ethikrat.org/en/topics/medizin-und-gesundheit/interventions-in-the-human-germline/>

<sup>46</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5651701/>

редактированием генов онкологических пациентов, без полного понимания природы эксперимента. Клинические испытания, такие как это, не требовали национального одобрения<sup>47</sup>.

Вариации в регуляторике для редактирования генов внутри и между странами вызвали обеспокоенность по поводу слабого этического контроля в клинических испытаниях и опасных формах *«Crispr tourism»*.



Рисунок 8 – Общий законодательный климат в мире, касающийся редактирования геномов

<sup>47</sup> <https://www.wsj.com/articles/china-unhampered-by-rules-races-ahead-in-gene-editing-trials-1516562360>

Изменение политического климата также может повлиять на исследование по редактированию генов. Это наиболее заметно в Соединенном Королевстве, чье управление по вопросам оплодотворения и эмбриологии человека (законодательный орган) регулирует исследования эмбрионов человека и оплодотворение *in vitro*. В 2016 году Орган утвердил заявку на использование Crispr в исследованиях на эмбрионах человека. Выход Великобритании из Европейского союза был истолкован некоторыми как создание возможности снять ограничения на исследования по редактированию генов и поддержать инновации в области биотехнологий в Великобритании<sup>48</sup>.

Ниже приведена карта<sup>49</sup>, показывающая общий законодательный климат в отношении детей, полученных с применением геномного редактирования. Авторы<sup>50</sup> выделяют в целом запретительный уклон на редактирование эмбрионов исходя из строгого запрета (Канада, Индия, Франция), через запрет в рекомендациях (Китай, Индия, Ирландия и Япония), до неопределённого отношения (Исландия, Перу).

Один из основных этических вопросов, связанных с модификацией генома нерожждённых детей – невозможность получения информированного согласия от всех поколений людей, полученных в результате данной процедуры. Другая сторона вопроса состоит в ограниченных возможностях в помощи детям, способных пострадать в результате данной процедуры.

## 7. Существующие генотерапевтические препараты

С 1989 по 2016 г. в мире было выполнено более 2300 клинических исследований генотерапевтических препаратов<sup>51</sup>. К настоящему моменту существуют более или менее эффективные подходы к генной терапии свыше 50 генетически детерминированных заболеваний человека: первичных комбинированных иммунодефицитов<sup>52</sup>, гемофилии<sup>53</sup>,

<sup>48</sup> <https://www.nature.com/news/uk-scientists-gain-licence-to-edit-genes-in-human-embryos-1.19270>

<sup>49</sup> <https://www.nature.com/news/where-in-the-world-could-the-first-crispr-baby-be-born-1.18542>

<sup>50</sup> <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-12-108>

<sup>51</sup> Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database [Internet]. John Wiley and Sons Ltd. provided by the Journal of Gene Medicine. c2016 – [updated 2016 Feb; cited 2016 Jun]. Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

<sup>52</sup> De Ravin SS et al. *Sci Transl Med*. 2016; 8 (335): 335ra57

<sup>53</sup> Ward P et al. *Expert Rev Hematol*. 2016 May 26: 1–11; Swystun LL et al. *Circ Res*. 2016 Apr 29; 118 (9): 1443–52

гемоглобинопатий<sup>54</sup>, кистозного фиброза<sup>55</sup>, ахроматопсии<sup>56</sup>, амавроза Лебера<sup>57</sup>, эпилепсии<sup>58</sup>, остеоартрита<sup>59</sup>, болезни Паркинсона<sup>60</sup>, онкологических заболеваний<sup>61</sup>.

В таблице (приложение 1) приведены препараты для генной терапии моногенных заболеваний печени, проходящие клинические испытания.

## 8. Дискуссия, которая идёт по данному поводу в мире, РФ

«Через 20 лет химиотерапия уйдет в прошлое, – уверен глава Wellcome Trust Sanger Institute, профессор Джереми Фаррер. – Мы будем оглядываться на сегодняшние методы лечения рака и ужасаться им. Равно как сегодня ужасаемся примерам лечения электричеством в начале прошлого века. Генетика – главное подспорье медицины в будущем. Редкие врожденные пороки, рак и даже инфекции мы будем лечить, используя геномную терапию»<sup>62</sup>.

