

# О новых разработках в области биологических наук для здравоохранения

Член-корр. РАН А.В. Васильев  
Кафедра эмбриологии Биологического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Н.К. Кольцов  
провозгласил переход от  
описательной, сравнительной  
биологии к  
биологии экспериментальной,  
креативной, создающей.

1933 г.  
Роль хромосом в  
наследственности

1953  
Расшифровка структуры ДНК

1998 г.  
Открытие эмбриональных  
стволовых клеток человека

2001г.  
Расшифровка генома человека

2006 г.  
Открытие плюрипотентных  
клеток человека

2010 г.  
Первый синтетический  
геном

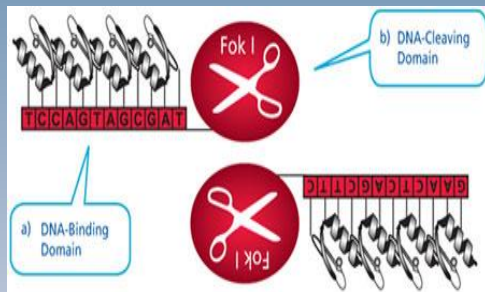
2013 г.  
Редактирование генома  
эукариотических клеток

2017 г.  
Редактирование генома  
эмбриона человека

# Используемые системы редактирования генома

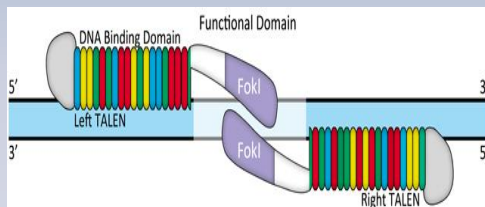
## ZFN

Нуклеазы на основе «цинковых пальцев»

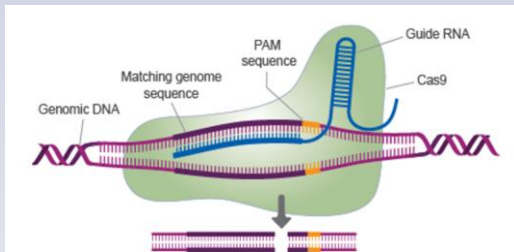


## TALEN

Нуклеазы на основе белков TALE



## CRISPR-Cas9



## Принцип

## Недостатки

## Достоинства

Узнавание триплетов нуклеотидов генетического кода доменами «цинковыми пальцами», димеризация FokI и разрезание обеих нитей ДНК

Низкая эффективность, сложность редизайна системы, чувствительность к метилированию ДНК, необходимость димеризации

Узнавание последовательности 20 букв генетического кода, белком TALEN, димеризация FokI и разрезание обеих нитей ДНК

Сложность редизайна системы, чувствительность к метилированию ДНК, необходимость димеризации

Высокая целевая эффективность

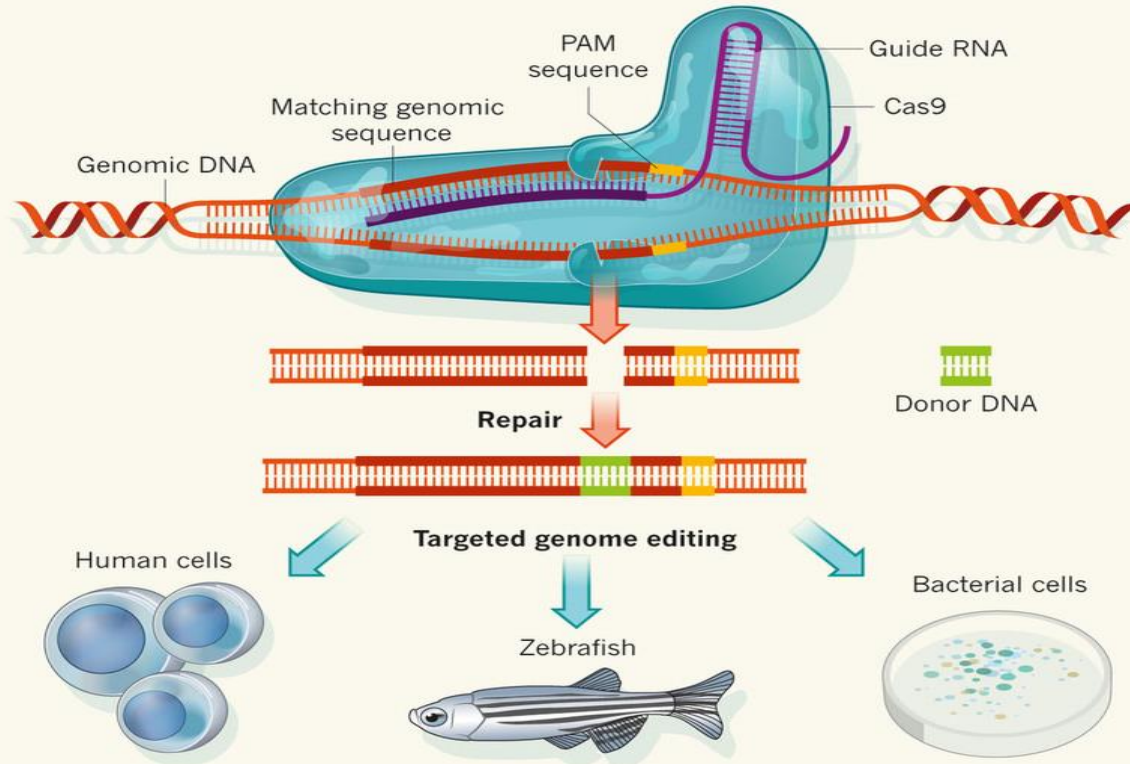
Узнавание последовательности 20 букв генетического кода при помощи «гидовой» РНК, разрезание обеих нитей ДНК белком Cas9

