



**КОМИСАРЕНКО**  
**Сергій Васильович** —  
академік НАН України,  
директор Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України



**РОМАНЮК**  
**Світлана Іванівна** —  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України

## РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМУ, АБО CRISPR/CAS9 – ПАНАЦЕЯ ВІД БАГАТЬОХ НЕВИЛІКОВНИХ ХВОРОБ ЧИ ПЕРШИЙ КРОК ДО ГЕННОГО АПОКАЛІПСИСУ?

*В огляді йдеться про історію відкриття, бурхливий розвиток і подальші перспективи застосування нового потужного інструменту для редагування геному — CRISPR/Cas9. Взввши за основу один з елементів захисної системи бактерій, вчені-біологи створили досить простий, дешевий і швидкий метод внесення змін у ДНК рослин, тварин і людини. Ніколи раніше людство не мало настільки точного знаряддя для маніпуляції генами, і це відкриває широкі можливості для профілактики та лікування багатьох захворювань. Водночас у суспільстві точаться гострі дискусії: благо чи зло несе людству CRISPR/Cas9? Як і будь-яка нова технологія, генне редагування викликає побоювання і піднімає низку серйозних етичних проблем, особливо щодо можливості його використання на клітинах зародкової лінії і геномі ембріонів людини. Проте вже зараз очевидно, що CRISPR/Cas9 — це не чергова модна «іграшка» для вчених, а революційна технологія, яка змінить наше майбутнє.*

**Ключові слова:** CRISPR/Cas9, редагування геномної ДНК, генна терапія, генетично модифіковані організми.

Історія науки знає багато прикладів, коли випадкове відкриття в непопулярній галузі науки приводило до наукового прориву, який уможлилював здійснення найзаповітніших мрій людства. Так було відкрито антибіотики, рентгєнівське випромінювання тощо. Ось і зараз ми є свідками розгортання подібної наукової революції в генетиці. Здається, у розпорядженні генетиків з'явився інструмент, здатний у короткий термін зробити наукову фантастику реальністю. Наукове співтовариство активно обговорює перспективи лікування раку та невиліковних спадкових захворювань шляхом видалення з організму дефектних генів. У геометричній прогресії зростає кількість наукових статей з цієї тематики, у пресі постійно з'являються повідомлення, інтерв'ю, точаться дискусії. Винуватцями такого «переполоху» є автори несподіваного відкриття, які у 2012 р.

розробили метод CRISPR/Cas9 для точного редагування геному живих організмів.

Відкриття CRISPR/Cas9 вже відзначено безліччю наукових нагород і, безсумнівно, заслуговує на найпрестижнішу наукову відзнаку — Нобелівську премію. Основна частина цієї статті була написана кілька років тому як передвісниця цієї події. Однак Нобелівський комітет з різних причин поки що не поспішає приймати позитивне рішення, зокрема, ймовірно, через судову тяганину щодо патентування цієї методики, яка триває останні роки. Незважаючи на це, практичне застосування технології CRISPR/Cas9 з кожним роком стає все більш широким і має численні здобутки в галузі біотехнології та медицини, значення яких для людства складно переоцінити. Тому, на нашу думку, є важливим і цікавим розглянути основні напрями та перспективи розвитку цієї технології, а також окреслити наявні проблеми.

З чого ж почалася історія відкриття CRISPR/Cas9? Як не дивно, з досліджень противірусного імунітету бактерій. У 50-х роках ХХ ст. вчені звернули увагу на те, що деякі штами бактерій легко заражаються вірусами, а інші штами того самого виду — стійкі до зараження. Двадцять років досліджень дали свої результати: виявилось, що стійкість певних бактеріальних штамів до вірусів пояснюється наявністю у бактерій спеціальних ензимів — рестриктаз (від лат. *restrictio* — обмеження), що розрізають вірусну ДНК. Цікавою особливістю цих ензимів є їх чітка специфічність до певної невеликої послідовності ДНК. Власну ДНК бактерія захищає від рестриктаз за допомогою метилювання нуклеотидних залишків аденіну та цитозину. Першу рестриктазу (EcoK) у 1968 р. виділили Метью Мезельсон (Matthew Meselson) і Роберт Юань (Robert Yuan) [1]. Здатність цих ензимів «різати» ДНК у чітко визначеній точці було використано вченими для одержання потрібних фрагментів геномної ДНК. У 1978 р. за відкриття рестриктаз та їх застосування в молекулярній генетиці Вернера Арбера (Werner Arber), Гамілтона Сміта (Hamilton O. Smith) і Даніела Натанса

(Daniel Nathans) було удостоєно Нобелівської премії. А в 1967 р. Бернард Вейсс (Bernhard Weiss) і Чарльз Річардсон (Charles Richardson) уперше виявили спеціальні «зшиваючі» ензими — ДНК-лігази [2]. Використання лігаз і рестриктаз дало можливість створювати штучні конструкції з ДНК живих організмів. Так з'явилася нова галузь науки — генна інженерія, яка дала можливість створювати генно-модифіковані організми (ГМО), рекомбінантні протеїни, індуковані стовбурові клітини тощо.

Що ж таке CRISPR/Cas9? І до чого тут противірусний імунітет бактерій?

Виявилось, що бактерії захищаються від вірусів не тільки за допомогою рестриктаз, адже вірус може не мати у своїй ДНК послідовності, необхідної для розщеплення цими ензимами. Є й інший, більш дієвий механізм, який надає бактеріям специфічний захист після зустрічі з певним вірусом. Цей механізм реалізує система з досить громіздкою назвою CRISPR/Cas9, або «криспер».

Коли ДНК вірусу проникає в бактерію, відбувається копіювання фрагмента цієї ДНК і перенесення його в спеціальне «сховище» інформації про віруси у власному геномі — CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами). Тут зразки ДНК різних вірусів (спейсери) накопичуються між однаковими короткими повторами бактеріальної ДНК і використовуються для виготовлення CRISPR РНК — сРНК (їх ще називають РНК-зондами або РНК-гідами), що специфічно розпізнають гени певних вірусів і зв'язуються з ними у разі повторного зараження. Завдяки сРНК вірусну ДНК знаходять спеціальні ензими — протеїни Cas (CRISPR-асоційовані протеїни), гени яких знаходяться поруч з масивом CRISPR. Ці ензими, як і рестриктази, є ендонуклеазами, тобто вони здатні розрізати ДНК вірусу, знешкоджуючи її.

Розглянемо докладніше, як саме працює система CRISPR/Cas9. Лідерна послідовність CRISPR відіграє роль промотора, з якого починається транскрипція всього масиву. Можливо, вона також розпізнається протеїнами,

які вставляють у CRISPR нові спейсери. Після транскрипції масиву CRISPR утворюється довга молекула РНК, до якої приєднується невелика РНК, комплементарна повторам (tracrРНК); до tracrРНК приєднується протеїн Cas9, який активується при взаємодії, а до Cas9, у свою чергу, приєднується ензим РНКаза III, що розрізає довгу РНК на фрагменти — crРНК та від'єднується. У *Streptococcus pyogenes*, наприклад, crРНК, що утворилися, складаються з 42 нуклеотидів: 22 кінцевих нуклеотиди — це половина паліндромного повтору, а решта 20 — унікальний спейсерний фрагмент. Фактично в результаті розрізання довгої РНК утворюється комплекс crРНК, tracrРНК і активованого протеїну Cas9. Спейсерна частина crРНК розпізнає комплементарну ділянку вірусної ДНК, а протеїн Cas9 замикається на двох нитках ДНК і «розрізає» їх, спричинюючи подальшу деградацію чужорідної ДНК [3].

Для успішного розпізнавання ДНК-«мішені» та її пошкодження необхідно, щоб протеїн Cas9 розпізнав певну коротку (3–9 нуклеотидів) послідовність PAM (Protospacer Adjacent Motif — мотив, що примикає до протоспейсера), яка знаходиться поруч з розпізнаною crРНК ділянкою ДНК. У різних видів бактерій ця послідовність різна; наприклад, для *Streptococcus pyogenes* послідовність PAM — 5'-NRG-3' (де N — будь-який нуклеотид, а R — А або G). Для чого потрібне розпізнавання PAM? Є припущення, що відсутність послідовностей PAM у складі власних генів бактерії захищає їх від розрізання системою CRISPR/Cas9, адже CRISPR містить 20 % спейсерів, націлених на власну ДНК [4]. Для чого ці спейсери зберігаються, невідомо. Можливо, у бактерій є якийсь механізм регуляції транскрипції власних генів, до якого залучений CRISPR та спеціальні протеїни.

Хто ж відкрив систему CRISPR/Cas9? Суперечки щодо цього питання тривають і досі. Адже в сучасній науці вже неможливо відкрити щось одноосібно. Історія відкриття, що спричинило революцію в генній інженерії, тривала протягом 25 років, і багато вчених зробили в неї свій внесок.

У 1987 р. японські вчені на чолі з Йосідзумі Ісіно (Yoshizumi Ishino) разом з геном іар, який вони досліджували, випадково клонували досить великий фрагмент геному кишкової палички *Escherichia coli*, який не кодував жодного протеїну [5]. Це було дуже дивно, оскільки бактерії, як правило, не мають зайвих послідовностей. Ділянка складалася з повторюваних послідовностей ДНК та варіабельних фрагментів ДНК між ними — спейсерів [6]. У 1993 р. науковці з Нідерландів під керівництвом Яна ван Ембдена (Jan D.A. van Embden) дослідили різноманітність перериваних прямих повторів серед різних штамів збудника туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*) і розробили новий метод диференціювання штамів, який використовується і сьогодні [7]. Пізніше іспанець Франсиско Хуан Мартінес Мохіка (Francisco Juan Martínez Mojica) знайшов подібні ділянки в інших видів бактерій та архей і в 2000 р. запропонував об'єднати їх у родину під назвою SRSRs (Short Regularly Spaced Repeats — короткі регулярно розташовані повтори) [8], яку через два роки перейменували на CRISPR. Тоді ж, у 2002 р., група вчених з Нідерландів на чолі з Рууд Янсенем (Ruud Jansen) відкрили гени протеїнів Cas, розташовані поруч з ділянкою CRISPR [9]. А в 2005 р. відразу три дослідницькі групи незалежно одна від одної з'ясували, що між повторами CRISPR часто знаходяться послідовності, ідентичні послідовностям ДНК вірусів-бактеріофагів і плазмід [10–12]. Ці результати та припущення про виконання CRISPR функції противірусного захисту не викликали тоді особливого інтересу.

Усе змінила наукова стаття, яка вийшла в журналі Science в 2007 р. [13]. Її авторами була група вчених на чолі з Філіпом Хорватом (Philippe Horvath) з компанії Danisco (США) — виробника відомих йогуртів Danone (у 2011 р. Danisco придбала компанія DuPont за \$6,3 млрд). Справа в тому, що при виробництві кисломолочних продуктів є небезпека зараження молочнокислих бактерій вірусами-бактеріофагами, що може призвести до величезних збитків. Тому в компанії Danisco

вирішили відібрати для виробництва клони молочнокислих бактерій, стійких до вірусу. А оскільки компанія використовувала CRISPR для класифікації своїх комерційних штамів, учені одразу помітили, що в ділянках CRISPR відібраних клонів з'являлися нові спейсери, які були тотожні ділянкам вірусного геному. Дослідники штучно вставили спейсер з послідовністю ДНК вірусу в ділянку CRISPR бактерії, що одразу ж зробило її стійкою до вірусу.

У 2007–2008 рр. було відкрито важливі деталі механізму роботи CRISPR. Група під керівництвом Джона ван дер Ооста (John van der Oost), наприклад, показала, що захист CRISPR реалізується через малі РНК [14]. Лучіано Марраффіні (Luciano A. Marraffini) та Ерік Сонтгеймер (Erik J. Sontheimer) з Північно-Західного університету в Еванстоні (штат Іллінойс, США) довели, що система CRISPR спрямована на розрізання ДНК [15]. Вони першими висловили думку про можливість використання CRISPR для редагування геному в гетерологічних системах і навіть подали заявку на патент, але через недостатність експериментального підтвердження врешті-решт відмовилися від нього [16].

Згодом стало відомо, що для виконання захисної функції CRISPR необхідна взаємодія з багатьма протеїнами Cas, одні з яких зв'язуються з малими РНК, інші — розпізнають ДНК вірусу, а треті — розрізають її. Однак французька дослідниця Еммануель Шарпентьє (Emmanuelle Charpentier), яка працює зараз переважно в Німеччині та Швеції, виявила різновид системи CRISPR, який для повноцінного захисту потребував лише одного дуже великого протеїну Cas — його назвали Cas9. У 2012 р. Мартін Джінек (Martin Jinek) з групи Дженніфер Дудни (Jennifer Doudna) з Каліфорнійського університету в Берклі (University of California, Berkeley) об'єднав tracrPНК і crPНК в одну єдину молекулу sgPНК (single-guide RNA — єдина РНК-гід) і створив вектор для клонування цієї РНК. Виявилося, що така синтетична sgPНК коректно працює в клітині у комплексі з протеїном Cas9. Тоді ж наукові групи Е. Шарпентьє і Дж. Дуд-

ни опублікували статтю в Science [17], в якій запропонували спосіб використання системи CRISPR/Cas9 для розрізання обраних дослідником ДНК-«мішеней» у клітині та продемонстрували можливість такого підходу в експериментах *in vitro*. Майже одночасно з ними подібну статтю опублікувала група литовського біохіміка Віргініюса Шикшніса (Virginijus Siksnys) з Інституту біотехнології Вільнюського університету [18]. Цікаво, що роботу Шикшніса було виконано раніше, але її публікація затрималася на пів року через безпідставне відхилення в журналом Cell.

На початку 2013 р. групи Джорджа Черча (George Church) [19] і його колишнього аспіранта Фена Чжана (Feng Zhang) [20] з Інституту Броуд (Broad Institute of MIT and Harvard) у Кембриджі показали, що штучна crPНК і протеїн Cas9 повноцінно функціонують у клітинах вищих організмів. Практично водночас ефективність такого підходу підтвердили вчені з Південної Кореї в експериментах з культурою клітин людини [21]. Одразу після цього всі забули про проблеми бактерій в їх непростій боротьбі з вірусами. Здавалося, що наукові та громадські видання «вибухнули» публікаціями виключно на одну тему: про CRISPR/Cas9 як фантастичний інструмент для редагування геномів вищих організмів.