Среди научного и медицинского сообщества активно обсуждаются следующие вопросы применения технологий геномного и геномного редактирования:

- оценка рисков<sup>63</sup>
- невозможность стандартизации процедуры<sup>64</sup>
- готовность (её нет) внедрения в клиническую практику<sup>65</sup>
- консенсус (его нет) генетиков для консультирования пациентов<sup>66</sup>
- границы редактирования<sup>67</sup>
- качество процедуры<sup>68</sup>
- наблюдение за последующими поколениями<sup>69</sup>
- степень конфиденциальности и гражданские права<sup>70</sup>

<sup>54</sup> Liang P et al. *Protein Cell*. 2015, 6 (5): 363–72; Canver MC et al. 2016, 127 (21): 2536–45; Cottle RN et al. *Hum Genet*. 2016, 135(9):993–1010; Tasan I et al. *Hum Genet*. 2016, 135(9):1011–28; Osborn MJ et al. *Int J Hematol*. 2016, 104(1):18–28; Yang Y et al. *Stem Cells Transl Med*. 2016, 5 (1): 8–19; Smith EC et al. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(R2): R99–R105

<sup>55</sup> Lee TW et al. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016, 17(6):CD005599; Alton EW et al. *Lancet Respir Med.*, 2015, 3(9): 684–91

<sup>56</sup> Ye GJ et al. *Hum Gene Ther*. 2016, 27 (1): 72–82

<sup>57</sup> Maguire AM et al. *N Engl J Med*. 2008, 358 (21): 2240–8; Bainbridge JWB et al. *N Engl J Med*. 2008; 358 (21): 2231–9

<sup>58</sup> Walker MC et al. *Epilepsia*. 2013, 54 Suppl 6: 43–5

<sup>59</sup> Giuncamp C et al. *Joint Bone Spine*. 2000, 67 (6): 570–1; Evans CH et al. *Gene Ther*. 2004 Feb; 11 (4): 379–89

<sup>60</sup> Carlsson T et al. *Brain*. 2005, 128 (Pt 3): 559–69; Forsayeth J. *Expert Rev Neurother*. 2010, 10 (12): 1839–45; Palfi S et al. *Lancet*. 2014, 383 (9923): 1138–46

<sup>61</sup> Cross D et al. *Clin Med Res*. 2006, 4 (3): 218–27; Andersen JB et al. *Hepat Oncol*. 2014 Jan 1; 1 (1): 143–57; Amer MH. *Mol Cell Ther*. 2014, 10:2; Khan FA et al. *Oncotarget*. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9646; White MK et al. *Oncotarget*. 2016, 7(11): 12305–17; Liu T et al. *Cancer Lett*. 2016, 373 (1): 109–18; Tang H et al. *EMBO Mol Med*. 2016, 8 (2): 83–5

<sup>62</sup> End of chemotherapy within 20 years as pioneering DNA project launched. The Daily Telegraph, 01.08.2014

<sup>63</sup> Lee SH et al. *Mol Cells*. 2018 Nov 30;41(11):943–952

<sup>64</sup> Servick K. *Science*. 2017 Aug 4;357(6350):436–437

<sup>65</sup> De Miguel Beriain I. *Regen Med*. 2017 Sep;12(6):669–679

<sup>66</sup> Kaiser J. *Science*. 2017 Feb 17;355(6326):675

<sup>67</sup> Plaza Reyes A, Lanner F. *Development*. 2017 Jan 1;144(1):3–7

<sup>68</sup> Ma H, Marti-Gutierrez N. *Nature*. 2017 Aug 24;548(7668):413–419

<sup>69</sup> Pei D, Beier DW. *Cell Stem Cell*. 2017 Oct 5;21(4):423–426

<sup>70</sup> Ishii T1. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017 Dec;24(6):418–423

- действия при неудачной процедуре<sup>71</sup>
- продажа модифицированных ППК<sup>72</sup>

## 9. Заключение

Существующие методы генного и геномного редактирования активно развиваются, увеличивается их чувствительность и специфичность, что уже сейчас позволяет использовать некоторые из них в качестве средств терапии генетических патологий. В данном случае речь идёт исключительно о моногенных заболеваниях.

