

# ГЕННО РЕДАКТИРАНЕ В МЕДИЦИНАТА

Технологията за генно редактиране CRISPR/Cas дава възможност не само за изключване (нокаутване) на избран от нас ген, но и за предизвикване на различни изменения в него, фино настройване на функционирането му, осъществяване на епигенетични модификации за повлияване върху регулацията на генната активност. Методът е с широк потенциал за приложение в научноизследователската дейност, медицината и селското стопанство. В края на 2023 г. и началото на 2024 г. Администрацията по храни и лекарства в САЩ (FDA) одобри първите две терапии, основани върху CRISPR/Cas-9 за лечение на сърповидно-клетъчна анемия и бета таласемия, а други терапии са в процес на клинични изпитвания. Интерес представлява използването на метода в диагностиката и лечението на инфекциозни болести, включително хронични инфекции с вътреклетъчни патогени и нововъзникващи заболявания.



**проф. Радостина  
Александрова,  
доктор**

Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, Българска академия на науките, гр. София

Съкращението CRISPR означава клъстерирани редовно разположени къси палиндромни повторения (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) и е древна защитна система на бактериите срещу инфекции с бактериофаги и трансфер на плазмиди в природата.

Когато са заразени с вируси, бактериите улавят малки части от тяхната ДНК и ги въвеждат в собствената си ДНК по определен модел, за да създадат т.нар. CRISPR масиви. Масивите CRISPR позволяват на бактериите да „запомнят“ вирусите (или подобни структури). Ако вирусът атакува отново, произведените от бактериите РНК сегменти от CRISPR масивите разпознават съответните области в ДНК на вирусите и се прикрепват към тях. След това бактериите използват ендонуклеазата Cas9 или подобен ен-

зим, за да разрежат вирусната ДНК, с което го инактивират.

През 2020 г. *Еманюел Шарпентие* и *Дженифър Дудна* бяха удостоени с Нобелова награда по химия за „разработването на метод за редактиране на генома“. Учените успяха да пресъздадат генетичните ножици на бактериите в условия *in vitro* и опростиха молекулните им компоненти, така че да са по-лесни за използване. Нещо повече, те препрограмираха тези генетични ножици по такъв начин, че да могат да режат всяка ДНК молекула (не само фагова) на предварително определено от нас място. В края на 2020 г. започна първото фаза 1 клинично проучване. Първите основани на CRISPR/Cas9 терапии бяха одобрени от FDA през декември 2023 (за лечение на сърповидно-клетъчна анемия) и януари 2024 г. (за терапия на бета таласемия). За целта от па-

циента се изолират хемопоеични стволови/прогениторни клетки, чието редактиране се осъществява в лабораторни условия (*ex vivo*), след което те се връщат обратно в организма му<sup>(1-4)</sup>.

## Принципи и възможности на технологията CRISPR/CAS-9

Редактирането на гените с помощта на CRISPR/Cas9 започва със създаването на единична водеща РНК молекула (sgRNA), която заедно с белтъка Cas9 се въвежда в клетката-мишена и се свързва с прицелната ДНК. Генетичната ножица Cas9 разкъсва двойната верига на ДНК в предварително определеното и желано от нас място. Възникналите свободни краища на ДНК впослед-

### Ключови думи:

генно редактиране, CRISPR/Cas-9, инфекции, диагностика, терапевтични подходи

ствие се поправят от механизмите за възстановяване/репарация на ДНК в клетката.

CRISPR/Cas направи революция в редактирането на гени и се превърна в мощен инструмент за изучаване на нормални и патологични физиологични процеси, създаване на иновативни диагностични и терапевтични подходи; стана незаменим помощник за напредване в клиничния превод на получените в хода на изследователската дейност резултати. Методът се проучва усилено за потенциално приложение (ex vivo и in vivo) в лечението на множество наследствени и придобити заболявания, включително имунодефицитни нарушения, ракови, сърдечно-съдови, кожни и очни заболявания, невродегенеративни състояния и др. CRISPR-Cas може да се „мултиплексира“ за редактиране на множество гени едновременно (което е особено ценно при полигенни заболявания, каквито са неоплазиите) и се използва за високо ефективен скрининг на целия геном<sup>[2-5]</sup>.

## Основана на CRISPR/Cas диагностика

Основаните на CRISPR/Cas диагностични подходи осигуряват подобрена скорост и точност при откриването на вирусни и бактериални нуклеинови киселини. Сред тях са системите DETECTR и SHERLOCK, предназначени за идентифициране съответно на РНК и ДНК последователности. SHERLOCK и DETECTR имат редица предимства, сред които:

1. Висока чувствителност – позволяват откриване на единично вирусно копие.
2. Ензимните реакции протичат

при 37°C и не изискват скъпа апаратура.