Чому ж відкриття технології CRISPR/Cas9 спричинило такий ажіотаж? Річ у тім, що ця технологія виявилася набагато кращою за попередні методи генної інженерії. Раніше при створенні ГМО вчені не мали можливості контролювати, куди саме в геномі та в якій кількості вбудується вірусний вектор з геном-вставкою. Щоб отримати необхідний результат, потрібно було провести дуже копітку і тривалу роботу, відкидаючи значну кількість невдалих варіантів. Технологія CRISPR/Cas9 запропонувала простий спосіб вбудовувати ген-вставку в певну послідовність ДНК. Крім того, ця технологія дає можливість працювати в клітинах усіх організмів — від бактерій до ссавців. Систему CRISPR/Cas9 можна використовувати не лише в пробірці, як рестриктази, а й безпосередньо в живій клітині. Можна



одночасно редагувати необмежену кількість генів у геномі, а також вводити компоненти системи не тільки в окремі клітини, а й у цілі тканини чи весь організм. Беззаперечні переваги CRISPR/Cas9 значно скорочують тривалість генно-інженерних робіт і дозволяють уже зараз розглядати реальну можливість застосування цієї системи для модифікації ембріонів людини, лікування раку чи спадкових захворювань.

Звичайно, є й інші інструменти для редагування геному, а саме: мегануклеази, TALEN і нуклеази з «цинковими пальцями» (ZFN — Zinc-Finger Nucleases). Мегануклеази — це природні ДНК-нуклеази, які є у фагів, бактерій, грибів, водоростей і деяких рослин. Вони кодується мобільними генетичними елементами та розпізнають великі ділянки ДНК (12–40 пар основ), завдяки чому їх вважають найбільш специфічними природними рестриктазами. З моменту відкриття в 1990-х роках найвідомішими стали мегануклеази I-SceI, I-CreI і I-DmO1 родини LAGLIDADG (назва походить від характерної для цих протеїнів послідовності). Ці невеликі протеїни трапляються в мітохондріях та хлоропластах еукаріотичних одноклітинних організмів і відомі своїми тісно упакованими тривимірними структурами. Однак широкого застосування в генній інженерії мегануклеази не отримали, оскільки досить складно підібрати серед них ензим, який розрізав би ДНК у потрібному місці. Зараз вчені намагаються створити більш досконалі генно-інженерні мегануклеази та їх гібриди з іншими протеїнами [22]. Системи редагування геному TALEN і ZFN — це генно-інженерні протеїни, які містять домен ДНК-нуклеази, що розщеплює ДНК, і домени інших протеїнів, що після модифікації набувають здатності зв'язуватися з певною послідовністю ДНК. До складу протеїнів TALEN входить домен протеїну TALE (Transcription Activator-Like Effector — ефектор, подібний до активатора транскрипції) фітопатогенної бактерії *Xanthomonas*, а протеїни ZFN містять домен еукаріотичного фактора транскрипції, в структурі якого є від 3 до 6 структур так званих «цинкових пальців».

Проте застосування систем TALEN і ZFN для редагування геному вимагає створення окремого штучного протеїну для кожної нової ДНК-«мішені». На відміну від них, система CRISPR використовує універсальний протеїн Cas9, а змінювати необхідно лише sgPНК. Це набагато простіше і дешевше, оскільки будь-які PНК можна легко синтезувати. Ще однією перевагою системи CRISPR/Cas9 перед іншими інструментами редагування геному є можливість застосування її до PНК, що надає більш гнучкі можливості для впливу на біохімічні процеси в клітині. Для редагування одноклітинної PНК необхідно додати sgPНК, протеїн Cas9 і ДНК-олігонуклеотид, що містить послідовність PAM, — PAMmer [23]. Так, у 2016 р. було запропоновано за допомогою системи CRISPR/Cas9 відстежувати частку певних PНК у живій клітині без застосування генетичних міток — тегів [24].

Біотехнологічні фірми вже давно продають вектори для зручної доставки в клітину компонентів системи CRISPR/Cas9 з метою редагування геному. Компанія відкритого обміну Addgene (Кембридж, США) восени 2018 р. зробила великий крок, безкоштовно передавши понад 1 млн плазмід ученим усього світу, а нещодавно в неї з'явилася нова послуга — поширення вірусних векторів, передусім лентивирусів та адено-асоційованого вірусу (AAV) [25]. Вектори для CRISPR/Cas9 являють собою кільцеву молекулу ДНК, яка кодує sgPНК і матричну PНК протеїну Cas9. Отже, дослідник може розрізати будь-яку послідовність ДНК у клітині, включивши в sgPНК відповідний комплементарний фрагмент. Звичайно, необхідно вибрати таку послідовність, яка не повторюється в інших ділянках геному. Далі вектор розмножують у клітинах спеціального лабораторного штаму кишкової палички (де він не зчитується через невідповідність командних сигналів), виділяють з бактерій і трансформують ним клітини, геном яких хочуть змінити.

Вчені всього світу кинулися використовувати технологію CRISPR/Cas9 для редагування геномів вірусів, бактерій, тварин і рослин.

Застосування цієї технології до бактерій дозволило зі змішаної культури виділяти окремі види і штами. Успішно було модифіковано дріжджі, плодкових мушок, рибок данію, шовкопрядів, жаб. Ін'єкції матричної РНК Cas9 і sgРНК у клітини зародка дозволили швидко отримати генно-модифікованих мишей, щурів, свиней, тхорів, коропів і навіть слонів. Отже, відкрилися практично безмежні перспективи створення ГМО для боротьби з хворобами, поліпшення порід сільськогосподарських тварин і сортів рослин, створення моделей для вивчення генетичних захворювань людини та тварин, тестування нових методів лікування і навіть створення домашніх улюбленців.

У багатьох країнах, зокрема у США, організми, модифіковані за допомогою CRISPR, не відносять до ГМО, оскільки вони не містять чужорідної ДНК, а тому можна відносно легко отримати дозвіл на вирощування модифікованих CRISPR-рослин і виготовлення з них продуктів харчування. Першими в квітні 2016 р. такий дозвіл від Міністерства сільськогосподарства США отримали печериці садові (*Agaricus bisporus*), яких за допомогою CRISPR позбавили здатності темнішати за механічних ушкоджень і втрачати товарний вигляд. Модифіковані гриби одержав американський вчений Їнонг Янг (Yinong Yang) з Університету штату Пенсильванія. Відтоді дозвіл на вирощування було надано ще для 5 організмів, модифікованих CRISPR, зокрема рижію посівного (*Camelina sativa*) — олійної культури, що містить більше омега-3 жирних кислот, а також сорту сої, стійкого до посухи. Невдовзі планується вихід цих продуктів на ринок [26].

Технологія редагування генів здатна підвищити ефективність сільськогосподарства та допомогти прогодувати зростаюче населення планети, зменшивши при цьому негативний вплив людини на навколишнє середовище. Дослідники планують вирощувати курей, що не викликають алергії у людини, відновити чисельність медоносних бджіл, які потерпають у всьому світі від хвороб і паразитів. Також пропонують застосувати CRISPR для контролю статі сільськогосподарських тварин: велика

рогата худоба має народжувати тільки бичків, що дають більше м'яса; включення гена зеленого флуоресцентного протеїну (GFP) у статеві хромосоми курей дозволить відбракувати за світінням в ультрафіолеті яйця, з яких вилупляться півники, і використовувати їх у виробництві вакцин. Однак оскільки при редагуванні геному CRISPR може змінювати нецільові гени, висловлюється припущення, що це може вплинути на здоров'я тварин, на склад м'яса та молока. Тому поки що споживачі вимагають обережності у застосуванні нових технологій для тварин, яких використовують у виробництві продуктів харчування [27].

Можливість модифікації геномів екзотичних і маловивчених тварин спричинила «хвилю» масового створення нових модельних організмів. Розроблення моделей тварин потребує величезних витрат часу й коштів. У 2016 р. Національний науковий фонд США запустив програму вартістю \$24 млн для створення нових модельних організмів. Програма підтримує дослідження геномів видів, вивчення життєвих циклів організмів та розроблення протоколів для утримання цих видів у лабораторії. В рамках програми у березні 2019 р. за допомогою CRISPR було створено першу генетично модифіковану рептилію — коричневого аноліса (*Anolis sagrei*) [28].

Технологія CRISPR стала цінним інструментом фундаментальних досліджень, який дає змогу «вимикати» певні гени та встановлювати їх біологічну функцію в організмі. Розкриття генетичних і молекулярних механізмів, які зумовлюють складні ознаки та поведінку, є особливо важливим для маловивчених видів тварин. Так, за допомогою CRISPR було ідентифіковано гени, які контролюють візерунок і колір крил метелика [29], створено модифікованих рейдерських мурах (*Ooceraea biroï*), які не мають запаху феромонів і не можуть підтримувати складну ієрархію колонії. Технологія CRISPR допомогла вивчити мозкову діяльність головоногих молюсків (гавайського кальмара бобтейла *Euprymna scolopes* та карликової каракатиці *Sepia bandensis*) під час зміни візерунків на шкірі залежно від зовнішнього

середовища. Раніше подібні дослідження не проводилися через відсутність у молосків кісток і неможливість закріплення електродів на голові тварини [28].

Інактивувати ген без його пошкодження можна за допомогою CRISPR-інтерференції (CRISPRi). При цьому мутантний протеїн dCas9, у якого не функціонують обидва нуклеазних центри, зв'язується з ДНК-«мішенню» і заважає просуванню РНК-полімерази, що призводить до зупинення транскрипції [30]. Якщо до протеїну dCas9 «прив'язати» домен фактора транскрипції, який збільшує або пригнічує активність генів, то можна безпосередньо впливати на функціонування генів і роботу всього організму. Регулювати активність експресії генів можна також, впливаючи на епігеномні процеси (наприклад, на метилювання ДНК чи ацетилювання гістонів). Для цього можна використати штучні протеїни, що складаються з dCas9 та каталітичного домену відповідного ензиму (ДНК-метилтрансферази чи ацетильтрансферази гістонів) [31]. «Мішенню» системи CRISPR/Cas9 можуть бути також довгі некодуєчі РНК (lncRNA) або енхансерні РНК (eRNA), які регулюють експресію генів і епігенетичні процеси [32]. Це дуже важливо для дослідження функцій регуляторних РНК і встановлення їх ролі в патогенезі захворювань, оскільки понад 90% захворювань, пов'язаних з одиничною нуклеотидною заміною, містять цю заміну в некодуєчих ділянках ДНК [33]. За допомогою CRISPR/Cas9 можна доставляти до мутантних генів протеїни, здатні замінити дефектний ген на його здорову копію з іншої хромосоми, що може стати основою нових методів лікування деяких захворювань, наприклад діабету. А приєднавши до протеїну dCas9 флуоресцентний протеїн GFP, можна позначити певну ділянку в хромосомі живої клітини і спостерігати за нею під мікроскопом протягом клітинного циклу або візуально визначити довжину теломер [34]. У 2019 р. у Каліфорнійському університеті в Берклі було створено біосенсор CRISPR-Chip на основі ультрочутливого графену та системи CRISPR/Cas9, який дозволяє протягом 15 хв виявляти

певні послідовності ДНК без її ампліфікації з чутливістю 1,7 fM ( $1,7 \cdot 10^{-15}$  Моль) [35]. Німецькі вчені з Університету Фрайбурга розробили електрохімічний мікрофлюїдний біосенсор, який виявляє до восьми мікроРНК в одному зразку за допомогою CRISPR/Cas13a. Цей біосенсор має універсальний чип і легко налаштовується на виявлення будь-якої мікроРНК. Він може бути використаний для ранньої діагностики захворювань людини, оскільки кластери з 5–6 мікроРНК, як правило, є хорошим біомаркером, зокрема при хворобі Альцгеймера або різних типах раку. Подібні біосенсори, що використовують різні типи ензиму Cas, можуть спрямовуватися на виявлення специфічних послідовностей в одно- або дволанцюговій ДНК і РНК збудників інфекційних захворювань. Така система, наприклад, здатна визначати кількість РНК коронавірусу, його тип (SARS або Covid19) і навіть диференціювати поодинокі невідповідності нуклеїнової кислоти [36]. Отже, як бачимо, можливості системи CRISPR/Cas9 не обмежуються лише розрізанням певних послідовностей ДНК. Ця система є універсальним механізмом доставки будь-яких молекул у будь-яку «точку» геному, що відкриває фантастичні можливості для медицини та фундаментальної науки.

Ученим, що зробили найбільший внесок у відкриття технології CRISPR/Cas9, щороку проорокують Нобелівську премію, а в її очікуванні — відзначають іншими численними нагородами. Найбільшу кількість відзнак зібрала Дж. Дудна (29 за останні 6 років), серед яких: премія Мілдред Кон з біологічної хімії від Американського товариства біохіміків і молекулярних біологів (2013), премія Лур'є в галузі біомедичних наук від Фонду Національного інституту здоров'я, премія «Прорив» у галузі наук про життя, премія доктора Поля Янссена з біомедичних досліджень, премія Якоба Хескеля Габбая (2014), нагорода принцеси Астурійської, премія Грубера в галузі генетики (2015), премія фонду Уоррена Альперта, премія Пауля Ерліха та Людвіга Дармштедтера, премія Л'Ореаль–ЮНЕСКО для жінок у науці, премія доктора Г.П. Хайнекена з біохі-

мії та біофізики від Нідерландської королівської академії мистецтв і наук, Міжнародна премія канадського фонду Gairdner, премія Тан Тайванської академії Sinica (2016), премія Японії, медаль Ф. Альберта Коттона за досконалі хімічні дослідження (2017), премія Кавлі з нанонауки, Круніанська медаль і лекція від Лондонського королівського товариства, премія Перла Майстра Грінгарда від Університету Рокфеллера, медаль пошани від Американського товариства раку (2018), премія Ніренберга (2019), премія Вольфа з медицини (2020) та ін. Дженніфер Дудна та Еммануель Шарпентьє в 2015 р. увійшли до сотні найвпливовіших людей світу за версією журналу Time, в 2016 р. Дж. Дудна стала іноземним членом престижного Лондонського королівського товариства, а в 2018 р. увійшла до американського списку 50 найвидатніших жінок у галузі техніки за версією журналу Forbes [37].

