

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-481-tabl3>

Таблица 3. Примеры изучения in vitro и in vivo потенциала применения систем редактирования генома для лечения заболеваний

Table 3. Examples of in vitro and in vivo studies of the therapeutic potential of genome-editing systems

Система редактирования / вектор / трансген Editing system / vector / transgene	Заболевание Disease	Доза Dose	Модель Model	Способ введения Administration route	Результат Result	Источник Reference
CRISPR-Cas9 / AAV8 / ген OTC CRISPR-Cas9 / AAV8 / OTC gene	Дефицит орнитин-транскарбамилазы (нарушение обмена мочевины) Ornithine trans-carbamylase deficiency (urea cycle disorder)	Целевой и контрольный вектор: 5×10 ¹¹ копий на мышь, Вектор Cas9: 5×10 ¹⁰ копий на мышь Target and control vector: 5×10 ¹¹ copies per mouse, Cas9 vector: 5×10 ¹⁰ copies per mouse	in vivo Новорожденные самцы мышей spf ^{ash} in vivo Newborn male spf ^{ash} mice	Височная вена Temporal vein	25 и 35% гепатоцитов экспрессировали целевой ген через 3 и 8 нед. соответственно после введения, что в 4 и 3 раза выше, чем у группы контроля 25 and 35% of hepatocytes expressed the target gene in 3 and 8 weeks after administration, which is 4 and 3 times higher than that in the control group, respectively	[32]
CRISPR-Cas9 / плазмидный вектор PAEGP, заключенный в липосомы / ген AGT CRISPR-Cas9 / liposome-PAEGP plasmid vector / AGT gene	Первичная гипероксалурия 1 типа Primary hyperoxaluria type 1	2×10 ⁵ PH1-иПСК были трансфицированы 1 мг PAEGP плазмиды, 1 мг pUC19-sgRNA-T2 плазмиды с гидовой РНК и 1 мг CRISPR нуклеазной мРНК 2×10 ⁵ PH1-iPSCs were transfected with 1 mg of PAEGP plasmid, 1 mg of pUC19-sgRNA-T2 plasmid, and 1 mg of CRISPR nuclease mRNA	in vitro PH1-иПСК in vitro PH1-iPSCs	Трансфекция Transfection	Продemonстрирована специфичная экспрессия целевого гена в гепатоцит-подобных клетках. Активность CYP3A4 увеличилась в 50–280 раз по сравнению с контролем. Показана возможность восстановления экспрессии AGT при помощи редактирования генома для первичной гипероксалурии The study demonstrated specific expression of the target gene in hepatocyte-like cells, a 50- to 280-fold increase in CYP3A4 activity compared to the control level, and the possibility of restoring AGT expression with genome editing for primary hyperoxaluria treatment	[33]
TALEN, CRISPR-Cas9 / GFP-NTF3, меченая EGFP гидовая РНК / ген NTF3 TALEN, CRISPR-Cas9 / GFP-NTF3, EGFP sgRNA / NTF3 gene	Мутация гена NTF3, вызывающая нейродегенеративные заболевания и потерю слуха NTF3 gene mutation causing neurodegenerative diseases and hearing loss	TALEN: трансфекция 300 нг векторов GFP-NTF3 TALEs 1–5 с 0,8 мкл Липофектамина 2000 TALEN: transfection of 300 ng of GFP-NTF3 TALE 1–5 vectors with 0.8 µL of Lipofectamine 2000 Cas9: 100 нМ Cas9, 50 нМ меченой гидовой РНК с 0,8 мкл RNAiMAX или Липофектамина 2000 Cas9: 100 nM of Cas9, 50 nM of eGFP sgRNA with 0.8 µL of RNAiMAX or Lipofectamine 2000 in vivo Cas9 с гидовой РНК: 0,3 мл 33 мкМ Cas9, 16,5 мкМ меченой гидовой РНК в 50% RNAiMAX или Липофектаmine 2000 in vivo Cas9–sgRNA complexes: 0.3 mL of 33 µM Cas9, 16.5 µM eGFP sgRNA in 50% RNAiMAX or Lipofectamine 2000	in vitro: • TALEN: HEK293T клетки in vitro • TALEN: HEK293T cells • Cas9: U2OS меченые EGFP репортерные клетки. • Cas9: U2OS-EGFP reporter cells in vivo • Cas9 с гидовой РНК: трансгенная Atoh1-GFP мышь на 2 постнатальный день in vivo • Cas9–sgRNA complexes: postnatal day 2 transgenic Atoh1-GFP mice	TALEN/Cas: трансфекция с липофектаминоm TALEN/Cas: transfection with lipofectamine in vivo: во внутреннее ухо in vivo: inner ear	TALEN: 10-кратное увеличение уровней экспрессии гена нейротрофина 3 через 48 ч после трансфекции TALEN: 10-fold increase in neurotrophin 3 gene expression in 48 h after transfection Cas9: 65–80% повреждение гена eGFP. До 40% увеличение специфичности доставки Cas9 Cas9: 65–80% eGFP gene disruption and an increase in specificity for Cas9 delivery of up to 40% in vivo Cas9 с гидовой РНК: потеря экспрессии GFP у 13–20% волосковых клеток внутреннего уха мышей in vivo Cas9–sgRNA complexes: loss of GFP expression in 13–20% of mouse inner ear hair cells	[34]
