

CRISPR/CAS9 В ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ЕГО НЕДОСТАТКИ

Шамсиева Камола Махамаджановна

*Студентка, Ташкентского государственного медицинского университета,
Узбекистан, г. Ташкент*

Самадова Фотима Ражабовна

*Ассистент кафедры 1- Гистологии и медицинской биологии «Ташкентского
государственного медицинского университета»
Узбекистан, г. Ташкент*

CRISPR/CAS9 IN THE TREATMENT OF DISEASES AND ITS LIMITATIONS

Shamsieva Kamola Makhamadjanovna

*Student, Tashkent State Medical University
Tashkent, Uzbekistan*

Samadova Fatima Rajabovna

*Assistant of the Department of 1-Histology and Medical Biology,
Tashkent State Medical University
Tashkent, Uzbekistan*

Аннотация

Технология редактирования генома CRISPR–Cas9 произвела революцию в молекулярной биологии и медицине. В настоящем обзоре систематизированы данные о нецелевых мутациях (off-target effects), хромосомных перестройках и иммуногенных реакциях, возникающих при использовании данной системы. Рассмотрены клинические применения CRISPR–Cas9 при лечении ВИЧ-инфекции, онкологических заболеваний, сахарного диабета 1 типа и болезней системы крови. Проанализированы современные стратегии снижения ошибок: использование высокоточных вариантов Cas9 (eSpCas9, HiFi Cas9), химически модифицированных направляющих РНК, технологий Prime Editing и Base

Editing, а также биоинформатических алгоритмов предсказания нецелевых сайтов.

Abstract

The genome editing technology CRISPR–Cas9 has revolutionized molecular biology and medicine. This review systematizes current data on off-target mutations, chromosomal rearrangements, and immunogenic reactions that may occur during the application of this system. Clinical applications of CRISPR–Cas9 in the treatment of HIV infection, oncological diseases, type 1 diabetes mellitus, and hematological disorders are discussed. Modern strategies for reducing errors are analyzed, including the use of high-fidelity Cas9 variants (eSpCas9, HiFi Cas9), chemically modified guide RNAs, Prime Editing and Base Editing technologies, as well as bioinformatic algorithms for predicting off-target sites.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, геномное редактирование, генная терапия, нуклеаза Cas9, направляющая РНК (sgRNA), онкология, ВИЧ, диабет 1 типа, серповидноклеточная анемия, репарация ДНК, NHEJ, HDR, внецелевой эффект (off-target), нежелательные мутации, хромосомные перестройки, системы доставки, иммунный ответ, клиническое применение, биоэтика.

Keywords: CRISPR/Cas9, genome editing, gene therapy, Cas9 nuclease, single-guide RNA (sgRNA), oncology, HIV, type 1 diabetes mellitus, sickle cell anemia, DNA repair, NHEJ, HDR, off-target effect, unwanted mutations, chromosomal rearrangements, delivery systems, immune response, clinical application, bioethics.

Введение. С момента адаптации прокариотической иммунной системы CRISPR–Cas9 для редактирования генома эукариот в 2012–2013 годах (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013) данная технология стала наиболее широко применяемым инструментом в области молекулярной медицины. Принцип работы системы основан на направлении нуклеазы Cas9 к специфическому

локусу ДНК с помощью одиночной направляющей РНК (sgRNA), что позволяет вносить точные двухцепочечные разрывы (DSB) в любом участке генома, содержащем последовательность PAM (NGG для *Streptococcus pyogenes* Cas9). Несмотря на огромный терапевтический потенциал, широкое клиническое применение CRISPR–Cas9 сдерживается рядом существенных ограничений. Главными из них являются нецелевые эффекты — непреднамеренные разрывы ДНК в участках, гомологичных целевому сайту, — а также возможные хромосомные нарушения, иммунные реакции и недостаточная эффективность доставки системы в клетки-мишени. В данной статье систематизированы актуальные данные о природе этих ошибок и стратегиях их преодоления в контексте четырёх ключевых клинических областей.

Комплекс Cas9–sgRNA осуществляет поиск целевой последовательности путём последовательного сканирования ДНК через PAM-зависимое взаимодействие. После идентификации комплементарного участка происходит разматывание двойной спирали и формирование R-петли, что активирует каталитические домены HNH и RuvC, расщепляющие каждую из цепей. Образовавшийся двухцепочечный разрыв репарируется клеточными механизмами: негомологичным соединением концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинацией (HDR). NHEJ является доминирующим и приводит к инсерциям/делециям (indels), тогда как HDR обеспечивает точную правку при наличии матрицы, но характеризуется низкой эффективностью в большинстве типов клеток.