У січні 2014 р. за допомогою системи CRISPR/Cas9 китайські вчені модифікували геном макак. Від однієї матері народилися дві мавпочки, яким успішно ввели мутації в ген Pparg- $\gamma$ , відповідальний за відкладення жиру, а також у ген Rag1, пов'язаний з роботою імунної системи, а саме з процесом утворення різноманітня антитіл [38]. Після успіху з мавпами всі зрозуміли, що настала черга людини.

І дійсно, дуже заманливо, виправивши всю одну нуклеотидну основу в ДНК, звільнити людину від важкої спадкової хвороби, наприклад гемофілії. Послідовність ДНК довжиною в 20 нуклеотидів, яка є «мішенню» для системи CRISPR/Cas9, як правило, не повторюється в геномі людини. Після розрізання протеїном Cas9 ДНК відновлюється завдяки репарації за зразком правильної копії гена з парної хромосоми. Якщо парної хромосоми немає (наприклад, при гемофілії помилка знаходиться в X-хромосомі, яка у чоловіків лише одна), то можна ввести в клітину разом з sgRNA і протеїном Cas9 фрагмент з правильною послідовністю ДНК потрібного гена. Крім того, за допомогою CRISPR/Cas9 можна вимикати окремі гени та ідентифікувати ті, що відповідають за виживання клітин при раку [39]. А виявивши

в окремих клітинах організму мутації, які ведуть до розвитку раку, можна за допомогою CRISPR/Cas9 усувати їх [40]. Для швидкого редагування будь-яких генів людини створено величезну бібліотеку, що містить 73 000 різних sgRNA і охоплює 80–90 % всіх послідовностей геному [41].

Однак невідомо, як відреагує організм людини на втручання в геном. Тому можливість редагування генів людини одразу поставила низку етичних проблем, особливо гострих у разі редагування генів ембріона людини. Чи мають право вчені або батьки майбутньої дитини приймати рішення про зміну генів ембріона, про зміну сутності людини, яка має народитися? Адже у цієї людини ніхто не питає згоди, оскільки вона ще не існує. Де гарантія, що прийняті зараз рішення згодом виявляться такими розумними, якими вони видаються зараз? Чи готові вчені взяти на себе відповідальність за непередбачені наслідки таких експериментів? І що взагалі стане з людиною, якщо вона почне змінювати свої гени як заманеться? Ці питання зараз є предметом палких дискусій, і поки що вони не мають однозначних відповідей.

Однак через надзвичайно спокусливі перспективи редагування геному людини за допомогою CRISPR/Cas9 виникли побоювання, що його можуть розпочати раніше, ніж переконаються в безпеці. Тому 24 січня 2015 р. Дженніфер Дудна зібрала в долині Напа в Каліфорнії 18 авторитетних генетиків для обговорення цієї проблеми. В конференції взяв участь нобелівський лауреат Пол Берг (Paul N. Berg), який організував у 1975 р. на території Державного парку-пляжу Асиломар у місті Пасифік Гроув у Каліфорнії знамениту Асиломарську конференцію, на якій було прийнято правила роботи в генній інженерії та запроваджено мораторій на використання технологій рекомбінантних ДНК. Після цього мораторії вводили ще двічі: у 1997 р. — на репродуктивне клонування людини і в 2012 р. — на роботи з мутагенезу вірусу пташиного грипу. Підсумки конференції у долині Напа опубліковано 3 квітня 2015 р. в журналі Science у вигляді меморандуму, який закликає заборонити клінічні експерименти



з генетичної модифікації людини доти, доки не будуть зрозумілі наслідки і введені правила [42]. Коментуючи висновки конференції в Напі, Джордж Черч влучно зауважив, що на ній скромно замовчувалося головне питання: «Який же сценарій нас хвилює насправді: що методики редагування геному будуть працювати не досить добре або ж що вони, навпаки, будуть працювати дуже добре?» [43].

Редагування геному людини відкрило теоретичну можливість не лише лікувати генетичні захворювання, а й створювати людей з бажаними ознаками. Одразу воскресли забуті після Другої світової війни ідеї створення «надлюдини» та ідеї евгеніки — вчення про поліпшення людської породи, яке було запропоноване Френсісом Гальтоном (Francis Galton), двоюрідним братом Чарльза Дарвіна. А й справді, чому б не створити більш досконаліх людей: розумніших, красивіших, сильніших? Хоча при цьому неодмінно з'являються й ідеї створення людей з певним призначенням, наприклад ідеальних солдатів: сильних, витривалих, без відчуття болю і страху. Страшно подумати, які можуть бути наслідки таких фантастичних можливостей науки. Тому, звичайно, люди ставляться до успіхів генетики з пересторогою. На жаль, а може і на щастя, ми не маємо достатньо знань щодо генетики складних людських ознак. Можливо, генетика взагалі не відіграє вирішальної ролі у формуванні таких ознак. Однак багато хто вбачає в технології CRISPR/Cas9 перший крок до створення нової раси людей — генних мутантів, передрікає появу зомбі, змішання видів і всезагальний генний апокаліпсис.

У звіті з оцінки світових загроз для США від 9 лютого 2016 р. директор національної розвідки Джеймс Р. Клаппер (James R. Clapper) назвав редагування геному потенційною зброєю масового знищення, оскільки біологічні агенти або продукти, створені в країнах з нормативними або етичними стандартами, «відмінними від західних», можуть виявитися шкідливими. В документі стверджується, що поширення, низька вартість та прискорені темпи розвитку технології CRISPR/Cas9, навмисне або нена-

вмисне зловживання нею можуть призвести до далекосяжних наслідків для економічної та національної безпеки США [44].

Водночас простота технології CRISPR/Cas9 і доступність у США реактивів для її реалізації дали можливість біоакерам втручатися в геном живих організмів у домашніх умовах, не маючи особливих навичок і обладнання. Так, колишній вчений NASA Джозая Зайнер (Josiah Zauner), який має кандидатський ступінь з біохімії Чиказького університету, заявив, що він є першою людиною, яка намагалася модифікувати свій власний геном за допомогою інноваційної технології редагування генів CRISPR. За словами Зайнера, він почав експериментувати з CRISPR у своєму гаражі влітку 2016 р., вводячи собі ген GFP, який спричиняє світіння медуз. Сам він світитися не почав, але біопсія показала, що новий ген присутній у його клітинах. Компанія Зайнера The Odin займається продажем комплектів «Зміни свої гени сам» вартістю у \$20, однак FDA заборонило поширення цього продукту, назвавши його шахрайським. Тепер біоакер пропонує клієнтам купувати інструменти для генного редагування рослин і тварин.

Таких випадків досить багато: підлітки, студенти, генетики-аматори намагалися застосувати технологію CRISPR для того, щоб збільшити власні м'язи, позбавитися герпесу або вилікувати СНІД, однак ці спроби були безуспішними. Неконтрольоване поширення технології CRISPR становить неабияку небезпеку через можливість створення біологічної зброї та загрозу біотероризму. Дослідники з Університету Альберти в Едмонтоні (Канада) відтворили з нуля вимерлий вірус чорної віспи. Вони придбали у комерційної компанії фрагменти ДНК, що перекриваються, зшили їх разом і ввели в клітини, заражені іншим типом поксвірусу. Робота тривала пів року і коштувала приблизно \$100 тис. Цей експеримент звів нанівець десятиліття дебатов щодо того, чи знищувати два зразки чорної віспи у світі: в Центрі контролю та профілактики хвороб в Атланті (США) та в Державному науковому центрі вірусології та біотехнології «Вектор» у Кольцові під Новосибірськом (РФ), адже він довів, що

вчені, які хочуть експериментувати з вірусом віспи, можуть створити його самостійно. Подібні роботи повинні проводитися під суворим контролем з боку держави, але це складно зробити, оскільки значна частина наукових досліджень здійснюється за гроші комерційних організацій, а фінансування легко можна залучити через вебсайти краудфандингу. Клоновані фрагменти ДНК можна замовити через спеціальні інтернет-сайти (наприклад, Science Exchange), однак невдовзі і в цьому не буде потреби, оскільки на столі у кожного біоакера буде стояти принтер для синтезу ДНК BioXp 3200, який продається приблизно за \$65 тис. і нагадує струменевий принтер, у якому замість кольорової палітри СМΥК використовують букви генетичного коду — AGTC. А свої домашні експерименти біохікери можуть почати з ДНК-платформи від Amino Labs, генетичної духовки Easy Bake, яка коштує менше, ніж iPad, або з набору для редагування генів CRISPR від The Odin за \$159 [45].

Незважаючи на заклики про заборону експериментів із генетичної модифікації людини, 14 квітня 2015 р. в журналі *Protein&Cell* з'явилася стаття групи китайських генетиків під керівництвом Цзюньцзю Хуана (Junjiu Huang) з Університету Сунь Ятсена в Гуанчжоу, в якій описувався експеримент з використання системи CRISPR/Cas9 для редагування геному людського ембріона [46]. Метою роботи було виправлення мутації в одному з генів гемоглобіну, яка призводить до хвороби крові — бета-таласемії. Це була перша в історії спроба генетично модифікувати людину. Журнали *Science* і *Nature* відмовилися від публікації цієї статті з етичних міркувань, хоча в експерименті було використано людські яйцеклітини, штучно запліднені двома сперматозоїдами для того, щоб експериментальні зародки були завідомо нежиттєздатними та загинули через певну кількість поділів. Експеримент тривав 48 годин, його перервали на стадії восьмиклітинних ембріонів.

У результаті з 86 запліднених яйцеклітин мутацію вдалося виправити лише в 4 ембріонах (приблизно 5%). Можливо, такий низь-

кий відсоток успішних генних модифікацій пов'язаний з триплоїдністю клітин. Однак була ще одна неприємна новина: в усіх клітинах ембріонів з'явилася значна кількість нових мутацій в інших генах унаслідок неспецифічної взаємодії sgРНК з іншими подібними послідовностями ДНК, а також через помилки ензимів репарації.

Такі результати викликали небезпідставні побоювання, що систему CRISPR/Cas9 взагалі ніколи не можна буде використовувати для експериментів на людині. Чи можна якось поліпшити її точність? Адже при створенні ГМО або навіть стовбурових клітин людини з великої кількості невдалих варіантів можна обрати найбільш придатний, а ембріон людини є унікальним, і в цьому разі необхідно використовувати максимально точний і абсолютно безпечний інструмент.

Для підвищення точності системи CRISPR/Cas9 пропонували різні ідеї. Наприклад, було отримано Cas9-ніказу — модифікований протеїн Cas9, у якого працює тільки один нуклеазний центр, і тому він робить лише одноланцюгові розриви ДНК. Використовуючи дві такі нікази з різними sgРНК, можна значно підвищити точність розрізання ДНК у потрібному місці [47]. Інша ідея полягала у використанні sgРНК з вкороченою спейсерною частиною. Ймовірно, що з ДНК-«мішенню» спочатку зв'язується лише невелика ділянка спейсера, для якої комплементарність строго дотримується, а лише потім — інша частина спейсера, для якої можливі відхилення до 3–5 пар нуклеотидів. Завдяки такій неточності бактерія може розпізнавати і знешкоджувати мутовані фаги [48]. Одним з напрямів роботи з вдосконалення CRISPR/Cas9 стала зміна специфічності протеїнів Cas9 різних видів бактерій відносно послідовностей PAM [49]. Ще один підхід, який дозволив підвищити специфічність системи CRISPR/Cas9 у 140 разів, полягав у використанні замість Cas9 гібридного протеїну fCas9, який складається з інактивованого мутантного протеїну dCas9 і каталітичного домена неспецифічної ДНК-нуклеази FokI бактерії *Flavobacterium okeanoikoites* [50].

У 2016 р. пролунало кілька гучних заяв про досягнення мети — зниження кількості помилок системи CRISPR/Cas9 практично до нуля. Одні дослідники отримали протеїн eSpCas9 заміною трьох позитивно заряджених амінокислотних залишків на нейтральні в ділянці протеїну Cas9 бактерії *Streptococcus pyogenes*, яка взаємодіє завдяки своїй позитивно зарядженій борозенці з негативно зарядженою ДНК. Ослаблення сили взаємодії протеїну Cas9 з ДНК призвело до зменшення кількості неспецифічних взаємодій [51]. Інші дослідники отримали високоточний ензим SpCas9-HF1 і протестували його з вісьмома різними sgPНК. Він зробив лише одну помилку, тоді як вихідний ензим Cas9 зробив сім помилок [52]. Вчені з Пітсбургського університету (штат Пенсильванія, США) розробили підходи до умовної активації функції протеїну Cas9 за допомогою малих молекул і світла. Ці методи привели до підвищення специфічності системи CRISPR/Cas9 і дозволили активувати її в певному місці і на певний проміжок часу [53].

У серпні 2017 р. було опубліковано обнадійливі результати досліджень, проведених великим колективом вчених (31 дослідник з 10 наукових установ США, Китаю та Південної Кореї, половина — з Центру ембріональної клітини та генної інженерії Університету здоров'я та науки Орегону у Портленді, США) під керівництвом Шухрата Міталіпова (Shoukhrat Mitalipov) — уйгура за національністю родом з Казахстану, відомого своїми успішними експериментами з клонування приматів і людини, а також заміни мітохондріального геному в клітинах їх ембріонів [54–57]. Дослідники винайшли спосіб цілеспрямованої корекції мутацій генів у ембріонах людини за допомогою CRISPR/Cas9 і продемонстрували його ефективність на прикладі редагування гетерозиготної мутації MYBPC3, що викликає гіпертрофічну кардіоміопатію — спадкове захворювання серця, яке неминуче призводить до смерті людини. Введення компонентів системи CRISPR/Cas9 в ооцит разом зі сперматозоїдом, що несе мутацію MYBPC3, під час метафазі II клітинного циклу дозволило уникнути

утворення мозаїчних ембріонів, частина клітин яких має мутації в генах. Крім того, такий підхід дав змогу збільшити до 72,4 % вихід ембріонів, що несуть ген MYBPC3 дикого типу без ознак будь-яких мутацій, завдяки вчасній деградації компонентів системи CRISPR/Cas9, а також завдяки зростанню частоти репарації дволанцюгових розривів ДНК за механізмом гомологічно спрямованої репарації (HDR), яка відновлює ДНК точно за зразком гомологічного гена матері дикого типу, на відміну від механізму негомологічного з'єднання кінців (NHEJ), який вносить помилки в послідовність ДНК у місці розриву і зазвичай є менш ефективним [58].