Относительно высокая нецелевая активность

Высокая эффективность, легкость редизайна системы, нечувствительность к метилированию ДНК, относительно легкая доставка в клетки, мультиплексное действие

**В настоящий момент CRISPR-Cas9 является системой выбора для научных исследований и практического применения**

# Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)



## Области применения систем редактирования генома (и CRISPR/Cas9, в частности)

- **Сельское хозяйство (создание геномно-модифицированных организмов с заданными характеристиками)**
- **Экология (изменение экосистем для нужд человека)**
- **Биотехнологическая промышленность (создание клеточных линий-продуцентов и организмов-продуцентов по новым технологиям).**
- **Медицина (лечение наследственных заболеваний, создание новых стратегий лечения трудноизлечимых заболеваний)**

**Редактирование генома способно существенно (и непредсказуемо) изменить среду обитания людей**

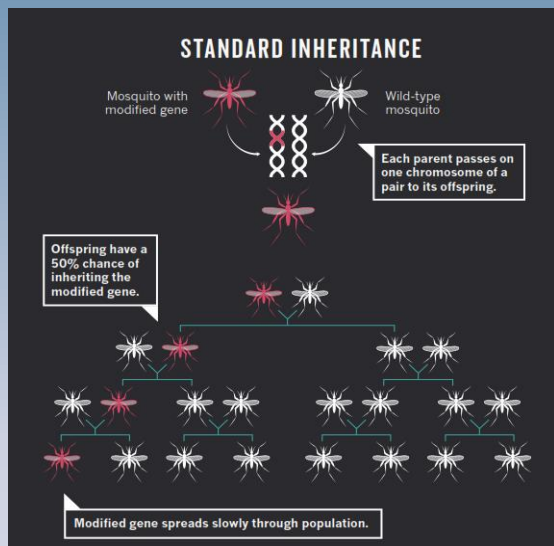
## Перспективное направление применения CRISPR/Cas9 в сельском хозяйстве

Пример: нокаут гена миостатина MSTN вызывает гипертрофию мышц и изменение коэффициента жировой массы



**Редактирование генома может привести к резкому повышению эффективности животноводства**

# Изменение экосистем при помощи CRISPR/Cas9



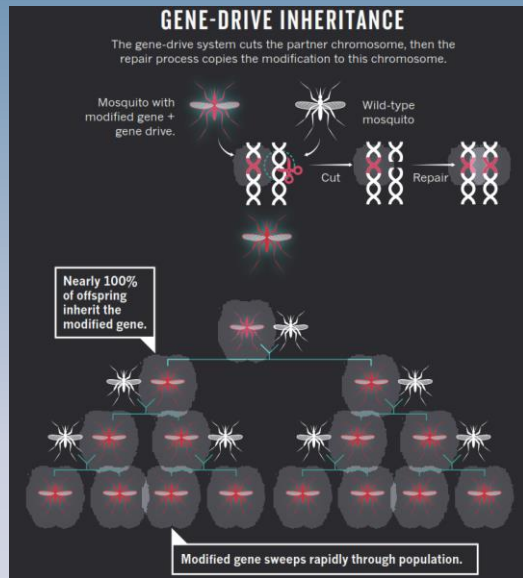
Заселение экосистем простыми генно-модифицированными комарами **неэффективно**, поскольку желаемый признак закрепляется **медленно**

В 2015 году ВОЗ зарегистрировало **214 000 000** новых случаев заболевания малярии, из которых **438 000** - закончились смертью.