3. Бързи са, осъществяването им отнема само 1-2 часа.

Доказана е ползата им при диагностиката на Денга, Зика, ХИВ, туберкулоза, хепатит В и др. Смята се, че основаните на CRISPR/Cas методи са особено подходящи за диагностика на нововъзникващи инфекциозни заболявания, която традиционно се провежда с помощта на клетъчни култури, множество PCR тестове в реално време, метагеномни анализи и образни изследвания.

CRISPR подобрява чувствителността на следващото поколение секвениране (NGS) и улеснява откриването на нуклеотидни последователности с ниска честота в клинични проби. Такива са например гените за предсказване на антибиотична устойчивост. Идеята е последователностите с висока честота, които намаляват чувствителността на NGS, като човешки митохондриални рибозомни РНК гени, да бъдат изрязани с CRISPR/Cas9. Подходът постига 5000-кратно обогатяване на прицелните гени спрямо самостоятелното приложение на NGS. Използван е и за идентифициране на гени за резистентност при малария от изсушени проби от кръвни петна<sup>[6-9]</sup>.

## Лечение на хронични вирусни инфекции

Едно от големите затруднения в съвременната медицина е лечението на хронични вирусни инфекции, сред които причинители са HBV и HIV. Проблемът се обуславя от факта,

че в тези случаи вирусният геном се поддържа в клетката-гостоприемник или интегриран в генома ѝ, или като вирусна „минихромозома“ (епизома). По данни на СЗО през 2022 г. в света е имало 254 милиона души с хронична хепатит В инфекция<sup>[10]</sup>, а броят на хората, които живеят с HIV, в края на 2023 г. е бил 39.9 милиона<sup>[11]</sup>. CRISPR/Cas предлага възможност за лечение на тези предизвикателни хронични инфекции чрез атакуване на вирусния геном вътре в клетката-гостоприемник. Преди да се случи това обаче, трябва да бъдат преодолени редица предизвикателства, включително:

1. Системата CRISPR/Cas-9 трябва да бъде доставена до прицелните клетки.
2. Тя трябва да е в състояние да работи при вирусни геноми, които непрекъснато се изменят. Пример за това е HIV-1, при който се наблюдава висок процент мутация и значително генетично разнообразие дори в рамките на един гостоприемник.
3. Препотвратяване на повторно заразяване на новоизлекуваните клетки от други вирусни резервари в тялото.
4. Системата не трябва да предизвиква непредвидени и нежелани ефекти в генома на гостоприемника<sup>[7]</sup>.

CRISPR/Cas9) показва забележителен потенциал за инактивиране и/или елиминиране на интегрирана провирусна ДНК на HIV в клетките на гостоприемника. В ход е клинично проучване фаза 1/2, чиято задача е да оцени безопасността и фармакодинамиката на базиран на CRISPR терапевтичен кандидат (EBT-101) при индивиди, живеещи с HIV-1<sup>[12-14]</sup>.

## Базирани на CRISPR/CAS терапии за бактериални инфекции

Генното редактиране може да бъде използвано за създаване на антибактериални продукти, които да бъдат доставени през клетъчната стена на бактериите с помощта на бактериофаги. Съобщено е за бактериофаги, които могат да доставят системата CRISPR/Cas-9 в *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Мишените, които CRISPR/Cas-9 сръзва в патогенните бактерии, са: бактериални вирулентни фактори; гени за устойчивост към антибиотици; уникални за бактериалния вид гени. За разлика от антибиотиците, конструираните бактериофаги се очаква да имат изключително тесен спектър на действие, като убиват само представляващите интерес за нас бактерии, но са щадящи към непатогенните комменсални видове. Нецелеви ефекти върху клетките-гостоприемници също не би трябвало да се наблюдават, тъй като инструментите на CRISPR/Cas9 се транскрибират само в бактериите. Получените до момента резултати са смесени. Лечението на инфекции на кожата и меките тъкани при животински модели е успешно. Терапията на свързан със *Staphylococcus aureus* остеомиелит при плъх обаче не е довела до желаните резултати, най-вероятно поради лошото проникване на бактериофагите в костта<sup>[7,15]</sup>.