У листопаді 2018 р. китайський дослідник Хе Цзянькуй (He Jiankui) з Південного університету науки і техніки у Шеньчжені несподівано заявив, що він створив перших у світі генетично відредагованих дітей — дівчат-близнюків Лулу і Нану, які не здатні заразитися вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) через модифікацію гена CCR5. У 2019 р. народилася ще одна модифікована дитина в рамках цього проекту. Ці заяви спровокували скандал і поліцейське розслідування в Китаї та обурення світової наукової громадськості. Вченого звинуватили у підробці документів з етичного нагляду, порушенні низки китайських законів, в тому, що він задля особистої слави на самотужки зібрані кошти організував проектну групу з іноземців і залучив 8 пар добровольців (з ВІЛ-позитивним батьком і ВІЛ-негативною матір'ю) для проведення сумнівних експериментів. Звинувачення вчених ґрунтуються на відсутності медичної доцільності такої модифікації, адже діти були здорові, а для перевірки успішності експерименту їх тепер треба заразити ВІЛ [59]. На закритому для громадськості суді Хе Цзянькуя було засуджено до трьох років ув'язнення та оштрафовано на 3 млн юанів (\$430 тис) за проведення «незаконної медичної практики», його колеги Чжан Ренлі (Zhang Renli) та Цінь Цзінчжоу (Qin Jinzhou) отримали відповідно 24 та 18 місяців ув'язнення умовно. Всі троє визнали свою провину, їм довічно заборонили брати участь у

дослідженнях, пов'язаних з репродуктивною медициною [60].

Однак справа Хе Цзянькуя продовжує жити. В червні 2019 р. російський дослідник Денис Ребриков з Російського національного дослідного медичного університету ім. М.І. Пирогова заявив, що також планує створити немовлят з редагованим геном, що запобігатиме зараженню дітей ВІЛ від інфікованих матерів. Пізніше він змінив свої наміри, обравши «мішенню» ген GJB2, пов'язаний зі спадковою втратою слуху. В серпні 2019 р. репродуктивний біолог з Нью-Йорка Джанпієро Палермо (Gianpiero D. Palermo) оприлюднив свої плани щодо використання технології CRISPR для редагування в клітинах людської сперми гена, який збільшує ризик виникнення раку. Невідомо, наскільки ці плани є близькими до втілення, однак такі заяви є попередженням про те, що найближчим часом знайдуться й інші люди, які намагатимуться ввести в геном людини зміни, здатні успадковуватися майбутніми поколіннями [61, 62].

Вчені, які готові створювати дітей з редагованими генами, мріють покращити світ, позбавити людство від небезпечних захворювань. Однак внесені мутації, захищаючи від однієї небезпеки, можуть наражати організм на інші. Так, з'ясувалося, що мутації гена CCR5, який кодує рецептор для ВІЛ, скорочують життя людей у середньому на 1,9 року. Причиною цього є багатофункціональність більшості генів, яка в разі мутації гена призводить до зміни цілого комплексу ознак, не завжди бажаних і корисних. Є припущення, що мутація гена CCR5 виникла на півночі Європи для захисту від бубонної чуми (вона майже не трапляється в Азії, а у Великій Британії її мають 10% населення). Яку б перевагу не отримував організм з мутованим CCR5 раніше, це не означає, що мутація є корисною сьогодні. Дані інших дослідників свідчать, що люди з мутантною версією CCR5 мають більшу ймовірність смерті від грипу [63].

На зібранні провідних учених з семи країн світу з проблем CRISPR, яке відбулося у березні 2019 р. під керівництвом американсько-

го математика і генетика Еріка Лендера (Eric Lander), відомого як один з керівників проекту «Геном людини», було вирішено закликати до п'ятирічного міжнародного мораторію на використання редагування генів у клітинах людської зародкової лінії з терапевтичною метою. В серпні 2019 р. низка дослідницьких груп, що працювали в цій галузі, заявили про підтримку ідеї мораторію, а група міжнародних дослідницьких товариств розпочала роботу зі складання рекомендацій щодо відповідних досліджень, яку планується завершити навесні 2020 р. Проте новий експертний консультативний комітет ВООЗ на своєму засіданні в серпні 2019 р. оминув питання про мораторій, але створив глобальний реєстр для відстеження всіх видів досліджень з редагування генів людини та запропонував консультації щодо керування такими технологіями [62].

Впровадження будь-яких технологічних інновацій, в тому числі генетичної терапії, вимагає широкого колективного обговорення щодо припустимості його використання, передбачуваних наслідків та регулювання. Понад 40 країн прийняли законодавство, що забороняє репродуктивне використання генетичних модифікацій людини. Це таке саме глобальне питання, як і зміна клімату та багато інших проблем, що потребують узгоджених дій різних держав та зміцнення як міжнародного права, так і можливостей глобального керування [64]. Серйозною проблемою залишається відсутність узгодженого законодавства, яке б регулювало питання генної модифікації організмів. У багатьох країнах генетичні роботи з ембріонами людини заборонені або не заохочуються. В США заборонено давати державні гранти на такі роботи, але ними можна займатися приватним компаніям.

Перспективними напрямками застосування технології CRISPR/Cas9 є редагування геному бактерій або дріжджів з метою синтезу абсолютно нових речовин, а також створення тваринних моделей захворювань людини, які дають можливість вивчати патогенез захворювань та розробляти нові підходи до їх лікування. Вчені намагаються застосувати тех-



нологію CRISPR/Cas9 для вирішення найактуальніших проблем сьогодення, зокрема для боротьби з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів, знешкодження комах-шкідників і переносників інфекцій (наприклад, малярійних комарів), вирішення проблеми нестачі донорських органів для трансплантації, захисту від небезпечних вірусів (у тому числі ВІЛ), лікування онкологічних захворювань та ін.

Зростання кількості штамів бактерій, стійких до антибіотиків, загрожує прогресу медицини, що спостерігався протягом останніх десятиліть. Особливо гостро ця проблема стоїть при лікуванні туберкульозу. Експериментально підтверджено, що систему CRISPR/Cas9 можна успішно застосовувати для руйнування генів ензимів, які забезпечують стійкість бактерій до дії антибіотиків [65]. Наприклад, за допомогою CRISPR/Cas9 в клітинах вірулентного золотистого стафілокока було зруйновано плазмиди, що містять гени стійкості до антибіотиків, а в клітинах невірулентних стафілококів створено імунітет проти таких плазмід. На моделі колонізації стафілококами шкіри миші продемонстровано підвищення ефективності дії протимікробних препаратів [66]. Навіть отримано бактеріофаги, які вибірково знешкоджують бактерії, стійкі до антибіотиків [67]. Одним з важливих завдань зараз є створення універсальних бактеріофагів, здатних інфікувати широкий спектр видів бактерій-хазяїв.

Генно-модифіковані комахи можуть стати новою зброєю проти переносників інфекцій і шкідників сільськогосподарських культур. Так, людство давно і безуспішно бореться з малярією — небезпечним захворюванням, яке викликає одноклітинний паразит — малярійний плазмодій і яке передається людині від комарів. Щороку від малярії помирає 670 тис. осіб, більшість з яких діти віком до п'яти років. В 2015 р. китайській дослідниці Юю Ту (Youyou Tu) присудили Нобелівську премію за ефективний протималярійний препарат артемізинін. Однак хворобу подолати так і не вдалося через недостатній рівень розвитку системи охорони здоров'я в регіоні, де поширена малярія. Ентоні Джеймс (Anthony James)

з Каліфорнійського університету в Ірвайні запропонував спосіб знешкодження малярійних комарів за допомогою CRISPR/Cas9. У геному комара вбудовують активну систему CRISPR/Cas9, яка може вставляти себе та ген антитіла, що блокує розвиток малярійного плазмодія. В першому поколінні комарів модифікована хромосома запускає CRISPR/Cas9 і робить другу хромосому такою самою. В наступному поколінні майже всі потомки (а не половина) отримують модифіковану хромосому, і процес повторюється. Таким чином здатність виробляти антитіла проти плазмодія швидко поширюється серед популяції комарів [68]. Хоча висловлюються побоювання, що застосування методів з використанням системи CRISPR/Cas9 на кшталт методу мутагенної ланцюгової реакції (MCR), який дає можливість генерувати в автокаталітичному режимі мутації, перетворюючи гетерозиготний стан на гомозиготний, може мати непередбачувані наслідки, наприклад може повністю змінити види і порушити екологічну рівновагу [69].

Біотехнологічна компанія Oxitec (Оксфорд, Велика Британія) використовує CRISPR/Cas9 для створення генно-модифікованих комах, які після спарювання зі своїми дикими родичами спричиняють загибель частини їхніх нащадків. У жовтні 2019 р. у місті Індаятуба (Бразилія) було успішно проведено випробування модифікованих комарів, створених для боротьби з лихоманкою денге та іншими захворюваннями, а також проведено випробування модифікованих діамантових молей, які є шкідниками різних видів капусти. Вчені вбудували в геном комах-самців ген tTAV (транскрипційний активатор, що контролюється тетрацикліном), створений злиттям генів тетрациклін-зв'язувального домену (tetR) бактерії *Escherichia coli* та активатора транскрипції вірусу простого герпесу (VP16). За відсутності тетрацикліну продукт гена tTAV підсилює власну експресію і призводить до загибелі комах. Після спарювання модифікованих самців з дикими самками цей ген передається їхнім нащадкам, серед яких всі самки гинуть на стадії личинки, а половина самців

стають носіями гена. У такий спосіб популяція знищується за три покоління. Недоліками цього підходу є більша складність і вартість порівняно з обприскуванням інсектицидами, а також заборона використання генетично модифікованих комах на органічних фермах. Незважаючи на це, зараз триває розроблення аналогічних методів боротьби з двома метеликами-шкідниками, стійкими до інсектицидів: соєвою совкою і кукурудзяною листовою совкою, які становлять велику проблему в Бразилії та Африці [70].

Люди давно шукають можливість використовувати тварин як донорів органів для трансплантації. По-перше, людей, що можуть бути донорами, набагато менше, ніж тих, хто потребує трансплантації. Близько 22 людей на день гинуть в очікуванні трансплантації. По-друге, з етичної точки зору не дуже добре, коли людина вимушена довго чекати в черзі, сподіваючись на смерть іншої людини. За анатомічними особливостями найбільш придатними для трансплантації людині могли б бути органи свиней. Однак вчені відмовилися від цієї ідеї через наявність у клітинах свиней ендегенних ретровірусів PERV, які можуть інфікувати людину. Іншою проблемою стала наявність на клітинах свиней молекул вуглеводів, які є мітками для негайного знищення антитілами людини. Про цю проблему ще на початку 1980-х років дізналися хірурги, пересадивши свиняче серце бабуїну; вони були шоковані, коли бабуїн помер за лічені хвилини.

Наприкінці 2015 р. китайські та американські вчені під керівництвом Джорджа Черча з Гарвардського університету (Кембридж) продемонстрували можливість видалення за допомогою CRISPR/Cas9 з геному клітин епітелію нирок свині 62 копій вірусу PERV [71], а в серпні 2017 р. опублікували приголомшливі результати досліджень з клонування генно-модифікованих свиней, у яких повністю інактивовано віруси PERV [72]. Доктор Черч заснував компанію eGenesis, сподіваючись продавати генетично змінені органи свиней.

Дослідники з Університету Алабама в Бірмінгемі (США) використали редагування ге-

нів та клонування для створення свиней без специфічних вуглеводів на поверхні їхніх органів. Бабуїни, яким було пересаджено серця та нирки від цих свиней, прожили більше року [73]. В 2018 р. ця група вчених замінила ген свинячого тромбомодуліну на людський з метою розширення можливостей ксенотрансплантації аорти [74]. Можливо, поєднання кількох підходів у недалекому майбутньому дозволить широко використовувати органи свиней для пересадки людям.

Система CRISPR/Cas9 може бути використана також для боротьби з небезпечними вірусними інфекціями. В експериментах на мишах показано, що система CRISPR/Cas9 здатна пригнічувати реплікацію вірусу гепатиту В [75]. Звичайно, робилися неодноразові спроби застосувати технологію CRISPR/Cas9 для боротьби з ВІЛ. У результаті отримано позитивні результати: геном ВІЛ-1 успішно було видалено з ДНК латентно інфікованих людських CD4+Т-клітин, причому, Т-клітини людини не тільки позбавилися ВІЛ, а й виявилися стійкими до нового зараження цим вірусом [76]. Однак деякі дослідники повідомляли, що через два тижні після подібних експериментів у клітинах починали розмножуватися мутовані віруси, які уникали розпізнавання системою CRISPR/Cas9. Навіть висловлювалося припущення, що це відбувається не тільки через підвищену схильність ВІЛ до мутагенезу, а й тому, що сама система CRISPR/Cas9 при розрізанні вірусної ДНК провокує виникнення додаткових мутацій внаслідок подальшої помилкової репарації ДНК [77]. Пропонують різні способи усунення цієї проблеми: застосування CRISPR/Cas9 для одночасного знешкодження кількох генів вірусу, для зміни генів Т-клітин з метою запобігання проникненню вірусу або використання CRISPR/Cas9 у комбінації з противірусними ліками. Результати досліджень з редагування в клітинах ембріона людини гена CCR5, що кодує рецептор для проникнення ВІЛ-1 в Т-клітини, були успішними лише частково, і вони підтвердили необхідність удосконалення застосованої технології [78]. В серпні 2017 р. опубліковано

результати досліджень китайських вчених, які успішно ввели систему редагування CRISPR/Cas9 у стовбурові клітини людини, що є попередниками клітин крові, з метою редагування гена CCR5. На моделі трансгенних мишей було продемонстровано довготривалий (понад рік) ефект стійкості до ВІЛ-1 *in vivo*, що виявлявся у значному зменшенні титру вірусу та збагаченні популяції CD4+Т-клітин людини [79]. А в липні 2019 р. опубліковано результати досліджень американських вчених з Медичної школи Льюїса Катца при Університеті Темпл у Філадельфії (штат Пенсильванія) і Медичного центру Університету Небраски, які повністю видалили ВІЛ з Т-клітин 30% «гуманізованих» трансгенних мишей, яких було інфіковано ВІЛ, поєднавши технологію CRISPR/Cas9 і антиретровірусну терапію тривалої дії. Після випробування нової методики на мавпах у 2020 р. заплановано перші випробування за участі людей [80].