Одна из возможных стратегий по борьбе с малярией – замещение комаров «дикого типа» (способных к переносу возбудителя малярии) на генно-модифицированных комаров, которые будут обладать соответствующей резистентностью.

В декабре 2016 года под эгидой ООН состоялась 13-ая Конференция по биоразнообразию, на которой должны был рассмотрен вопрос о введении моратория на использование технологии генного дрейфа.

В результате остановлено проведение подготовленной учеными акции по тотальному уничтожению малярийного плазмодия



Заселение экосистем комарами с **генным дрейфом** системы CRISPR/Cas9 **эффективно**, поскольку желаемый признак **быстро** вытеснит «дикий тип».

**Генный дрейф может приводить к распространению в популяции особей с отрицательной способностью к адаптации. Редактирование генома (генный драйв) - угроза биоразнообразию.**

# Возможное направление применения CRISPR/Cas9 в медицине: онкология

Нокаут генов ответственных за РТПХ может облегчить поиск совместимых доноров для пересадки костного мозга при лейкемии и лучевой терапии



Leyla Richards is in remission from leukaemia after getting cells treated with DNA-cutting enzymes.

## GENETIC MODIFICATION

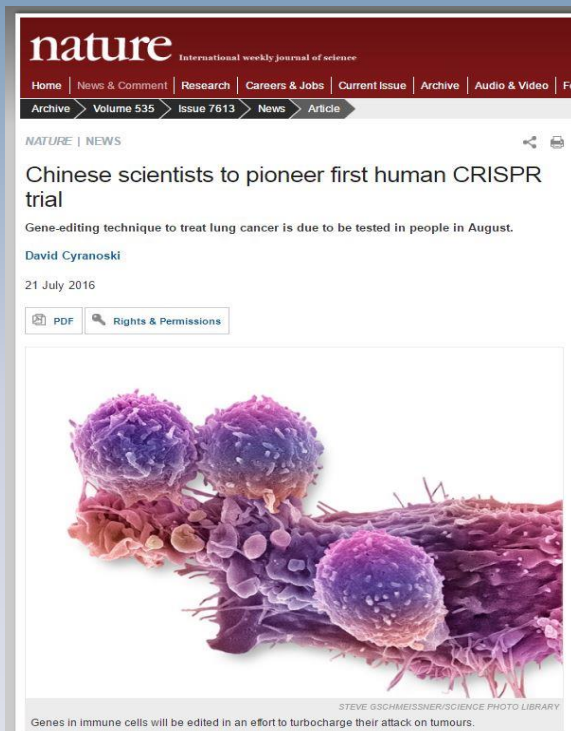
### Gene-editing wave hits clinic

Companies prepare to test range of therapies in people.

BY SARA REARDON

Leyla Richards, a one-year-old girl with leukaemia, is in remission thanks to gene-editing technology that allowed her to receive modified immune cells from another person.

A company headquartered in Paris, is designed to deactivate immune genes that would otherwise cause the donor cells to attack when injected into another person. The system also modifies genes to protect the cells from anti-cancer drugs. The individual then undergoes therapy to destroy his or her own immune cells.



**nature** International weekly journal of science

Home | News & Comment | Research | Careers & Jobs | Current Issue | Archive | Audio & Video | For

Archive | Volume 535 | Issue 7613 | News | Article

NATURE | NEWS

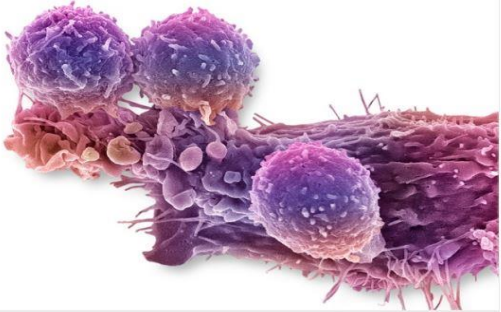
### Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial

Gene-editing technique to treat lung cancer is due to be tested in people in August.