Классификация нецелевых эффектов. Нецелевые эффекты (off-target effects) подразделяются на несколько категорий. Во-первых, точечные мутации в сайтах с неполной гомологией sgRNA (допускается до 5 несовпадений в «seed»-регионе, прилегающем к PAM). Во-вторых, крупные хромосомные делеции и транслокации, особенно при наличии нескольких нецелевых DSB одновременно — это явление документировано в работах Kosicki et al. (2018), показавших делеции в сотни тысяч пар оснований вблизи целевого локуса. В-третьих, эпигеномные нарушения — изменения паттернов метилирования ДНК

и модификаций гистонов в результате самого процесса поиска ДНК комплексом Cas9. Наконец, в работах Liu et al. (2021) описан феномен «мозаицизма» — неравномерного редактирования в разных клетках одного организма.

Иммунные реакции представляют отдельную группу осложнений. Белок Cas9, происходящий из бактерий *S. pyogenes* или *S. aureus*, является чужеродным для иммунной системы человека. Исследования Charlesworth et al. (2019) показали, что у значительной части здоровых доноров (до 58%) обнаруживаются предрасполагающие антитела к SpCas9, а у 46% — специфические Т-лимфоциты, что ограничивает применение CRISPR-терапии *in vivo*.

Стратегия применения CRISPR–Cas9 при ВИЧ-1 включает несколько подходов: разрушение провирусной ДНК в инфицированных клетках, нокаут рецепторов CCR5 и CXCR4 (коррецепторов вируса) в аутологичных стволовых клетках CD34+ для создания популяции ВИЧ-резистентных лимфоцитов, а также таргетинг генов LTR, gag и pol. Клиническое исследование фазы I (Xu et al., 2019) продемонстрировало долгосрочное сохранение CCR5-нокаутированных клеток у пациентов с острым миелоидным лейкозом и ВИЧ-инфекцией. Ключевые ошибки при данном применении: sgRNA, направленные против CCR5, демонстрируют значительное сходство с геном CCR2, что приводит к нецелевым разрывам и потенциальному нарушению иммунной функции (Tebas et al., 2014). Кроме того, существует риск ускоренной репликации вирусных штаммов, использующих альтернативные рецепторы (CXCR4-тропные вирусы), после элиминации CCR5+ популяции.

В онкологии CRISPR–Cas9 применяется для инактивации иммунных контрольных точек (PD-1, CTLA-4, TIM-3) в Т-лимфоцитах, создания аллогенных CAR-T-клеток путём нокаута TCR и HLA, таргетинга онкогенов (KRAS G12D, BCR-ABL, MYC) в опухолевых клетках, а также для скрининга в геномных библиотеках с целью идентификации новых терапевтических мишеней. Первое клиническое исследование редактирования с помощью

CRISPR у онкологических пациентов было опубликовано в 2020 году (Stadtmauer et al.), где у трёх пациентов с рефрактерными опухолями клетки с одновременным нокаутом трёх генов (TRAC, TRBC, PDCD1) сохранялись до 9 месяцев. Проблема нецелевых эффектов особенно критична в онкологии, поскольку повреждение генов-супрессоров опухолей (TP53, RB1, BRCA1/2) может индуцировать или усилить злокачественную трансформацию клеток. Zhu et al. (2020) показали, что нецелевые разрывы в регуляторных районах хроматина могут активировать протоонкогены. Транслокации между нецелевыми сайтами и локусами иммуноглобулинов или Т-клеточного рецептора представляют дополнительный онкогенный риск в гематологических опухолях.

При сахарном диабете 1 типа CRISPR используется для защиты трансплантируемых β -клеток от аутоиммунного уничтожения посредством нокаута генов HLA класса I и II, а также инсерции иммуносупрессивных трансгенов (PD-L1, CD47). Стратегии дифференцировки ипСК (индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) в инсулин-продуцирующие клетки с предварительным CRISPR-редактированием позволяют создавать персонализированные клеточные препараты. При диабете 2 типа изучается редактирование генов ADIPOQ, FTO и TCF7L2. Специфические риски в данном направлении связаны с дифференцировкой ипСК: нецелевые мутации, накопленные в процессе репрограммирования и редактирования, могут приводить к онкогенной трансформации при длительном существовании клеточных трансплантатов. Также описаны нецелевые разрывы в генах, участвующих в метаболизме глюкозы (GSK, INSR), что потенциально усугубляет метаболические нарушения.