Система CRISPR/Cas9 є також цінним інструментом для створення вірусів з певними властивостями, наприклад ослаблених вірусів для вакцин або онколітичних вірусів для лікування раку [81]. Інактивація за допомогою CRISPR/Cas9 генів E6 або E7 вірусу папіломи викликає загибель клітин цервікальної карциноми шляхом апоптозу [82]. Також за допомогою цієї системи можуть бути вдосконалені імунотерапевтичні підходи до лікування раку. Одна зі стратегій передбачає створення генно-модифікованих Т-клітин з химерними антигенними рецепторами (CAR-T), до складу яких входить scFv-антитіло проти певного антигена ракових клітин. Особливо успішним виявився спосіб лікування В-клітинної лімфоми за допомогою Т-клітин з химерними рецепторами проти антигена CD19: відповідний препарат Kymriah (Tisagenlecleucel) виробництва Novartis (Швейцарія) схвалено FDA у 2017 р. [83]. На основі CRISPR/Cas9 у 2018 р. було розроблено систему, яка без використання вірусних векторів дозволила швидко та ефективно вставляти великі послідовності ДНК (більше 1 кілобази) в певні ділянки геному Т-клітин людини, зберігаючи їх

життєздатність та функції [84]. Завдяки цьому зараз досліджуються та проходять клінічні випробування понад 300 різних варіантів терапії CAR-T, зокрема терапія TanCAR з біспецифічними химерними антигенними рецепторами, які запобігають так званій «втечі» пухлинного антигена внаслідок мутацій; системи універсальних антигенних рецепторів (наприклад, SUPRA CAR), в яких можна легко змінити специфічність scFv-антитіла, а також терапія panCAR на основі однодомених наноантитіл, які завдяки малому розміру вирішують проблеми агрегації та імуногенності scFv [85]. Крім Т-клітин розроблено також генно-модифіковані макрофаги (CARMA), природні кілери (CAR-NK) та інші типи клітин, у тому числі синтетичні клітини, що імітують Т-клітини і походять з клітин нирок, виділених із сечі, або стовбурових клітин, одержаних при ліпосакції [86]. У промислових масштабах клітини CAR-T також отримують з генетично модифікованих індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSCs), які можна нескінченно довго розмножувати, а перед лікуванням перетворювати на зрілі клітини CAR-T за допомогою штучного тимуса — органа, в якому зазвичай Т-клітини розвиваються зі стовбурових клітин крові [87].

Онкологічні захворювання, як правило, виникають через мутації у різноманітних генах, які призводять до стимулювання клітинної проліферації, втрати функції пухлинних супресорів, що регулюють клітинний ріст, індукції метаболічних ензимів, які надають стійкість до хіміотерапевтичних агентів тощо. Технологія CRISPR/Cas9 відкриває реальні можливості усунення таких мутацій, що є дуже важливим при лікуванні раку [88]. В жовтні 2016 р. група китайських учених під керівництвом онколога Лу Ю (Lu You) з Університету Сичуань в Ченду в рамках клінічного випробування вперше ввела CRISPR/Cas9 Т-клітини, модифіковані за геном PD-1, що гальмує клітинну імунну відповідь, пацієнту з агресивним раком легенів. Результати цих досліджень спонукали США розпочати проведення подібних випробувань [89]. У 2019 р. технологію CRISPR

було використано для визначення генів, які є критичними для виживання раку. Під час дослідження було почергово пошкоджено майже 20 000 генів у клітинах 300 моделей раку, що належать до 30 типів раку. В результаті дослідники відібрали 600 найперспективніших «мішеней» для розроблення нових протиракових препаратів. Головною «мішенню» для кількох різних типів раку виявився синдром RecQ хелікази Вернера (WRN), який є необхідним для виживання ракових клітин з порушеннями шляхів репарації ДНК, що називають ще раком з мікросателітною нестабільністю. До нього належить багато типів раку, зокрема 15% типів раку товстої кишки та 28% типів раку шлунка [90].

Для того, щоб використовувати систему CRISPR/Cas9 у практичній медицині для лікування спадкових захворювань, викликаних одиночною мутацією в певному гені (таких як гемофілія, муковісцидоз, хвороба Гантінгтона, серпоподібноклітинна анемія, лейкемія тощо), необхідно вдосконалити технологію, зробити її цілком безпечною для людини, вирішити проблему доставки компонентів CRISPR/Cas9 до окремих клітин в організмі. Ймовірно, найпростішим варіантом для застосування CRISPR/Cas9 в медицині є захворювання крові, для яких технології клітинної терапії вже добре відпрацьовані. Генну терапію гемопоетичних стовбурових клітин успішно застосовують для лікування спадкових імунodefіцитів протягом останніх 20 років. Спочатку для введення ДНК у клітини використовували гамма-ретровірусні вектори, які іноді викликали лейкемію. Згодом розробили більш безпечні вектори, які проходять зараз клінічні випробування [91]. В експериментах на мишах вже отримано позитивні результати з використання CRISPR/Cas9 для генної терапії гемофілії [92] та міодистрофії Дюшена [93]. А наприкінці минулого року група вчених з Каліфорнійського університету в Берклі повідомила про успішне використання CRISPR/Cas9 для виправлення генетичної мутації в стовбурових клітинах пацієнтів з серпоподібно-клітинною анемією [94]. Тому не дивно, що біотехноло-

гічні компанії вкладають усе більше й більше грошей у розроблення технології CRISPR/Cas9 і реалізацію ідей щодо її медичного застосування.

Вчені, які зробили найбільший внесок у винахід технології CRISPR/Cas9, стали співзасновниками перших чотирьох компаній, що розвивають застосування цієї технології у медичній практиці. По-перше, це Intellia Therapeutics (США), яку очолює Дженніфер Дудна; по-друге, Caribou Biosciences (США), яку очолює Рудольф Барранго, а співзасновниками є Дженніфер Дудна та Мартін Джінек; по-третє, CRISPR Therapeutics зі штаб-квартирами в Швейцарії, Великій Британії та США на чолі з Еммануель Шарпентьє; по-четверте, Editas Medicine (США), яку заснували Фен Чжан і Джордж Черч – автори перших результатів редагування клітин еукаріотів та людини. Спочатку Дж. Дудна також була співзасновником Editas Medicine, але змушена була розірвати відносини з компанією, оскільки Фен Чжан несподівано оформив на себе та свій інститут патент на застосування технології CRISPR/Cas9 у клітинах еукаріотів (у тому числі людей). Судова тяганина за пріоритет, яка коштувала десятки мільйонів доларів, тривала кілька років і у лютому 2017 р. завершилася рішенням патентного відомства США на користь Фена Чжана з Інституту Брод у Кембриджі. Однак Європейське патентне відомство видало патент на застосування технології CRISPR/Cas9 у клітинах усіх типів, в тому числі еукаріотичних, Дж. Дудні та Каліфорнійському університету в Берклі. Після численних апеляцій рішення американського суду тривалий час залишилося незмінним. І лише після останньої скандальної апеляційної заяви Дудни, зробленої у червні 2019 р., з обвинуваченнями у брехні та підтасовці фактів на адресу співробітників Інституту Брод [95] було прийнято рішення про надання команді Дудна–Шарпентьє наприкінці 2019 р. патенту США на спосіб отримання генетично модифікованих клітин за допомогою редагування генів CRISPR-Cas9 і про подальше розширення патентного портфеля навесні 2020 р. [96]. Чи



закінчиться на цьому протистоянні, невідомо, адже фармацевтичні компанії вже вклали у вищезгадані стартап-компанії понад \$300 млн. Гроші надали Білл Гейтс, Google Ventures і ще кілька провідних венчурних фондів. І це не межа. У разі отримання обнадійливих результатів, інвестиції зростуть, а застосування в медичній практиці обіцяє мільярдні прибутки.

З огляду на таку перспективу домогтися глобальної заборони експериментів з генетичної модифікації людини скоріш за все не вдасться. З іншого боку, навряд чи варто їх забороняти, оскільки завжди знайдуться люди, готові порушити будь-які заборони заради власних інтересів. Навіть якщо подібні експерименти заборонити в США чи Європі, то вони все одно реалізовуватимуться в Китаї, оскільки через місцеві культурно-релігійні особливості там не бачать великої проблеми в експериментах з людськими ембріонами, адже за вченням Конфуція людина стає людиною (тобто отримує душу) лише після народження.

У Великій Британії генетичні маніпуляції з ембріонами офіційно дозволено. 29 жовтня 2015 р. у цій країні прийнято закон, який дозволяє при штучному заплідненні пересаджувати в запліднену яйцеклітину мітохондрії від третьої особи — донора [97]. А з 1 лютого 2016 р. дозволили проведення досліджень з використанням технології CRISPR/Cas9 та життєздатних ембріонів людини [98]. У своєму звіті від 2018 р. Наффілдська рада з біоетики (Велика Британія) зазначила, що використання спадкового редагування геному «може бути етично прийнятним за деяких обставин». Соціальні опитування показали, що в США майже три чверті населення підтримують використання редагування геному для лікування серйозних спадкових захворювань у немовлят [99].

Генеральний директор Центру народжуваності New Hope у Нью-Йорку Джон Чжан (John Zhang) одним з перших вирішив комерціалізувати метод мітохондріальної замісної терапії (МЗТ), яку часто називають «зачаттям від трьох батьків». Вартість інноваційної процедури вчений оцінив приблизно у \$100 тис. У 2016 р. він допоміг жінці зачати і виносити

здорову дитину, використовуючи метод МЗТ. Після цього Чжан створив стартап Darwin Life, покликаний допомагати жінкам, старшим за 40 років, народити дитину. Чжан просив у FDA дозвіл на проведення клінічних випробувань, однак у 2017 р. отримав відмову у вигляді відкритого листа. Незважаючи на це, Чжан на сайті компанії Darwin Life продовжує рекламувати процедуру, яка може бути проведена у мексиканських відділеннях клініки [100], та закликає інших вчених розвивати цю галузь у Великій Британії, Україні та Китаї, де подібні дослідження дозволені [101].

Тривалий час FDA не дозволяло проведення за федеральні кошти клінічних випробувань системи CRISPR/Cas9, на відміну від іншого інструменту геномного редагування — ZFN. Компанія Sangamo BioSciences (Ричмонд, штат Вірджинія, США) використала ZFN у клінічних випробуваннях з метою лікування гемофілії типу В, мукополісахаридозу, бета-таласемії та вірусного імунодефіциту людини [102]. Адміністрація президента Дональда Трампа внесла пропозиції до правил FDA, які висували більш жорсткі вимоги до контролю за організмами, модифікованими за допомогою CRISPR/Cas9, навіть за сільськогосподарськими тваринами та рослинами, не кажучи вже про людей. Вчені вважали ці пропозиції «божевільними» і побоювалися, що багато організацій відмовляться від створення генно-інженерних тварин. Однак на початку 2019 р. на решті було офіційно схвалено проведення першого клінічного випробування. У цьому році фармацевтичні компанії CRISPR Therapeutics і Vertex розпочали випробування терапії CTX001, призначеної для лікування бета-таласемії та серпоподібної анемії, які зумовлені мутацією в одному гені. Ця терапія передбачає модифікацію стовбурових клітин пацієнта шляхом внесення єдиної генетичної зміни, що приведе до підвищення рівня гемоглобіну в еритроцитах плоду. Щодо проведених випробувань на території Китаю слід зазначити, що жодних результатів цих досліджень не було опубліковано, а останні звіти свідчать про виявлення значних процедурних проблем [103].

У США зараз проводять понад 20 клінічних випробувань терапевтичних препаратів на основі CRISPR для низки захворювань, таких як рідкісні моногенні гематологічні та очні хвороби, а також полігенні онкологічні захворювання [104]. Серед спадкових захворювань, зумовлених точковою мутацією, увагу вчених привертають насамперед вроджений амавроз Лебера 10 (ураження сітківки ока), синдром Ушера (глухота з поступовою втратою зору), м'язова дистрофія Дюшена, муковісцидоз (кістозний фіброз, що вражає дихальну та травну системи), дефіцит транстиретину (ураження периферичної нервової системи), амілоїдоз альфа-1 та первинна гіпероксалурія I типу (ураження нирок).

Слід зазначити, що для лікування подібних захворювань розробляють також препарати на основі антисенс-олігонуклеотидів, що функціонують за принципом інтерферуючих РНК. На сьогодні дозвіл FDA одержали 7 таких препаратів: у 1998 р. — Вітравен (Vitravene, фомівірсен) для терапії цитомегаловірусного ретиніту у ВІЛ-інфікованих (у 2006 р. виведений з ринку завдяки ефективній антиретровірусній терапії); у 2004 р. — Макуджен (Macugen, пегантаніб) для лікування неоваскулярної вікової макулярної дегенерації; у 2013 р. — Кінамро (Купамро, міпомерсен) для лікування гомозиготної сімейної гіперхолістеринемії; у 2016 р. — Ексондис 51 (Exondys 51, етеплірсен) для лікування м'язової дистрофії Дюшена з підтвердженою мутацією гена дистрофіну, яка може бути виправлена пропуском екзона 51; у 2016 р. — Спінраза (Spinraza, нусинерсен) для лікування спінальної м'язової атрофії; у 2018 р. — Терседі (Tegsedi, інотерсен) та Онпатро (Onpattro, патисиран) для лікування спадкового транстиретичного амілоїдозу з полінейропатією [105].