Остаются неразрешёнными большое количество проблем, связанных с таргетной доставкой генетического материала: недостаточная эффективность, большое количество побочных эффектов, как острых (токсичность, иммуногенность), так и отдалённых во времени.

Исследования в области генного и геномного редактирования осуществляются преимущественно частными компаниями, сосредоточенными в США и Европе.

Существует достаточное количество генотерапевтических препаратов, появляются новые. Анонсированы и проводятся клинические испытания.

Согласованное на мировом уровне законодательство в данной области отсутствует, ведутся дискуссии на уровне региональных правительств. Регулирование осуществляется с использованием существующих законодательных норм. Генное редактирование в части ненаследуемых признаков осуществляется, геномное редактирование (в части наследуемых признаков) ограничено.

Остаются нерешёнными большое количество этических вопросов.

---

<sup>71</sup> Chandrasegaran S, Bullen CK, Carroll D. *J Clin Invest*. 2017 Oct 2;127(10):3588-3590

<sup>72</sup> Memi F, Ntokou A, Papangelis I. *Semin Perinatol*. 2018 Oct 2. pii: S0146-0005(18)30081-8

Таблица – Клинические исследования (на 2017 г) продуктов для генной терапии моногенных заболеваний печени<sup>73</sup>

Год (начало исследования)	Вирусный вектор	Заболевание	Продукт	Таргет	Спонсор	Путь введения	Доза	Количество пациентов	Статус	Ссылка	Идентификатор
1992	MoMLV Retrovirus 5	Homozygous familial hypercholesterolemia	NA	LDL receptor gene	University of Michigan Ann Arbor	Intraportal (Ex vivo approach)	1 to $3.3 \times 10^9$ hepatocytes	5	Terminated	Grossman et al. 1994 Grossman et al. 1995 Raper et al 1996	NCT00004809
1998	Adenovirus 5	Ornithine transcarbamylase deficiency	NA	OTC gene	University of Pennsylvania	Intrahepatic	$2 \times 10^9$ to $6 \times 10^{11}$ vg/kg	18	Terminated	Raper et al. 2003	NCT00004498
1999	AAV2	Haemophilia B	NA	Factor IX gene	NA	Intramuscular	$2 \times 10^{11}$ to $1.8 \times 10^{12}$ vg/kg	8	Terminated	Kay et al. 2000 Manno et al. 2003	NA
2003	MoMLV Retrovirus	Haemophilia A	NA	FVIII gene	Chiron	Intravenous	$2.8 \times 10^7$ to $4.4 \times 10^8$ vg/kg	13	Terminated	Powell et al. 2003	NA
2004	HD-Adenovirus	Haemophilia A	NA	FVIII gene	GenStar	Intravenous	$4.3 \times 10^{10}$ vg/kg	1	Terminated	Chuah et al. 2004	NA
2004	AAV2	$\alpha 1$ -antitrypsin	NA	hAAt	University Massachussets	Intramuscular	$2.1 \times 10^{12}$ to $6.9 \times 10^{13}$ vg	12	Terminated	Flotte et al. 2004 Brantly et al. 2006	NCT00377416
2004	AAV2	Haemophilia B	NA	Factor IX gene	Avigen	Intrahepatic	$8 \times 10^{10}$ to $2 \times 10^{12}$ vg/kg	7	Terminated	Manno et al. 2006	NCT00076557
2006	AAV1	$\alpha 1$ -antitrypsin	NA	hAAT	University Massachussets	Intramuscular	$6.9 \times 10^{12}$ to $6 \times 10^{13}$ vg	9	Terminated	Brantly et al. 2009	NCT00430768
2009	AAV2/8	Haemophilia B	NA	Factor IX gene	St Jude Children's Hospital	Intravenous	$2 \times 10^{11}$ to $2 \times 10^{12}$ vg/kg	10	Recruiting	Nathwani et al. 2014	NCT00979238