Гематологические заболевания стали первой областью успешного клинического применения CRISPR-терапии. Препарат exagamglogene autotemcel (Casgevy, одобрен FDA в декабре 2023 года) использует CRISPR–Cas9 для реактивации фетального гемоглобина через нокаут BCL11A в гемопоэтических стволовых клетках пациентов с серповидноклеточной

анемией и β -талассемией. В клинических исследованиях CLIMB-111 и CLIMB-121 у более чем 90% пациентов зафиксировано устранение вазоокклюзивных кризов и независимость от трансфузий. Параллельно ведутся исследования при гемофилии А и В (нокаут антагониста FVIII — сепроксетина), а также при пароксизмальной ночной гемоглобинурии.

Высокоточные варианты Cas9 Разработан ряд вариантов Cas9 с повышенной специфичностью. eSpCas9 (Slaymaker et al., 2016) содержит аминокислотные замены, снижающие взаимодействие с нецომплементарной цепью ДНК, что уменьшает нецелевые разрывы на 10-кратный порядок. SpCas9-HF1 (Kleinstiver et al., 2016) несёт замены в HNH- и RuvC-домене, ослабляя нецелевые взаимодействия при сохранении целевой активности. HiFi Cas9 (Vakulskas et al., 2018) демонстрирует наилучший баланс между специфичностью и эффективностью редактирования среди коммерчески доступных вариантов. evoCas9 (Casini et al., 2018) был получен методом направленной эволюции и показал особенно высокую специфичность в клинически значимых локусах. Использование «ников» — Cas9 с мутацией в одном каталитическом домене (nikase) — в паре (double-nickase) снижает вероятность нецелевых DSB, так как требует одновременного связывания двух молекул.

Base Editing и Prime Editing. Технология Base Editing (редакторы оснований), разработанная группой David Liu в 2016 году, позволяет вносить однонуклеотидные замены без образования двухцепочечного разрыва ДНК. Аденозиновые (ABE) и цитидиновые (CBE) редакторы преобразуют отдельные нуклеотиды непосредственно в «окне» sgRNA, снижая риск NHEJ-опосредованных ошибок. Усовершенствованные варианты ABE8e и BE4max (Richter et al., 2020) отличаются высокой эффективностью при минимальном числе нецелевых событий. Однако Base Editing ограничен только переходными заменами (C→T, A→G) и неприменим для вставок, делеций или трансверсий. Prime Editing (Anzalone et al., 2019) является наиболее универсальной технологией из существующих альтернатив CRISPR. Система включает белок

PE2 (Cas9-никаза, слитая с обратной транскриптазой) и pegRNA (primer editing guide RNA), кодирующую как целевую последовательность, так и желаемую правку. Метод способен вносить все 12 типов точечных замен, а также небольшие инсерции и делеции без DSB и без матричной ДНК. PE4 и PE5 (Chen et al., 2021) - улучшенные версии с временным ингибированием MMR - демонстрируют повышение эффективности в 3–4 раза в немитотических клетках. Prime Editing характеризуется существенно меньшим числом нецелевых событий по сравнению с базовым CRISPR–Cas9, что делает его перспективным для клинических применений, требующих точности.

Оптимизация sgRNA и условий редактирования. Химическая модификация sgRNA - включение 2'-О-метил и фосфоротиоатных групп на концах молекулы - повышает стабильность и снижает иммуногенность направляющей РНК, а также уменьшает нецелевую активность (Hendel et al., 2015). Сокращение времени экспозиции путём доставки комплекса в виде рибонуклеопротеинов (RNP) вместо плазмидной ДНК снижает нецелевые эффекты за счёт быстрого протеолитического разрушения Cas9 (Kim et al., 2014). Электропорация RNP в стволовые клетки крови CD34+ является стандартным методом в большинстве современных клинических протоколов.