David Cyranoski

21 July 2016

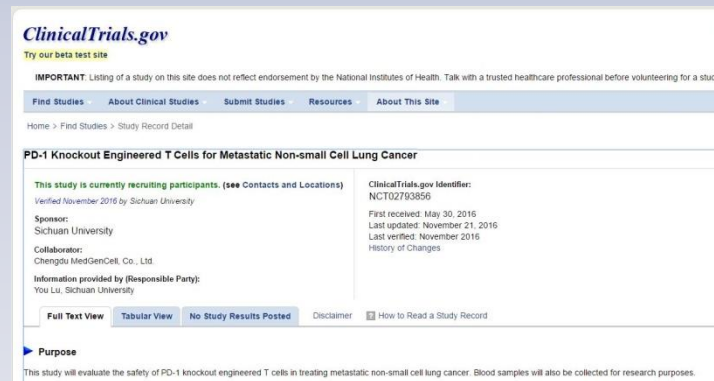
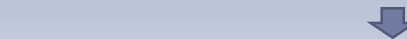
PDF | Rights & Permissions



Genes in immune cells will be edited in an effort to turbocharge their attack on tumours.

STEVE GSCHEISSNER/SCIENCE PHOTO LIBRARY

Нокаут гена PD-1 может повысить эффективность работы собственных Т-лимфоцитов против некоторых видов рака (например немелкоклеточного рака легкого). Данная технология также может применяться в совокупности с CAR-T технологией



**ClinicalTrials.gov**

Try our beta test site

**IMPORTANT:** Listing of a study on this site does not reflect endorsement by the National Institutes of Health. Talk with a trusted healthcare professional before volunteering for a study.

Find Studies | About Clinical Studies | Submit Studies | Resources | About This Site

Home > Find Studies > Study Record Detail

### PD-1 Knockout Engineered T Cells for Metastatic Non-small Cell Lung Cancer

This study is currently recruiting participants. (see Contacts and Locations)

Verified November 2016 by Sichuan University

Sponsor:  
Sichuan University

Collaborator:  
Chengdu MedGenCell, Co., Ltd

Information provided by (Responsible Party):  
You Lu, Sichuan University

ClinicalTrials.gov Identifier:  
NCT02793856

First received: May 30, 2016  
Last updated: November 21, 2016  
Last verified: November 2016  
History of Changes

Full Text View | Tabular View | No Study Results Posted | Disclaimer | How to Read a Study Record

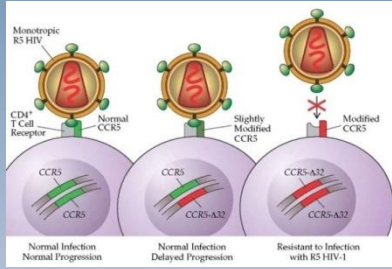
**Purpose**

This study will evaluate the safety of PD-1 knockout engineered T cells in treating metastatic non-small cell lung cancer. Blood samples will also be collected for research purposes.

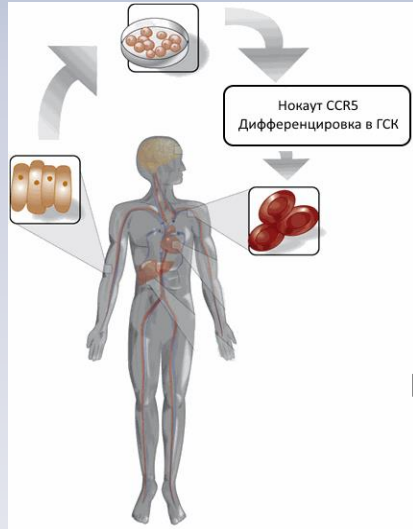
Редактирование генома позволит снизить стоимость и повысить эффективность применяемых технологий



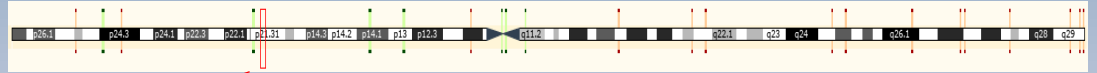
# CRISPR/Cas9 для борьбы с ВИЧ инфекцией – нокаут гена CCR5



Для проникновения в Т-лимфоцит вирус иммунодефицита человека использует в том числе рецептор CCR5. Существует и описана популяция людей с мутацией CCR5Δ32, которая приводит к нокауту данного гена и резистентности к ВИЧ. При помощи системы CRISPR/Cas9 можно искусственно вызывать эту мутацию, что позволяет разработать различные стратегии излечения данного заболевания.