<sup>73</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5500673/>

Год (начало исследования)	Вирусный вектор	Заболевание	Продукт	Таргет	Спонсор	Путь введения	Доза	Количество пациентов	Статус	Ссылка	Идентификатор
2010	AAV1	$\alpha$ 1-antitrypsin	NA	hAAT	Applied Genetic Technologies	Intramuscular	$6 \times 10^{12}$ to $6 \times 10^{12}$ vg/kg	9	Terminated	Flotte et al. 2011	NCT01054339
2012	AAV2/8	Haemophilia B	BAX 335	Padua mutant factor IX gene	Shire	Intravenous	$2 \times 10^{11}$ to $3 \times 10^{12}$ vg/kg	6	Terminated	Monahan et al. 2015	NCT01687608
2014	AAV2/5	Acute intermittent porphyria	NA	PBGD gene	Digna Biotech	Intravenous	$5 \times 10^{11}$ to $1.8 \times 10^{13}$ vg/kg	8	Terminated	D'Avola et al. 2016	NCT02082860
2015	Engineered AAV	Haemophilia B	SPK-9001	Padua mutant factor IX gene	Spark Therapeutics	Intravenous	$5 \times 10^{11}$ vg/kg (Low dose)	7	Recruiting	George et al. 2016	NCT02484092
	AAV2/5	Haemophilia B	AMT-060	Factor IX gene	Uniqure Biopharma	Intravenous	$5 \times 10^{12}$ to $2 \times 10^{13}$ vg/kg	5	Recruiting	Miesbach et al. 2016	NCT02396342
	AAV2/rh10	Haemophilia B	DTX101	Factor IX gene	Dimension Therapeutics	Intravenous	$1.6 \times 10^{12}$ to $1 \times 10^{13}$ vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov	NCT02618915
	AAV2/5	Haemophilia A	BMN 270	Factor VIII gene	BioMarin Pharmaceuticals	Intravenous	$6 \times 10^{12}$ to $6 \times 10^{13}$ vg/kg	9	Recruiting	Pasi et al. 2016	NCT02576795
2016	AAV2/6	Haemophilia B	SB-FIX	Factor IX integrating in the albumin locus via Zinc-finger-nuclease	Sangamo Biosciences	Intravenous	cDNA $4 \times 10^{12}$ to $4 \times 10^{13}$ vg/kg and ZFN $5 \times 10^{11}$ to $5 \times 10^{12}$ vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov	NCT02695160
	AAV2/8	Homozygous familial hypercholesterolemia	RGX-501	LDL receptor gene	University of Pennsylvania/Regenxbio	Intravenous	$2.5 \times 10^{12}$ to $7.5 \times 10^{12}$ vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov	NCT02651675

Год (начало исследования)	Вирусный вектор	Заболевание	Продукт	Таргет	Спонсор	Путь введения	Доза	Количество пациентов	Статус	Ссылка	Идентификатор
2017	AAV2/8	Ornithine transcarbamylase deficiency	DTX301	OTC gene	Dimension Therapeutics	Intravenous	$2 \times 10^{12}$ to $2 \times 10^{13}$ vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov	NCT02991144
	Engineered AAV	Haemophilia A	SPK-8011	Factor VIII gene	Spark Therapeutics	Intravenous	Undisclosed	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov	NCT03003533
	AAV2/8	Haemophilia A	GO-8	Factor VIII gene	University College London	Intravenous	$6 \times 10^{11}$ to $6 \times 10^{12}$ vg/kg	NA	Not yet recruiting	clinicaltrials.gov	NCT03001830
	Engineered AAV	Haemophilia B	FLT-180	Undisclosed	Freeline Therapeutics						
	AAV2/8	Haemophilia A	BAX-888	Factor VIII gene	Shire						
	AVV	Haemophilia A	DTX201	Factor VIII gene	Dimension Therapeutics/Bayer						
	AAV2/6	Haemophilia A	SB-525	Factor VIII integrating in the albumin locus via Zinc-finger-nuclease	Sangamo Biosciences						
	AAV2/8	Mucopolysaccharidosis VI	MeuSIX	ARSB gene	NA						
	AAV2/8	Crigler Najjar	AT342	UGT1A1 gene	Audentes Therapeutics						

## Технологии редактирования геномов

### Краткая аналитическая справка

Редактирование генома, геномная инженерия (также называемое редактированием генов) представляет собой группу технологий, которые дают возможность изменять ДНК живой клетки - добавлять, удалять или изменять генетический материал в определенных местах генома.