CRISPR-Cas9 / AAV6 / ген IL2RG CRISPR-Cas9 / AAV6 / IL2RG gene	Х-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (мутация IL2RG гена Х-хромосомы) X-linked severe combined immunodeficiency (IL2RG gene mutation in X-chromosome)	28,4×10 ⁶ CD34+ ГСК/мышь 28.4×10 ⁶ CD34+ HSPCs/mouse	in vivo Нелетально облученные NSG мыши in vivo Sublethally irradiated NSG mice	Внутрибедренный (взрослым мышам), внутрипеченочный (3–4-дневным детенышам) Intrafemoral (adult mice), intrahepatic (4 days old pups)	До 20% целевого встраивания гена в ГСК длительной пролиферации. Отсутствие токсичности. До 60% уровень таргетной активности (медиана — 45%) в CD34+ ГСК The study showed up to 20% targeted gene insertion in LT-HSCs, no evidence of cytotoxic effects, and up to 60% of target activity (median 45%) in CD34+ HSPCs	[35]
CRISPR-Cas9 / амфифильный наноконплекс / ген Bace1 CRISPR-Cas9 / amphiphilic nanopomplex / Bace1 gene	Болезнь Альцгеймера Alzheimer's disease	10 мкл комплекса Cas9 с гидовой РНК и пептидом R7L10 (в соотношении 1:3 по массе) 10 µL of the Cas9–sgRNA complex with R7L10 (1:3 w/w ratio)	• 6-месячные самцы 5XFAD мышей, экспрессирующие APP человека • 6-month-old male 5XFAD mice expressing human APP • 4-месячные самцы мышей с нокином гена APP • 4-month-old male APP knock-in mice • B6C57 самцы мышей (контроль) • Male B6C57 mice (control group)	Гиппокамп, средний мозг Hippocampus, midbrain	Снижение эксперессии гена β-секретазы 1 на 70%, а также значительное снижение фрагментов β-амилоидов, через 4 недели после введения мышам, экспрессирующим человеческий APP. Эффективность редактирования — 45%. Улучшение результатов в функциональных тестах мышей The product demonstrated a 70% decrease in β-sercetase 1 expression and a significant reduction in β-amyloid fragments in mice expressing human APP 4 weeks after administration. Editing efficiency was 45%. Mice showed improved results in functional tests	[36]
CRISPR-Cas9 / AAV6 / ген Dmd AAV6 / ген Sftpc CRISPR-Cas9 / AAV6 / Dmd gene	Миодистрофия Дюшенна Duchenne muscular dystrophy	(2,5–5)×10 ¹⁰ векторных геномов на мышь (1–10)×10 ¹² векторных геномов на мышь (при многократном введении) (2.5–5)×10 ¹⁰ vector genomes per mouse (1–10)×10 ¹² vector genomes per mouse (for multiple injections)	C57BL/6-mdx ^{4cv} мышь на 10–12-й неделе жизни 10–12-week-old C57BL/6-mdx ^{4cv} mice	Внутримышечно Intramuscular В ретро-орбитальную синусную вену Retro-orbital injection	Белок дистрофин экспрессировался в 70% миогенных областей обработанных мышц. Многократное введение привело к высокой экспрессии дистрофина в мышцах Dystrophin expression was observed in 70% of the myogenic area of treated muscles. Multiple injections lead to widespread dystrophin expression in muscles	[37]
CRISPR-Cas9 / Ad / ген Sftpc CRISPR-Cas9 / Ad / Sftpc gene	Врожденный дефицит белков сурфактанта Inherited surfactant protein syndromes Кистозный фиброз (муковисцидоз) Cystic fibrosis (mucoviscidosis) Дефицит α-1-антитрипсина α-1-antitrypsin deficiency	10 мкл вируса с 10 мкл теофиллина (1,6 мг/мл) на мышь 10 µL of virus with 10 µL of theophylline (1.6 mg/mL) per mouse	Sftpc ^{TS1} мышь с мутацией гена сурфактантного С белка Sftpc ^{TS1} mutant mice R26 ^{mTmG/+} мышь R26 ^{mTmG/+} mice	Внутриамниотический Intra-amniotic	Эффективность трансдукции составила 35 и 71% для клеток легких и эпителия соответственно. Модифицированные клетки обнаруживались до 6 месяцев после введения. Показано увеличение выживаемости мышей, получивших дозы препарата (8% по сравнению с 0% мышей контрольной группы через 24 ч) Transduction efficiencies were 35 and 71% for lung cells and epithelium cells, respectively. Modified cells were observed up to 6 months after administration. Mice injected with the test product showed increased survival rates (8% versus 0% in the control group after 24 h)	[38]