Тривалий час суспільство з недовірою ставилося до перспектив генної терапії, особливо після того, як в 1999 р. у США внаслідок лікування вперше померла людина — 18-річний хлопець Джессі Джелсінджер (Jesse Gelsinger), який мав генетичне захворювання печінки, пов'язане з Х-хромосою, — дефіцит орнітин-транскарбаμίлази, що проявлялося в нездатності знешко-

джувати аміак. Він помер, ймовірно, через порушення деяких правил проведення клінічних випробувань і внаслідок генералізованої імунної реакції на пробне введення аденовірусного вектора зі здоровим геном [106].

Уперше генну терапію офіційно дозволили в Китаї 16 жовтня 2003 р. (препарат Gendicine компанії SiBiono GeneTech Co з Шеньчжень, провінція Гуандун), пізніше, у 2006 р., на ринку з'явився препарат Oncorine (H101) компанії Sunway Biotech Co Ltd, Шанхай. Обидва препарати призначені для лікування раку голови та шиї. В 2011 р. в Росії дозволили використання препарату Neovasculogen для лікування атеросклерозу та ішемії [107].

Першим генно-терапевтичним препаратом на території Європи або США, який був рекомендований в липні 2012 р. Європейським агентством з лікарських засобів і схвалений Єврокомісією в листопаді 2012 р., був препарат Glybera (аліпоген типарвовек), розроблений біотехнологічною компанією uniQure (Нідерланди). Цей препарат призначено для лікування надзвичайно рідкісного (1–2 випадки на мільйон) спадкового захворювання — дефіциту ліпопротеїналіпази (ЛПЛ), або сімейної хіломікронемії. Нестача ензиму ЛПЛ призводить до порушення обміну жирів в організмі: відкладенню жирів у шкірі, сітківці очей і печінці, а також гострого запалення підшлункової залози (панкреатиту). Glybera за допомогою вірусу AAV1 забезпечує доставку в м'язові клітини неушкодженої копії гена ЛПЛ, яка не вбудовується в геном, але компенсує вроджений дефект. Паралельно з ін'єкціями препарату проводиться імуносупресивна терапія для запобігання імунній реакції на вірус. Роздрібна ціна цих ліків стала рекордною і становила в Німеччині 53 тис. за флакон, а курс терапії обходився у понад 1 млн. Препарат виготовляли за індивідуальним замовленням на заводі uniQure в Амстердамі. Продаж цих ліків розпочато лише в 2014 р., коли було отримано результати шестирічного спостереження за пацієнтами. Дані клінічних досліджень показали, що майже у всіх пацієнтів концентрація жиру в крові знижувалася після ін'єкції на період

від 3 до 12 тижнів. Виробник сподівався, що в 2018 р. Glybera вийде на американський ринок [108]. Однак у квітні 2017 р. компанія відкликала свою заявку і через високу вартість вилучила препарат з європейського ринку, продавши його лише один раз у Німеччині та оголосивши його комерційною помилкою [109].

Наприкінці 2015 р. у США, а потім і в Європі було затверджено препарат на основі онколітичного вірусу герпесу Imlygic (T-Vec) транснаціональної компанії Amgen (зі штаб-квартирою в Каліфорнії, США) для лікування неоперабельної меланоми вартістю \$65 тис. Однак статистично достовірних доказів ефективності лікування ним досі не отримано [110], хоча відзначалося зростання в 2 рази кількості пацієнтів з регресією пухлини при комбінованому застосуванні Imlygic та Yervoy — людського моноклонального антитіла проти CTLA-4, що стало першим лікарським засобом на основі інгібіторів імунних чекпоінтів [111].

27 травня 2016 р. в Європі було схвалено перший генно-терапевтичний препарат для лікування дітей — Strimvelis, розроблений італійськими вченими та біотехнологічною фірмою GlaxoSmithKline (Велика Британія), зараз переданий Orchard Therapeutics Limited (Велика Британія). Цей препарат створено для лікування рідкісного комбінованого імунodefіциту ADA-SCID, який спричинюється дефіцитом аденозиндеамінази — ензиму, що утилізує пурини. У хворих дітей перестають формуватися лейкоцити, тому вони повинні перебувати у стерильних умовах і рідко живуть більше двох років. Щороку в Європі народжується близько 15 дітей з цим захворюванням. У березні 2017 р. перша дитина з європейської країни (дані про яку не розголошуються) пройшла лікування Strimvelis. Вартість лікування становила 594 тис. (\$648 тис.), на сьогодні вже понад \$700 тис., тоді як замісна терапія ензимом протягом 10 років потребує щотижневих ін'єкцій і коштує близько \$4,25 млн. Поки що лікування можливе лише в Мілані (Італія), оскільки генно-модифіковані стовбурові клітини залишаються придатними до трансплантації протягом 6 год [112]. Компанія Orchard

Therapeutics Limited під час дослідження можливості криогенного заморожування та транспортування клітин пацієнтів розробила новий препарат OTL-101, який є вдосконалим варіантом Strimvelis, що в 2019 р. успішно завершив дворічні випробування на 20 немовлятах і в 2020 р. буде заявлений для розповсюдження на ринку США [113]. Однак висока вартість подібних препаратів може стати перешкодою для їх широкого використання: ані державні бюджети, ані страхові компанії не готові до таких витрат. Ймовірно, завдяки успішному впровадженню CRISPR/Cas9 у клінічну практику спадкові захворювання не зникнуть, а стануть ознакою бідності.

На сьогодні вже багато відомо про систему CRISPR/Cas9, хоча ці знання є недостатніми. Деякі фундаментальні питання залишаються поки що без відповіді. Невідомо, звідки береться більшість спейсерів у CRISPR, адже лише декілька відсотків з них мають вірусне походження, і для чого вони потрібні бактерії. Є відомості, що система CRISPR/Cas може брати активну участь у регуляції ендогенних бактеріальних генів, зокрема при взаємодії бактерій з еукаріотичним організмом, у якому вони паразитують. Наприклад, протеїн Cas9 з *Francisella novicida* використовує CRISPR/Cas-асоційовану малу РНК (scaRNA) для пригнічення ендогенного транскрипту мРНК, що кодує бактеріальний ліпопротеїн. Це дозволяє послабити імунну відповідь хазяїна й підвищити вірулентність бактерії [114]. Незрозуміло, як виникла система CRISPR/Cas в ході еволюції (є припущення, що вона походить від так званих стрибаючих генів — транспозонів — ділянок ДНК, які кодують протеїни, необхідні для переміщення цих ділянок у геномі) [115]. Зараз відомо 6 різних типів CRISPR/Cas (CRISPR/Cas9 належить до II типу). Не виключено, що є й інші, поки що невідомі, системи CRISPR/Cas. Важливим є вивчення на біохімічному та структурному рівнях різних природних форм головного компоненту системи — протеїну Cas9, серед яких можуть виявитися протеїни, більш перспективні для практичного використання. Вже з'ясовано деякі невідомі деталі молекуляр-

ного механізму розпізнавання ДНК-«мішені» та її розрізання завдяки одержанню кристалічних структур комплексів Cas1-Cas2 або R-петлі Cas9 з фрагментами чужорідної ДНК в локусі CRISPR [116, 117]. Очевидно, що завдяки пильній увазі вчених всього світу до CRISPR/Cas9 всі нез'ясовані фундаментальні питання буде докладно досліджено в найближчому майбутньому.

Недоліками CRISPR/Cas9 є не тільки значна кількість помилок редагування, а й неефективність редагування ДНК поза межами клітини, а також значний розмір ензиму Cas9, що ускладнює його доставку в клітину та зумовлює сильні імуногенні властивості. Тому вчені активно шукають і досліджують інші протеїни Cas, які можуть виявитися ефективнішими. Останнім часом їх увагу все більше привертають представники родини Cas12a (Cpf1), особливо протеїни LbCpf1 та AsCpf1, що трапляються відповідно у бактерій родини *Lachnospiraceae* і роду *Acidaminococcus*. Ці ензими, на відміну від Cas9, розрізають ДНК з утворенням «липких» кінців, а не «тупих», що дозволяє легко вирізати і вставляти цілі гени [118]. Така можливість є дуже цінною для генної терапії захворювань, пов'язаних з багаторазовим пошкодженням гена, наприклад хвороби Альцгеймера, коли ген легше замінити, ніж відредагувати [119]. На основі Cpf1 вперше було створено систему для редагування ДНК у безклітинному екстракті, яка може стати діагностичним інструментом для виявлення генетичних мутацій у пухлинних клітинах хворих на рак [120]. Перспективними для генної інженерії можуть виявитися й інші нещодавно відкриті компоненти систем захисту бактерій, наприклад невеликі за розміром протеїни-аргонавти CasX і CasY [121], здатні розрізати чужорідну ДНК (їх було виявлено у глибоководних прокариот Кришталевого гейзера (США) [122]), ще менші (40–70 кДа) протеїни Cas14(a, b, c), здатні до розщеплення одноланцюгової ДНК без необхідності взаємодії з PAM, які було відкрито в архей [123], протеїни Cas13a (C2c2) [124], Cas13b [125], Cas13c і Cas13d [126], що знешкоджують РНК вірусів,

або протеїн ScCas9 *Streptococcus canis*, що має спорідненість до мінімальних 5'-NNG-3' послідовностей PAM і ширші можливості редагування геному [127]. Нещодавно розроблена система CRISPR/Cas3 типу I, яка може вирізати довгі ділянки ДНК, поповнила арсенал інструментів для редагування геному [128]. А у 2018 р. вчені з Каліфорнійського університету в Лос-Анджелесі розробили вдосконалену технологію CRISPR/Cas9 з використанням CRISPR-бібліотек, що дозволило одночасно редагувати геном тисячами різних способів, спостерігаючи при цьому, як будь-які можливі мутації зумовлюють позитивний чи негативний вплив на клітини [129].

Поєднання системи CRISPR/Cas з іншими технологіями також дає цікаві результати. Зокрема, компанія Eurofins DiscoverX нещодавно запропонувала поєднати CRISPR/Cas9 з методом аналізу комплементарності фрагментів ферменту (EFC) [130], що дозволило створити біосенсор для кількісної оцінки зміни рівня певного ендогенного протеїну під впливом терапевтичних засобів [131]. Цей біосенсор може бути використаний для проведення масового скринінгу нових засобів для лікування того чи іншого захворювання, що є особливо актуальним для нового класу терапевтичних препаратів, відомих як цільові деградатори протеїнів, наприклад PROTAC — біфункціональних молекул, які націлені на специфічні для захворювання протеїни та здатні руйнувати їх за допомогою клітинної системи убіквітин-протеасоми. Останнім часом значний інтерес викликають PROTAC для знешкодження бромодому Brd4, який розпізнає ацетильовані залишки лізину на хроматині та регулює експресію багатьох онкогенів [132].

З'являються все нові способи вдосконалення технології CRISPR/Cas9: компанія GenScript (США) пропонує використовувати як шаблон одноланцюгову ДНК (ssDNA або ssODN), що підвищує ефективність редагування та знижує ймовірність інтеграції поза межами цільової ділянки [133]. Нещодавно група під керівництвом Фена Чжана відкрила нову техніку редагування генів, яка дає змогу вставляти гени у



ДНК без її розрізання за допомогою CRISPR-асоційованої транспозази із ціанобактерій *Scytonema hofmannii* (ShCAST), що складається з Tn7-подібних субодиниць транспозази та ензиму Cas12k [134]. У 2019 р. неабияку цікавість (понад 400 наукових публікацій) викликав метод, розроблений ще у 2012 р. німецькими вченими Торстеном Стаффорстом (Thorsten Stafforst) і Маріусом Шнайдером (Marius F. Schneider) з Тюбінгенського університету [135], який тоді залишився без уваги, оскільки був затмарений сенсаційним відкриттям CRISPR/Cas9. Цей метод дозволяє змінювати протеїни шляхом редагування РНК, а не ДНК, що вирішує проблему ризиків, пов'язаних з внесенням постійних змін у ДНК людини та ймовірністю обтяження її помилками редагування. Зміни у мРНК вносять за допомогою аденозинових деаміназ ADAR (adenosine deaminases acting on RNA), які перебувають у комплексі з РНК-гідами (adRNAs – ADAR guide RNAs) і здатні в утвореній дволанцюговій РНК змінювати аденозин на інозин, який при синтезі протеїну зчитується як гуанозин. Важливою перевагою використання людських ензимів ADAR порівняно з протеїном Cas9, що має бактеріальне походження, є відсутність небажаних реакцій з боку імунної системи. Зараз уже відомі й інші засоби редагування РНК: цитидинові деамінази APOBEC змінюють цитозин на уридин; певні ензими винограду змінюють цитидин на уридин, а деякі ензими пухлин можуть змінювати гуанозин на аденозин тощо. Незважаючи на обмеженість способів зміни послідовності РНК та проблеми з доставкою РНК до клітин, кілька стартап-компаній вже почали використовувати системи редагування РНК для розроблення засобів лікування раку, м'язової дистрофії та інших захворювань (не лише генетичних), а також для корекції різних патологічних станів, таких як гострий біль або високий рівень холестерину [136].

Зараз ми переживаємо бум захоплення технологією CRISPR/Cas9. Протягом останніх 7 років опубліковано близько 17 тис. наукових статей на цю тему, виділено мільйони доларів на дослідження, а кількість стартап-компаній

невпинно зростає. Не дивно, що авторитетний науковий журнал Science випустив огляд досягнень у цій галузі під назвою «The CRISPR Craze» (Криспер-божевілля) [137]. Очікується, що до 2025 р. у світі на розвиток технології CRISPR/Cas9 та редагування геномів за її допомогою буде витрачено понад \$5,3 млрд [138].

Сьогодні складно давати будь-які прогнози щодо того, якими будуть результати практичного використання системи CRISPR/Cas9 через кілька десятиліть. Однак уже зараз зрозуміло, що CRISPR/Cas9 – це не чергова модна «іграшка», якою вчені побавляться і невдовзі про неї забудуть. Немає сумнівів, що ця технологія є революційною, і на неї чекає велике майбутнє. Технологія CRISPR/Cas9 суттєво спростила і здешевила техніку редагування геномної ДНК, що в перспективі може значно прискорити темпи розвитку генної терапії та експериментальної біології. З відкриттям CRISPR/Cas9 водночас з'явилося безліч можливостей для вирішення наболілих проблем людства, з якими наука досі не могла впоратися. Ця технологія дала шанс позбавитися від генетичних захворювань, створити «розумні» антибіотики, цінні ГМО для сільського господарства, промисловості та медицини, нейтралізувати переносників інфекційних хвороб тощо.