Термины «генное» и «геномное редактирование» можно считать равнозначными. В случае с терапией – «геномная терапия» часто рассматривается в качестве варианта «генной терапии», при котором изменяется именно ядерный геном (хромосомная ДНК). Понятие «генная терапия» шире, здесь может идти речь о модификации митохондриальной ДНК, либо нужный ген может быть доставлен в составе плазмиды или матричной РНК (мРНК) без последующей модификации ДНК.

Из множества методик направленного изменения сложных эукариотических геномов, на практике чаще других используют технологию индуцированной сайт-специфичной нуклеазой репарации, где в качестве нуклеазы применяют:

- искусственные (гибридные, индивидуальные) нуклеазы с доменами «цинковых пальцев» (zinc finger nucleases, ZFNs), 2000-2003 гг.,
- искусственные (гибридные, индивидуальные) нуклеазы с доменами аналогов активаторов транскрипции (transcription activator-like effector nucleases, TALENs), 2009-2010 гг.,
- природные РНК-направляемые нуклеазы (RNA-guided nucleases, RGNs), в частности, CRISPR-ассоциированные нуклеазы (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9) с индивидуальной наводящей РНК (именно данный метод набирает преимущественную популярность среди исследователей и практиков, как наиболее перспективный), 2011-2012 гг.

Любая из перечисленных технологий редактирования генома включает три компонента:

- ген-специфичный участок, ответственный за поиск нужного места в ДНК,
- эндонуклеаза осуществляет рестрикцию необходимого фрагмента (сшивание надреза происходит за счёт внутриклеточных систем репарации),
- модифицирующая последовательность (нужна в случае, если необходимо добавить или заменить фрагмент генома)

Генную терапию условно можно разделить на три группы:

- фетальная генотерапия (модификация генома гамет/зиготы/бластомеров – получение целого организма из одной измененной клетки);
- клеточная соматическая генотерапия (модификация генома отдельных соматических клеток с целью последующего возврата в организм клеток с изменённым геномом);
- тканевая соматическая генотерапия (модификация генома отдельных групп (или всех) соматических клеток непосредственно в многоклеточном организме).

Методы генной терапии (не геномной) используют с начала 1990-х гг., при этом изменение (или удаление) участков ДНК непосредственно в структуре хромосомы только недавно начало входить в практику. На сегодняшний день предложены варианты лечения пигментного ретинита, глаукомы, гемоглобинопатий, мышечных дистрофий, саркомы, рака легких, ВИЧ, гепатита В.

Активно развивается фетальное направление. В 2015-2016 гг. о своих планах по модификации геномов человеческих эмбрионов при помощи технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 заявило множество лабораторий в США, Китае, Великобритании и ряде других стран, а также несколько биотехнологических компаний: Ovascience (США), Editas Medicine (США) и др.

В 2015 г. в Китае при помощи системы CRISPR/Cas9 на уровне зиготы восстановили мутантный ген бета-глобина. Из 86 взятых в эксперимент зигот восстановление произошло в 4-х случаях.

Доставка в клетку генетического материала, как правило, происходит в виде генно-инженерных конструкций вирусными (системы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и вируса простого герпеса) и невирусными системами (электропорация, липосомы, катионные полимеры и др.).

В области разработки средств адресной доставки наблюдаются определённые успехи. Так, методы CRISPR/Cas9, TALEN и ZNFs в сочетании с гидродинамическими инъекциями и доставкой с использованием аденоассоциированными вирусами имеют эффективность до 70%.

Основным побочным эффектом геномного редактирования является возникновение нецелевых модификаций ДНК. Хорошо известно, что таргетирование по принципу комплементарности имеет недостаток в виде побочных продуктов. В данный момент ведутся активные поиски CRISPR/Cas систем, таких, которые будут.