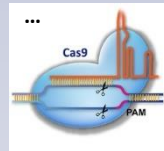
Chr 3



3-й экзон  
гена CCR5

....CAGCTCTCATTTT**CCA**TACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTT**CCA**GACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGG  
T::TCGAGAGTAAAA**GGT**ATGTCAGTCATAGTTAAGACCTTCTTAAA**GGT**CTGTAATTTCTATCAGTAGAACCCCGACCA

Cas9 +  
sgRNA



....UACAGUCAGUAUCAUUCUG  
sgRNA1

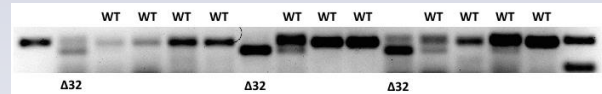
....GACAUUAAAGAUAGUCAUCU  
sgRNA2



Искусственная  
CCR5Δ32 мутация

CAGCTCTCATTTTCCATAC-----ATTAAAGATAGTCATCTT -  
Δ32  
CAGCTCTCATTTTCCATAC-----ATTAAAGATAGTCATCTT -  
Δ32

Нокаут CCR5 произведен в ИПСК  
человека, в линиях клеток  
человека 1608hT, **MT-4**



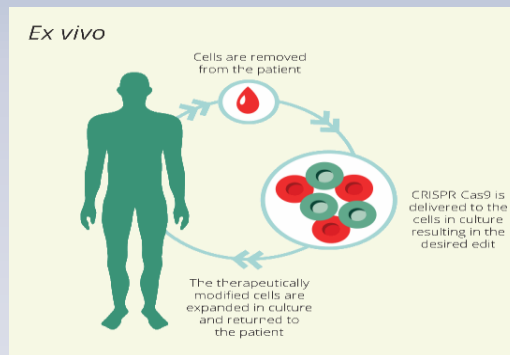
## НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

НЕНАСЛЕДУЕМЫЕ  
МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМА-  
РЕДАКТИРОВАНИЕ  
ГЕНОМА *IN SITU* (*IN VIVO*)



ФЗ-61 «Об обращении  
лекарственных средств»

НЕНАСЛЕДУЕМЫЕ МОДИФИКАЦИИ  
ГЕНОМА - РЕДАКТИРОВАНИЕ  
ГЕНОМА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК *IN  
VITRO* С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ  
ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ



ФЗ-180 «О биомедицинских  
клеточных продуктах»

НАСЛЕДУЕМЫЕ МОДИФИКАЦИИ  
ГЕНОМА – РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА  
ЭМБРИОНА



Отсутствует правовое регулирование

**Редактирование генома позволит обеспечить ранее недостижимую эффективность методов лечения**

# Первые опубликованные исследования по редактированию генома эмбриона человека

## Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis

Norah M. E. Fogarty, Afshan McCarthy, Kirsten E. Snijders, Benjamin E. Powell, Nada Kubikova, Paul Blakeley, Rebecca Lea, Kay Elder, Sissy E. Wamathia, Daesik Kim, Valdome Maciulyte, Jens Kleinjung, Jin-Soo Kim, Dagan Wells, Ludovic Vallier, Alessandro Bertero, James M. A. Turner & Kathy K. Niakan

Affiliations | Contributions | Corresponding author

*Nature* 550, 67–73 (05 October 2017) | doi:10.1038/nature24033  
Received 12 June 2017 | Accepted 29 August 2017 | Published online 20 September 2017  
| Corrected online 22 September 2017  
Erratum (October, 2017)

Великобритания, 2017



Molecular Genetics and Genomics  
June 2017, Volume 292, Issue 3, pp 525–533 | Cite as

### CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein

Authors Authors and affiliations

Lichun Tang, Yanting Zeng, Hongji Du, Mengmeng Gong, Jin Peng, Buxi Zhang, Ming Lei, Fang Zhao, Weihua Wang, Xiaowei Li, Jianqiao Liu