Примечание. CRISPR — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; Cas9 — CRISPR-ассоциированный белок 9; AAV8 — адено-ассоциированный вирус 8 типа; PH1-iPSCs (PH1-иПСК) — ассоциированные с первичной гипероксалурией 1-го типа индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; mRNA (мРНК) — матричная РНК; CYP3A4 — цитохром P450 3A4; AGT — аланинглиоксилатаминотрансфераза; TALEN — эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции; NTF3 — ген нейротрофина 3; (E)GFP — (усовершенствованный) зеленый флуоресцентный белок; sgRNA — гидовая РНК; HSPC (ГСК) — гемопоэтические стволовые клетки; NSG mouse — иммунодефицитная диабетическая гамма-мышь без ожирения; SCID — тяжелый комбинированный иммунодефицит; LT-HSC — ГСК длительной пролиферации; YAC128 — искусственная дрожжевая хромосома 128; APP — ген белка-предшественника β-амилоида; AAV6 — адено-ассоциированный вирус 6-го типа; Ad — аденовирус; OTC — ген орнитинтранскарбамилазы; AGT — ген аланинаминотрансферазы; IL2RG — ген рецептора интерлейкина 2 гамма; Bace1 — ген β-секретазы 1; Dmd — ген дистрофина; Sftpc — ген сурфактантного белка С.

Note. CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas9, CRISPR-associated protein 9; AAV8, adeno-associated virus serotype 8; PH1-iPSC, primary hyperoxaluria type 1-induced pluripotent stem cells; mRNA, messenger RNA; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; AGT, alanine glyoxylate aminotransferase; TALEN, transcription activator-like effector nucleases; NTF3, neurotrophin 3 gene; (e)GFP, (enhanced) green fluorescent protein; sgRNA, single guide RNA; HSPC, haematopoietic stem and progenitor cells; NSG, non-obese diabetic SCID gamma mouse; SCID, severe combined immunodeficiency; LT-HSC, long-term haematopoietic stem cells; TRPC1, transient receptor potential canonical 1; YAC128, yeast artificial chromosome 128; APP, β-amyloid precursor protein gene; AAV6, adeno-associated virus serotype 6; Ad, adenovirus; OTC, ornithine transcarbamylase gene; AGT, alanine glyoxylate aminotransferase gene; IL2RG, interleukin 2 receptor subunit gamma gene; Bace1, β-secretase 1 gene; Dmd, dystrophin gene; Sftpc, surfactant protein C gene.