Доставка с помощью аденовирусов высокоэффективна и практически не встраивается в геном хозяина. Однако такой способ может вызывать сильный иммунный ответ, а также развитие аутоиммунных заболеваний. Другой вирусный носитель – аденоассоциированные вирусы, не обладает столь выраженной иммуногенностью, однако его эффективность несколько ниже. Для вирусных векторов в целом характерен высокий уровень мутагенеза, приводящего к канцерогенезу. Более новыми и безопасными методами

являются: гидродинамические инъекции плазмид и одноцепочечных ДНК, а также рибонуклеопротеиновых комплексов и липидных наночастиц.

Одним из недавно выявленных побочных эффектов геномного редактирования является активация сигналинга p53 в ответ на повреждение ДНК. Этот защитный механизм существенно снижает эффективность CRISPR/Cas.

Важной проблемой является необходимость системного введения генно-терапевтических препаратов. С этой точки зрения, применение геномного редактирования наиболее безопасно именно на ранних стадиях эмбрионального развития.

На рынке генной и геномной терапии присутствуют большое число компаний, и, несмотря на большое количество ограничений в ближайшие пять лет прогнозируют рост глобального рынка до объема в 6,28 миллиарда долларов. Большинство мелких компаний генной терапии делают это в партнерстве с гигантами фармацевтического рынка, такими как Bayer, GlaxoSmithKline, Pfizer, Merck и Novartis (и часто на их деньги).

В настоящий момент согласованная международная нормативная база, касающаяся редактирования генов отсутствует. Известна, однако, “Конвенция о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины”, принятая европейскими странами в 1997 году, ст. 13 которой запрещает внесение изменений в геном, которые могут быть переданы по наследству.

В настоящее время общественность и государства рассматривают перспективы либерализации законодательства в области редактирования гамет и эмбрионов, поскольку это сулит большие перспективы в области медицины.

Общий законодательный климат в отношении детей, полученных с применением геномного редактирования, имеет в целом запретительный уклон на редактирование эмбрионов исходя из строгого запрета (Канада, Индия, Франция), через запрет в рекомендациях (Китай, Индия, Ирландия и Япония), до неопределённого отношения (Исландия, Перу).

С 1989 по 2016 г. в мире было выполнено более 2300 клинических исследований генотерапевтических препаратов. К настоящему моменту существуют более или менее эффективные подходы к генной терапии свыше 50 генетически детерминированных заболеваний человека: первичных комбинированных иммунодефицитов, гемофилии, гемоглобинопатий, кистозного фиброза, ахроматопсии, амавроза Лебера, эпилепсии, остеоартрита, болезни Паркинсона, онкологических заболеваний. Проводятся новые клинические исследования.

Среди научного и медицинского сообщества активно обсуждаются следующие вопросы применения технологий геномного и геномного редактирования:

- оценка рисков
- невозможность стандартизации процедуры

- готовность (её нет) внедрения в клиническую практику
- консенсус (его нет) генетиков для консультирования пациентов
- границы редактирования
- качество процедуры
- наблюдение за последующими поколениями
- степень конфиденциальности и гражданские права
- действия при неудачной процедуре
- продажа модифицированных ППК

Таким образом, существующие методы генного и геномного редактирования активно развиваются, увеличивается их чувствительность и специфичность, что уже сейчас позволяет использовать некоторые из них в качестве средств терапии генетических патологий. В данном случае речь идёт исключительно о моногенных заболеваниях.

Остаются неразрешёнными большое количество проблем, связанных с таргетной доставкой генетического материала: недостаточная эффективность, большое количество побочных эффектов, как острых (токсичность, иммуногенность), так и отдалённых во времени.

Исследования в области генного и геномного редактирования осуществляются преимущественно частными компаниями, сосредоточенными в США и Европе.

Существует достаточное количество генотерапевтических препаратов, появляются новые. Анонсированы и проводятся клинические испытания.

Согласованное на мировом уровне законодательство в данной области отсутствует, ведутся дискуссии на уровне региональных правительств. Регулирование осуществляется с использованием существующих законодательных норм. Генное редактирование в части ненаследуемых признаков осуществляется, геномное редактирование (в части наследуемых признаков) ограничено.