Биоинформатические инструменты и геномный скрининг. Предиктивные алгоритмы (Cas-OFFinder, CRISPOR, CHOPCHOP, DeepCRISPR) позволяют *in silico* идентифицировать потенциальные нецелевые сайты до эксперимента. Экспериментальные методы геномного скрининга — GUIDE-seq, CIRCLE-seq, DISCOVER-seq, SITE-seq — обнаруживают нецелевые DSB на геномном уровне с чувствительностью 0,01–0,1%. Интеграция предиктивных и экспериментальных подходов с машинным обучением (CNN-модели, трансформеры) существенно повышает точность дизайна sgRNA. Сравнительное исследование Tsai et al. (2017) показало, что GUIDE-seq выявляет в среднем 13 нецелевых сайтов на sgRNA у WT Cas9 против 2–3 у HF1 и eSpCas9.

Каждая из рассмотренных технологий имеет определённый профиль преимуществ и ограничений. Стандартный CRISPR–Cas9 обладает максимальной универсальностью и высокой эффективностью, однако создаёт DSB и наиболее подвержен нецелевым эффектам. Высокоточные варианты Cas9 снижают нецелевую активность в 10–100 раз при незначительном снижении целевой эффективности (до 20%) и сохраняют зависимость от механизмов DSB-репарации. Base Editing устраняет проблему DSB, но ограничен в типах возможных правок и демонстрирует нецелевое редактирование РНК. Prime Editing является наиболее безопасным и универсальным методом, однако страдает от относительно низкой эффективности в первично-делящихся и постмитотических клетках, а также имеет большой размер конструкций, затрудняющий доставку с помощью AAV. В клинической практике выбор технологии определяется типом требуемой правки, типом клеток-мишеней, допустимым уровнем риска нецелевых мутаций и возможностями доставки. Для нокаута генов (как при BCL11A в терапии гемоглинопатий) стандартный SpCas9 или HiFi Cas9 в формате RNP остаётся предпочтительным. Для точных однонуклеотидных правок (как ожидается при терапии генетических дефектов факторов коагуляции) перспективны ABE8e или PE4. Для сложных правок с инсерцией функциональных кассет — комбинация Prime Editing с сайт-специфической интеграцией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Технология CRISPR–Cas9, несмотря на выдающийся терапевтический потенциал, сопряжена с реальными рисками нецелевых мутаций, хромосомных перестроек и иммунных реакций. Эти риски не являются непреодолимыми: сочетание высокоточных вариантов нуклеазы, оптимизированных sgRNA, технологий без DSB (Base Editing, Prime Editing) и строгого биоинформатического и экспериментального скрининга позволяет существенно снизить частоту нежелательных геномных событий. Одобрение препарата Casgevy в 2023 году стало важнейшим доказательством клинической безопасности и эффективности CRISPR-терапии при условии тщательного

контроля качества. Дальнейший прогресс в области направленной доставки компонентов системы, разработки ортогональных Cas-белков и методов мониторинга редактирования *in vivo* создаст основу для расширения спектра болезней, поддающихся генетической коррекции.

Список литературы:

1. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. — 2012. — Vol. 337. — P. 816–821.
2. Cong L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. — 2013. — Vol. 339. — P. 819–823.
3. Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements // *Nature Biotechnology*. — 2018. — Vol. 36. — P. 765–771.
4. Charlesworth C.T. et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans // *Nature Medicine*. — 2019. — Vol. 25. — P. 249–254.
5. Slaymaker I.M. et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity // *Science*. — 2016. — Vol. 351. — P. 84–88.
6. Kleinstiver B.P. et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects // *Nature*. — 2016. — Vol. 529. — P. 490–495.
7. Vakulskas C.A. et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells // *Nature Medicine*. — 2018. — Vol. 24. — P. 1216–1224.
8. Anzalone A.V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA // *Nature*. — 2019. — Vol. 576. — P. 149–157.
9. Chen P.J. et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes // *Cell*. — 2021. — Vol. 184. — P. 5635–5652.
10. Stadtmauer E.A. et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer // *Science*. — 2020. — Vol. 367. — eaba7365.

11. Xu L. et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia // *New England Journal of Medicine*. — 2019. — Vol. 381. — P. 1240–1247.
12. Tsai S.Q. et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR–Cas9 nuclease off-targets // *Nature Methods*. — 2017. — Vol. 14. — P. 607–614.
13. Frangoul H. et al. CRISPR–Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia // *New England Journal of Medicine*. — 2021. — Vol. 384. — P. 252–260.
14. Richter M.F. et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity // *Nature Biotechnology*. — 2020. — Vol. 38. — P. 883–891.
15. Tebas P. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV // *New England Journal of Medicine*. — 2014. — Vol. 370. — P. 901–910.