Однак щоб реалізувати всі ці можливості повною мірою, необхідно зробити технологію безпечною: виключити всі побічні ефекти, а також вдосконалити системи доставки компонентів CRISPR/Cas9 до клітин. Коли це буде зроблено, редагування геномів тварин стане звичною справою, а ідея застосування CRISPR/Cas9 до ембріонів людини для позбавлення від тяжких захворювань, ймовірно, вже не буде видаватися такою сумнівною. Якщо замислитися над тим, що зміни, внесені в ДНК ембріонів, можуть бути передані майбутнім поколінням, то приходить усвідомлення факту, що технологія CRISPR/Cas9 може змінити напрям еволюції людини, надати нам безпрецедентну можливість переписати власний код життя. Багато хто зараз каже: «Це добром не скінчиться...». Чомусь здається, що те ж саме казали первісні люди, вперше побачивши колесо.

## REFERENCES

## [СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. Meselson M., Yuan R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*. 1968. **217**(5134): 1110–1114. DOI: <https://doi.org/10.1038/2171110a0>
2. Weiss B., Richardson C.C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1967. **57**(4): 1021–1028. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.57.4.1021>
3. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011. **471**(7340): 602–607. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09886>
4. Westra E.R., Semenova E., Datsenko K.A., Jackson R.N., Wiedenheft B., Severinov K., Brouns S.J. Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet*. 2013. **9**(9): e1003742. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003742>
5. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol*. 1987. **169**(12): 5429–5433. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987>
6. Nakata A., Amemura M., Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol*. 1989. **171**(6): 3553–3556. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.171.6.3553-3556.1989>
7. Groenen P.M., Bunschoten A.E., van Soolingen D., van Embden J.D. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol*. 1993. **10**(5): 1057–1065. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
8. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol*. 2000. **36**(1): 244–246. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
9. Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol*. 2002. **43**(6): 1565–1575. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
10. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 2005. **60**(2): 174–182. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
11. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005. **151**(3): 653–663. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
12. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005. **151**(8): 2551–2561. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
13. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007. **315**(5819): 1709–1712. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
14. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuys R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008. **321**(5891): 960–964. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
15. Marraffini L.A., Sontheimer E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. 2008. **322**(5909): 1843–1845. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
16. Sontheimer E., Marraffini L. Target DNA interference with crRNA. U.S. Provisional Patent Application 61/009,317, filed September 23, 2008; later published as US2010/0076057 (abandoned).
17. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012. **337**(6096): 816–821. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
18. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. **109**: E2579–E2586. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
19. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013. **339**(6121): 823–826. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1232033>

20. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013. **339**(6121): 819–823. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
21. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2013. **31**(3): 230–232. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>
22. Meganuclease. Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Meganuclease>
23. O'Connell M.R., Oakes B.L., Sternberg S.H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J.A. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*. 2014. **516**(7530): 263–266. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13769>
24. Nelles D.A., Fang M.Y., O'Connell M.R., Xu J.L., Markmiller S.J., Doudna J.A., Yeo G.W. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9. *Cell*. 2016. **165**(2): 488–496. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.054>
25. Vandenberghe L.H. Addgene: molecular therapy interview with Melina Fan and Karen Guerin. [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(18\)30582-3](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(18)30582-3) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.001>
26. Brown K.V. Why CRISPR-edited food may be in supermarkets sooner than you think. <https://gizmodo.com/why-crispr-edited-food-may-be-in-supermarkets-sooner-th-1822025033>
27. Lee J., Wang F. Gene-edited baby by Chinese scientist: the opener of the pandora's box. *Science Insights*. 2018. 2018:e000178. DOI: <https://doi.org/10.15354/si.18.co015>
28. Reardon S. CRISPR gene-editing creates wave of exotic model organisms. *Nature*. 2019. **568**(7753): 441–442. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01300-9>
29. Wade N. Genes color a butterfly's wings. Now scientists want to do it themselves. <https://www.nytimes.com/2017/09/18/science/butterfly-wing-color-patterns-gene-editing.html>
30. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013. **152**(5): 1173–1183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
31. Kungulovski G., Jeltsch A. Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet.* 2016. **32**(2): 101–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.12.001>
32. Pefanis E., Wang J.G., Rothschild G., Lim J., Kazadi D., Sun J.B., Federation A., Chao J., Elliott O., Liu Z.P., Economides A.N., Bradner J.E., Rabadan R., Basu U. RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell*. 2015. **161**(4): 774–789. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.034>
33. Elling R., Chan J., Fitzgerald K.A. Emerging role of long noncoding RNAs as regulators of innate immune cell development and inflammatory gene expression. *Eur. J. Immunol.* 2016. **46**(3): 504–512. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201444558>
34. Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G.W., Park J., Blackburn E.H., Weissman J.S., Qi L.S., Huang B. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*. 2013. **155**(7): 1479–1491. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
35. Hajian R., Balderston S., Tran T., deBoer T., Etienne J., Sandhu M., Wauford N.A., Chung J.Y., Nokes J., Athaiya M., Paredes J., Peytavi R., Goldsmith B., Murthy N., Conboy I.M., Aran K. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat. Biomed. Eng.* 2019. **3**(6): 427–437. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0371-x>
36. CRISPR's future for point-of-care diagnostics. <https://www.diagnosticsworldnews.com/news/2020/02/18/crispr%27s-future-for-point-of-care-diagnostics>
37. List of awards and honors received by Jennifer Doudna. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_awards\\_and\\_honors\\_received\\_by\\_Jennifer\\_Doudna](https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_awards_and_honors_received_by_Jennifer_Doudna)
38. Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang A.P., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li T., Tan T., Pu X., Wang F., Ji S., Zhou Q., Huang X., Ji W., Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014. **156**(4): 836–843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>
39. Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E., Shi X., Scott D.A., Mikkelsen T.S., Heckl D., Ebert B.L., Root D.E., Doench J.G., Zhang F. Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014. **343**(6166): 84–87. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1247005>
40. Raphael B.J., Dobson J.R., Oesper L., Vandin F. Identifying driver mutations in sequenced cancer genomes: computational approaches to enable precision medicine. *Genome Med.* 2014. **6**(1): 5. DOI: <https://doi.org/10.1186/gm524>
41. Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M., Lander E.S. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science*. 2014. **343**(6166): 80–84. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1246981>

42. Baltimore D., Berg P., Botchan M., Carroll D., Charo R.A., Church G., Corn J.E., Daley G.Q., Doudna J.A., Fenner M., Greely H.T., Jinek M., Martin G.S., Penhoet E., Puck J., Sternberg S.H., Weissman J.S., Yamamoto K.R. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015. **348**(6230): 36–38. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aab1028>
43. Vogel G. Bioethics. Embryo engineering alarm. *Science*. 2015. **347**(6228): 1301. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.347.6228.1301>
44. Clapper J.R. Worldwide threat assessment of the US intelligence community. [https://www.dni.gov/files/documents/SASC\\_Unclassified\\_2016\\_ATA\\_SFR\\_FINAL.pdf](https://www.dni.gov/files/documents/SASC_Unclassified_2016_ATA_SFR_FINAL.pdf)
45. Baumgaertner E. As D.I.Y. gene editing gains popularity, ‘Someone is going to get hurt’. <https://www.nytimes.com/2018/05/14/science/biohackers-gene-editing-virus.html>
46. Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y., Li Y., Sun Y., Bai Y., Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015. **6**(5): 363–372. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
47. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013. **154**(6): 1380–1389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
48. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 2014. **32**(3): 279–284. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2808>
49. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K. Engineered CRISPR/Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015. **523**(7561): 481–485. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14592>
50. Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.* 2014. **32**(6): 577–582. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2909>
51. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016. **351**(6268): 84–88. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
52. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. High-fidelity CRISPR/Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016. **529**(7587): 490–495. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature16526>
53. Zhou W., Deiters A. Conditional Control of CRISPR/Cas9 Function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. **55**(18): 5394–5399. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201511441>
54. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L., Nelson M., Sanger W.G., Gokhale S., Wolf D.P., Mitalipov S.M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*. 2007. **450**(7169): 497–502. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06357>
55. Tachibana M., Sparman M., Sritanandomchai H., Ma H., Clepper L., Woodward J., Li Y., Ramsey C., Kolotushkina O., Mitalipov S. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*. 2009. **461**(7262): 367–372. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08368>
56. Tachibana M., Amato P., Sparman M., Gutierrez N.M., Tippner-Hedges R., Ma H., Kang E., Fulati A., Lee H.S., Sritanandomchai H., Masterson K., Larson J., Eaton D., Sadler-Fredd K., Battaglia D., Lee D., Wu D., Jensen J., Patton P., Gokhale S., Stouffer R.L., Wolf D., Mitalipov S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013. **153**(6): 1228–1238. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.042>
57. Kang E., Wu J., Gutierrez N.M., Koski A., Tippner-Hedges R., Agaronyan K., Platero-Luengo A., Martinez-Redondo P., Ma H., Lee Y., Hayama T., Van Dyken C., Wang X., Luo S., Ahmed R., Li Y., Ji D., Kayali R., Cinnioglu C., Olson S., Jensen J., Battaglia D., Lee D., Wu D., Huang T., Wolf D.P., Temiakov D., Belmonte J.C., Amato P., Mitalipov S. Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Nature*. 2016. **540**(7632): 270–275. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20592>
58. Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.W., Wu J., Lee Y., Suzuki K., Koski A., Ji D., Hayama T., Ahmed R., Darby H., Van Dyken C., Li Y., Kang E., Park A.R., Kim D., Kim S.T., Gong J., Gu Y., Xu X., Battaglia D., Krieg S.A., Lee D.M., Wu D.H., Wolf D.P., Heitner S.B., Belmonte J.C.I., Amato P., Kim J.S., Kaul S., Mitalipov S. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017. **548**(7668): 413–419. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature23305>
59. Second woman carrying gene-edited baby, Chinese authorities confirm. <https://www.theguardian.com/science/2019/jan/22/second-woman-carrying-gene-edited-baby-chinese-authorities-confirm>
60. CRISPR scientist gets three years of jail time for creating gene-edited babies. <https://gizmodo.com/crispr-scientist-gets-three-years-of-jail-time-for-crea-1840724277>
61. Act now on CRISPR babies. *Nature*. 2019. **570**(137). DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01786-3>



62. Collins F.S. NIH Director on Human Gene Editing: 'We Must Never Allow our Technology to Eclipse our Humanity'. <https://www.discovermagazine.com/health/nih-director-on-human-gene-editing-we-must-never-allow-our-technology-to>
63. Gene mutation meant to protect from HIV 'raises risk of early death'. <https://www.theguardian.com/science/2019/jun/03/gene-mutation-protect-hiv-raises-risk-early-death>
64. Andorno R., Yamin A.E. The right to design babies? Human rights and bioethics. <https://www.openglobalrights.org/the-right-to-design-babies-human-rights-and-bioethics/>
65. Citorik R.J., Mimee M., Lu T.K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2014. **32**(11): 1141–1145. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3011>
66. Bikard D., Euler C.W., Jiang W., Nussenzweig P.M., Goldberg G.W., Duportet X., Fischetti V.A., Marraffini L.A. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. Biotechnol.* 2014. **32**(11): 1146–1150. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3043>
67. Yosef I., Manor M., Kiro R., Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. **112**(23): 7267–7272. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>
68. Gantz V.M., Jasinskiene N., Tatarenkova O., Fazekas A., Macias V.M., Bier E., James A.A. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. **112**(49): E6736–E6743. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1521077112>
69. Gantz V.M., Bier E. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science.* 2015. **348**(6233): 442–444. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaa5945>
70. Stokstad E. Genetically engineered moths can knock down crop pests, but will they take off? <https://www.sciencemag.org/news/2020/01/genetically-engineered-moths-can-knock-down-crop-pests-will-they-take> DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb1078>
71. Yang L., Güell M., Niu D., George H., Llesha E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J., Cortazio R., Wilkinson R.A., Fishman J.A., Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science.* 2015. **350**(6264): 1101–1104. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad1191>
72. Niu D., Wei H.J., Lin L., George H., Wang T., Lee I.H., Zhao H.Y., Wang Y., Kan Y., Shrock E., Llesha E., Wang G., Luo Y., Qing Y., Jiao D., Zhao H., Zhou X., Wang S., Wei H., Gell M., Church G.M., Yang L. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science.* 2017. **357**(6357): 1303–1307. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aan4187>
73. Gene editing spurs hope for transplanting pig organs into humans. <https://www.nytimes.com/2017/08/10/health/gene-editing-pigs-organ-transplants.html>
74. Nunes Dos Santos R.M., Carneiro D'Albuquerque L.A., Reyes L.M., Estrada J.L., Wang Z.Y., Tector M., Tector A.J. CRISPR/Cas and recombinase-based human-to-pig orthotopic gene exchange for xenotransplantation. *J. Surg. Res.* 2018. **229**: 28–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.03.051>
75. Dong C., Qu L., Wang H., Wei L., Dong Y., Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.* 2015. **118**: 110–117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.015>
76. Kaminski R., Chen Y., Fischer T., Tedaldi E., Napoli A., Zhang Y., Karn J., Hu W., Khalili K. Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing. *Sci. Rep.* 2016. **6**: 22555. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep22555>
77. Wang Z., Pan Q., Gendron P., Zhu W., Guo F., Cen S., Wainberg M.A., Liang C. CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape. *Cell Rep.* 2016. **15**(3): 481–489. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.042>
78. Kang X., He W., Huang Y., Yu Q., Chen Y., Gao X., Sun X., Fan Y. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016. **33**(298): 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0710-8>
79. Xu L., Yang H., Gao Y., Chen Z., Xie L., Liu Y., Liu Y., Wang X., Li H., Lai W., He Y., Yao A., Ma L., Shao Y., Zhang B., Wang C., Chen H., Deng H. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther.* 2017. **25**(8): 1782–1789. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.027>
80. Dash P.K., Kaminski R., Bella R., Su H., Mathews S., Ahooyi T.M., Chen C., Mancuso P., Sariyer R., Ferrante P., Donadoni M., Robinson J.A., Sillman B., Lin Z., Hilaire J.R., Banoub M., Elango M., Gautam N., Mosley R.L., Poluektova L.Y., McMillan J., Bade A.N., Gorantla S., Sariyer I.K., Burdo T.H., Young W.B., Amini S., Gordon J., Jacob