## CRISPR „ваксину“

Традиционната ваксинация включва въвеждане на вирусни или бактери-

ални антигени в гостоприемника, което води до изграждане на специфичен хуморален и/или Т-клетъчен имунен отговор. Алтернативна стратегия е с помощта на CRISPR/Cas да бъдат модифицирани В клетки на пациента, за да бъдат стимулирани да произвеждат желаните неутрализиращи антитела, например насочени срещу HIV-1 специфични широко неутрализиращи антитела<sup>[7,16]</sup>.

## CRISPR/Cas9 помага при ксенотрансплантации

Системата се използва за унищожаване на свински ендогенни ретровируси (PERVs) при прасета. PERVs са вируси, които са интегрирани в генома на свинете и са сред основните пречки за успеха при ксенотрансплантациите<sup>[17]</sup>.

## Педизвикателства и ограничения пред CRISPR/Cas

Необходимо е осигуряването на подходящо, безопасно и прецизно доставяне на системата CRISPR/Cas до желаните места. За целта се използват извънклетъчни везикули и наночастици, вирусни вектори. Важно е да бъде избегната проявата на т.нар. „нецелеви“ ефекти – непредвидени и нежелани модификации на ДНК или РНК.

Белтъкът Cas9 се извлича от бактериите и може да предизвика (хуморален и клетъчен) имунен отговор при въвеждане в човешкото тяло, който да ускори разграждането на тази молекула и да компрометира способ-

ността ѝ да редактира гени.

Редактирането на гени се прилага само при деца и възрастни хора, но не и в ембриони, тъй като се смята, че използването на CRISPR-Cas може да доведе до допълнителни генетични аномалии в тях. Една от причините е, че в тези млади клетки механизмите за възстановяване на сръзването от генетичната ножица след постигане на нужната генетична корекция, все още не са добре развити<sup>[3-5]</sup>. ■

### Благодарност:

Проучването е осъществено с подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ при МОН, договор № КП-06-КОСТ/18 от 12.08.2024 г.

### Книгопис:

- Jinek M, Chylinski K, Fontana I et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012, 337(6096): 816-821.
- Baker C, Hayden MS. Gene editing in dermatology: Harnessing CRISPR for the treatment of cutaneous disease. *F1000Res*. 2020, 9: 281.
- Ding S, Liu J, Han X et al. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2023, 24(22): 16325.
- Tavakoli K, Pour-Aboughadreh A, Kianersi F et al. Applications of CRISPR-Cas9 as an Advanced Genome Editing System in Life Sciences. *BioTech (Basel)*. 2021, 10(3): 14.
- Khoshandam M, Soltaninejad H, Mousazadeh M et al. Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine. *Genes Dis*. 2023, 11(1): 268-282.
- Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc* 2019, 14, 2986-3012.
- Binnie A, Fernandes E, Almeida-Lousada et al. CRISPR-based strategies in infectious disease diagnosis and therapy. *Infection*. 2021; 49(3): 377-385.
- Serajian S, Ahmadpour E, Oliveira SMR et al. CRISPR-Cas Technology: Emerging Applications in Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021, 14(11): 1171.
- Lou J, Wang B, Li J et al. The CRISPR-Cas system as a tool for diagnosing and treating infectious diseases. *Mol Biol Rep* 2022, 49, 11301-11311.
- <https://www.who.int/data/gho/data/themes/chronic-viral-hepatitis> - посемена на 30.11.2024
- <https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids> - посемена на 30.22.2024 г.
- Gurrola TE, Eltah SN, Sariyer IK et al. Delivering CRISPR to the HIV-1 reservoirs. *Front Microbiol*. 2024, 15: 1393974.
- Khamakawin W, Saisawang C, Tassaneitirap B et al. CRISPR/Cas9 genome editing of CCR5 combined with C46 HIV-1 fusion inhibitor for cellular resistant to R5 and X4 tropic HIV-1. *Sci Rep* 2024, 14, 10852
- <https://crisprmedicine.com/news/clinical-trial-update-positive-clinical-data-for-first-ever-crispr-therapy-for-hiv/> Посемена на 01.12.2024
- Pacia DM, Brown BL, Minssen T et al., CRISPR-phage antibacterials to address the antibiotic resistance crisis: scientific, economic, and regulatory considerations. *J Law Biosci*. 2024, 11(1):1sa030.
- Hartwegger H, McGuire AT, Horning M et al. HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *J Exp Med*. 2019, 216(6): 1301-1310.
- Rydzek N, Hryhorowicz M, Zeyland J et al. CRISPR/Cas Technology in Pig-to-Human Xenotransplantation Research. *Int J Mol Sci*. 2021, 22(6): 3196.