- son J.M., Edagwa B., Khalili K., Gendelman H.E. Sequential LASER ART and CRISPR treatments eliminate HIV-1 in a subset of infected humanized mice. *Nat. Commun.* 2019. **10**(1): 2753. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10366-y>
81. Yuan M., Webb E., Lemoine N.R., Wang Y. CRISPR-Cas9 as a powerful tool for efficient creation of oncolytic viruses. *Viruses*. 2016. **8**(3): E72. DOI: <https://doi.org/10.3390/v8030072>
  82. Kennedy E.M., Kornepati A.V., Goldstein M., Bogerd H.P., Poling B.C., Whisnant A.W., Kastan M.B., Cullen B.R. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J. Virol.* 2014. **88**(20): 11965–11972. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01879-14>
  83. Miller J.F., Sadelain M. The journey from discoveries in fundamental immunology to cancer immunotherapy. *Cancer Cell*. 2015. **27**(4): 439–449. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.007>
  84. Roth T.L., Puig-Saus C., Yu R., Shifrut E., Carnevale J., Li P.J., Hiatt J., Saco J., Krystofinski P., Li H., Tobin V., Nguyen D.N., Lee M.R., Putnam A.L., Ferris A.L., Chen J.W., Schickel J.N., Pellerin L., Carmody D., Alkorta-Aranburu G., Del Gaudio D., Matsumoto H., Morell M., Mao Y., Cho M., Quadros R.M., Gurumurthy C.B., Smith B., Haugwitz M., Hughes S.H., Weissman J.S., Schumann K., Esensten J.H., May A.P., Ashworth A., Kupfer G.M., Greeley S.A.W., Bacchetta R., Meffre E., Roncarolo M.G., Romberg N., Herold K.C., Ribas A., Leonetti M.D., Marson A. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature*. 2018. **559**(7714): 405–409. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0326-5>
  85. Zaroff S. CAR T-Cell therapies with a bispecific twist. *Genet. Eng. Biotech. N.* 2018. **38**(13). <https://www.geneng-news.com/magazine/car-t-cell-therapies-with-a-bispecific-twist/> DOI: <https://doi.org/10.1089/gen.38.13.09>
  86. Kojima R., Scheller L., Fussenegger M. Nonimmune cells equipped with T-cell-receptor-like signaling for cancer cell ablation. *Nature Chemical Biology*. 2018. **14**: 42–49. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2498>
  87. Montel-Hagen A., Seet C.S., Li S., Chick B., Zhu Y., Chang P., Tsai S., Sun V., Lopez S., Chen H.C., He C., Chin C.J., Casero D., Crooks G.M. Organoid-induced differentiation of conventional T cells from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2019. **24**(3): 376–389.e8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.011>
  88. White M.K., Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget*. 2016. **7**(11): 12305–12317. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7104>
  89. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature News*. 2016. **539**(7630): 479. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2016.20988>
  90. New cancer drug targets accelerate path to precision medicine. <https://www.drugtargetreview.com/news/42672/new-cancer-drug-targets-accelerate-path-to-precision-medicine/>
  91. Booth C., Gaspar H.B., Thrasher A.J. Treating immunodeficiency through HSC gene therapy. *Trends Mol. Med.* 2016. **22**(4): 317–327. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.02.002>
  92. Guan Y., Ma Y., Li Q., Sun Z., Ma L., Wu L., Wang L., Zeng L., Shao Y., Chen Y., Ma N., Lu W., Hu K., Han H., Yu Y., Huang Y., Liu M., Li D. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol. Med.* 2016. **8**(5): 477–488. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.201506039>
  93. Nelson C.E., Hakim C.H., Ousterout D.G., Thakore P.I., Moreb E.A., Castellanos Rivera R.M., Madhavan S., Pan X., Ran F.A., Yan W.X., Asokan A., Zhang F., Duan D., Gersbach C.A. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016. **351**(6271): 403–407. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5143>
  94. DeWitt M.A., Magis W., Bray N.L., Wang T., Berman J.R., Urbinati F., Heo S.J., Mitros T., Mu oz D.P., Boffelli D., Kohn D.B., Walters M.C., Carroll D., Martin D.I., Corn J.E. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci. Transl. Med.* 2016. **8**(360): 360ra134. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9336>
  95. CRISPR patent fight turns ugly as UC accuses Broad researchers of lying about claims. <https://www.genomeweb.com/business-news/crispr-patent-fight-turns-ugly-uc-accuses-broad-researchers-lying-about-claims>
  96. Sanders R. UC rings out 2019 with its 20th CRISPR patent. <https://news.berkeley.edu/2019/12/31/uc-rings-out-2019-with-its-20th-crispr-patent/>
  97. Craven L., Herbert M., Murdoch A., Murphy J., Lawford Davies J., Turnbull D.M. Research into policy: a brief history of mitochondrial donation. *Stem Cells*. 2016. **34**(2): 265–267. DOI: <https://doi.org/10.1002/stem.2221>
  98. Callaway E. UK scientists gain license to edit genes in human embryos. *Nature News*. 2016. **530**(7588): 18. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2016.19270>
  99. Mills P. Genome editing and human reproduction: The Nuffield Council on Bioethics' report. [https://www.bionews.org.uk/page\\_137343](https://www.bionews.org.uk/page_137343)

100. Becker R. The 'three-parent baby' fertility doctor needs to stop marketing the procedure, FDA says. <https://www.theverge.com/2017/8/5/16100680/three-parent-baby-fertility-doctor-fda-letter-violations>
101. This fertility doctor is pushing the boundaries of human reproduction, with little regulation. [https://www.washingtonpost.com/national/health-science/this-fertility-doctor-is-pushing-the-boundaries-of-human-reproduction-with-little-regulation/2018/05/11/ea9105dc-1831-11e8-8b08-027a6ccb38eb\\_story.html](https://www.washingtonpost.com/national/health-science/this-fertility-doctor-is-pushing-the-boundaries-of-human-reproduction-with-little-regulation/2018/05/11/ea9105dc-1831-11e8-8b08-027a6ccb38eb_story.html)
102. Sangamo ZFN Technology Platform. 2018. [https://www.sangamo.com/application/files/6915/3002/3307/IR-Technology\\_v06.12.18\\_1.pdf](https://www.sangamo.com/application/files/6915/3002/3307/IR-Technology_v06.12.18_1.pdf)
103. Haridy R. First CRISPR therapy administered in landmark human trial. <https://newatlas.com/crispr-trial-underway-vertex-gene-therapy/58643/>
104. The Future of CRISPR. <http://www.fwreports.com/dossier/the-future-of-crispr/#.XmgL-kFR2Uk>
105. «Tegsedi»: an oligonucleotide drug against familial amyloid polyneuropathy. (in Russian). <https://mosmedpreparaty.ru/news/16897>  
[«Тегседі»: олигонуклеотидное лекарство против семейной амилоидной полинейропатии.]
106. Stolberg S.G. The biotech death of Jesse Gelsinger. <http://www.nytimes.com/1999/11/28/magazine/the-biotech-death-of-jesse-gelsinger.html>
107. Bersenev A. The history of gene therapy drugs approval on the market. <http://stemcellassays.com/2011/12/history-gene-therapy-drugs-approval-market/>
108. Morrison C. 1-million price tag set for Glybera gene therapy. *Nature Biotechnology*. 2015. **33**: 217–218. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0315-217>
109. Kozubek J. Who will pay for CRISPR? <https://www.statnews.com/2017/06/26/crispr-insurance-companies-pay/>
110. Talimogene laherparepvec. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Talimogene\\_laherparepvec](https://en.wikipedia.org/wiki/Talimogene_laherparepvec)
111. Kegel M. Imlygic-Yervoy combo twice as effective as Yervoy in fighting melanoma, study finds. <https://immunoncologynews.com/2017/10/12/melanoma-investigational-therapy-combo-imlygic-yervoy-twice-as-effective-yervoy-alone-study-finds/>
112. Mullin E. A gene therapy that cures a rare genetic disease just got its first customer, a year after it was approved. <http://www.businessinsider.com/gsk-strimvelis-gene-therapy-used-for-the-first-time-after-approval-2017-5>
113. Al Idrus A. Orchard Therapeutics' 2019: Pipeline progress, breaking ground on its \$90M manufacturing site. <https://www.fiercebiotech.com/biotech/orchard-therapeutics-2019-pipeline-progress-breaking-ground-its-90m-manufacturing-site>
114. Sampson T.R., Saroj S.D., Llewellyn A.C., Tzeng Y.L., Weiss D.S. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*. 2013. **497**(7448): 254–257. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12048>
115. Koonin E.V., Krupovic M. Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nat. Rev. Genet.* 2015. **16**(3): 184–192. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3859>
116. Wright A.V., Liu J.J., Knott G.J., Doxzen K.W., Nogales E., Doudna J.A. Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science*. 2017. **357**(6356): 1113–1118. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aao0679>
117. Jiang F., Taylor D.W., Chen J.S., Kornfeld J.E., Zhou K., Thompson A.J., Nogales E., Doudna J.A. Structures of a CRISPR/Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*. 2016. **351**(6275): 867–871. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad8282>
118. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015. **163**(3): 759–771. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
119. Gleeson A., Sawyer A. CRISPR/Cas9: the gold standard of genome editing? *Biotechniques*. 2018. **64**(6): 239–243. DOI: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0066>
120. Sansbury B.M., Wagner A.M., Nitzan E., Gabi T., Kmeic E.B. CRISPR-directed in vitro gene editing of plasmid DNA catalyzed by Cpf1 (Cas12a) nuclease and a mammalian cell-free extract. *CRISPR J.* 2018. **1**(2): 191–202. DOI: <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0006>
121. Burstein D., Harrington L.B., Strutt S.C., Probst A.J., Anantharaman K., Thomas B.C., Doudna J.A., Banfield J.F. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*. 2017. **542**(7640): 237–241. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature21059>
122. Hegge J.W., Swarts D.C., van der Oost J. Prokaryotic Argonaute proteins: novel genome-editing tools? *Nat. Rev. Microbiol.* 2017. **16**(1): 5–11. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.73>
123. Harrington L.B., Burstein D., Chen J.S., Paez-Espino D., Ma E., Witte I.P., Cofsky J.C., Kyrpides N.C., Banfield J.F., Doudna J.A. Programmed DNA Destruction by Miniature CRISPR-Cas14 Enzymes. *Science*. 2018. **362**(6416): 839–842. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aav4294>

124. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 2016. **353**(6299): aaf5573. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
125. Smargon A.A., Cox D.B., Pyzocha N.K., Zheng K., Slaymaker I.M., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.A., Essletzbichler P., Shmakov S., Makarova K.S., Koonin E.V., Zhang F. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol. Cell*. 2017. **65**(4): 618–630.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.023>
126. Yan W.X., Chong S., Zhang H., Makarova K.S., Koonin E.V., Cheng D.R., Scott D.A. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol Cell*. 2018. **70**(2): 327–339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.028>
127. Chatterjee P., Jakimo N., Jacobson J.M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. *Sci. Adv.* 2018. **4**(10): eaau0766. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau0766>
128. New DNA 'shredder' technique goes beyond CRISPR's scissors. <https://www.drugtargetreview.com/news/42518/new-dna-shredder-technique-goes-beyond-crisprs-scissors/>
129. Sadhu M.J., Bloom J.S., Day L., Siegel J.J., Kosuri S., Kruglyak L. Highly parallel genome variant engineering with CRISPR-Cas9. *Nat. Genet.* 2018. **50**(4): 510–514. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0087-y>
130. Enzyme fragment complementation assay technology. <https://www.discoverx.com/technologies-platforms/enzyme-fragment-complementation-technology>
131. Biosensor development using CRISPR to quantify endogenous protein modulated by targeted protein degraders. <http://www.healthtech.com/eurofins-biosensor-Development-using-crispr/>
132. Zengerle M., Chan K.-H., Ciulli A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* 2015. **10**(8): 1770. DOI: <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00216>
133. Single-stranded DNA synthesis service. <https://www.genscript.com/new-single-stranded-dna-synthesis-service.html>
134. Strecker J., Ladha A., Gardner Z., Schmid-Burgk J.L., Makarova K.S., Koonin E.V., Zhang F. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science*. 2019. **365**(6448): 48–53. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aax9181>
135. Stafforst T., Schneider M.F. An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. **51**(44): 11166–11169. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201206489>
136. Reardon S. Step aside CRISPR, RNA editing is taking off. *Nature*. 2020. **578**(7793): 24–27. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00272-5>
137. Pennisi E. The CRISPR craze. *Science*. 2013. **341**(6148): 833–836. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.341.6148.833>
138. Gene editing like CRISPR is too important to be left to scientists alone. <https://www.theguardian.com/comment-isfree/2019/oct/22/gene-editing-crispr-scientists>

S.V. Komisarenko, S.I. Romanyuk

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

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

The review discusses the history of discovery, rapid development and further prospects for the use of a new powerful genome editing tool, CRISPR/Cas9. Taking one of the elements of the bacterial protective system, biologists have created a simple, inexpensive and fast method of altering the DNA of plants, animals and humans. Never before has humanity had such an accurate tool for gene manipulation, and this opens up great opportunities for the prevention and treatment of many diseases. At the same time, there is a heated debate in society: will CRISPR/Cas9 bring good or evil to humanity? Like any new technology, gene editing raises concerns and raises a number of serious ethical issues, especially regarding its use on germline cells and the genome of human embryos. However, it is already clear that CRISPR/Cas9 is not another fancy “toy” for scientists, but a revolutionary technology that will change our future.

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