Китай, 2017



Protein & Cell  
May 2015, Volume 6, Issue 5, pp 363–372 | Cite as

### CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes

Authors Authors and affiliations

Puping Liang, Yanwen Xu, Xiya Zhang, Chenhui Ding, Rui Huang, Zhen Zhang, Jie Lv, Xiaowei Xie, Yuxi Chen, Yujing Li, Ying Sun, Yaofu Bai, Zhou Songyang, Wenbin Ma, Canquan Zhou, Junju Huang

Китай, 2015

## Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Hong Ma, Nuria Marti-Gutierrez, Sang-Wook Park, Jun Wu, Yeonmi Lee, Keiichiro Suzuki, Amy Koski, Dongmei Ji, Tomonari Hayama, Riffat Ahmed, Hayley Darby, Crystal Van Dyken, Ying Li, Eunju Kang, A.-Reum Park, Daesik Kim, Sang-Tae Kim, Jianhui Gong, Ying Gu, Xun Xu, David Battaglia, Sacha A. Krieg, David M. Lee, Diana H. Wu, Don P. Wolf + et al.

Affiliations | Contributions | Corresponding authors

*Nature* 548, 413–419 (24 August 2017) | doi:10.1038/nature23305  
Received 28 March 2017 | Accepted 27 June 2017 | Published online 02 August 2017 | Updated online 02 October 2017

США, 2017

J Assist Reprod Genet  
DOI 10.1007/s10815-016-0710-8

TECHNOLOGICAL INNOVATIONS

### Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing

Xiangjin Kang, Wenyin He, Yuling Huang, Qian Yu, Yaoyong Chen, Xingcheng Gao, Xiaofang Sun, Yong Fan

Received: 7 January 2016 / Accepted: 28 March 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

Китай, 2016

## Проблемы метода:

- Мозаицизм – невозможно одинаково модифицировать все клетки развивающегося эмбриона (бластоцисты).  
Средняя эффективность ≈ 30-70% клеток.

- Нецелевое действие системы CRISPR/Cas9 (off-target) - могут подвергнуться редактированию нецелевые гены.

Манипуляции с геномом эмбриона могут быть реализованы практически

# В настоящее время редактирование генома эмбриона в медицинских целях запрещено во всех странах

## США:

- *Национальная академия наук (NAS)*
- *Национальная академия медицины (NAM)*
- *Комитет по редактированию генома человека*
- *Общество по генной и клеточной терапии и др.*

## Европа:

- *Международный саммит Королевского сообщества Британии*
- *Европейский этический комитет по науке и новейшим технологиям (EGE) и др.*

## Азия:

- *Китайская академия наук*
- *Японское общество генной терапии*

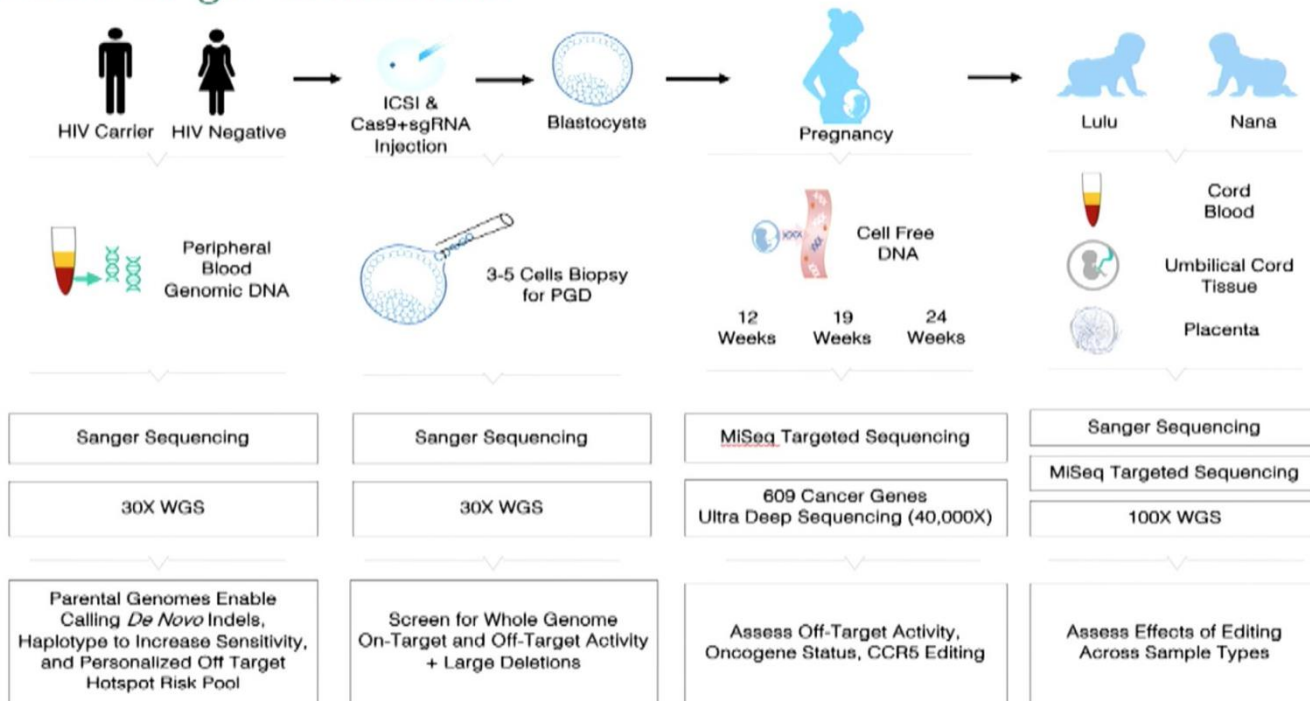
## Использование технологии редактирования генома в клинике могут быть разрешены, если:

- Нет проблем с безопасностью и эффективностью;
- позволено нормами общественной морали;
- имеются строгие системы регуляции и надзора;
- не создает неравенства в обществе.

Международное сообщество исследователей стволовых клеток (ISSCR, International Society for Stem Cell Research) отмечает, что использование технологии редактирования генома может привести к грандиозным открытиям в области биологии человека и медицины, но предупреждает, что клиническое применение CRISPR для модификации зародышевых линий или эмбрионов человека, используемых для лечения бесплодия, нельзя внедрять без тщательного рассмотрения этических проблем, социальных факторов и вопросов безопасности (2017).

# Эксперимент Хэ Цзянькуй на людях

## Overview of genomic data



# КОНВЕНЦИЯ О ЗАЩИТЕ ПРАВ И ДОСТОИНСТВА ЧЕЛОВЕКА В СВЯЗИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДОСТИЖЕНИЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ: КОНВЕНЦИЯ О ПРАВАХ ЧЕЛОВЕКА И БИОМЕДИЦИНЕ (ETS N 164)

(Овьедо, 4 апреля 1997 года) <http://bioethics.imbp.ru/Principles/Convention.html>

Статья **11** (Запрет дискриминации) : Запрещается любая форма дискриминации по признаку генетического наследия того или иного лица.

Статья **13** (Вмешательства в геном человека): Вмешательство в геном человека, направленное на его модификацию, может быть осуществлено только в профилактических, терапевтических или диагностических целях и только при условии, что **подобное вмешательство не направлено на изменение генома наследников данного человека.**

Статья **18** (Исследования на эмбрионах, проводимые *in vitro*) гласит:  
В случаях, когда закон разрешает проведение исследований на эмбрионах *in vitro*, законом же должна быть предусмотрена адекватная защита эмбрионов.

Запрещается создание эмбрионов человека в исследовательских целях.

## WHO establishing expert panel to develop global standards for governance and oversight of human genome editing

- 14 December 2018 -- WHO is establishing a global multi-disciplinary expert panel to examine the scientific, ethical, social and legal challenges associated with human genome editing (both somatic and germ cell). The panel will review the current literature on the state of the research and its applications, and societal attitudes towards the different uses of this technology. WHO will then receive advice from the panel on appropriate oversight and governance mechanisms, both at the national and global level. Core to this work will be understanding how to promote transparency and trustworthy practices and how to ensure appropriate risk/benefit assessments are performed prior to any decision on authorization.
- The recent application of tools such as CRISPR-Cas9 to edit the human genome have highlighted the need for the development of standards in this area. WHO's expert working group will work in a consultative manner and build on existing initiatives. As WHO proceeds, we are liaising with relevant UN and other international agencies, and are in communication with Academies of Science and Medicine as well as with bodies that have produced previous reports.

## Конец эволюции человека? От естественного отбора к отбору инструментальному

«Такого рода борьба с дурной наследственностью в руках неосторожной власти может стать страшным орудием борьбы со всеми уклоняющимися в сторону от посредственности и ... может привести к ... ухудшению наследственности».

«Величайшей и **наиболее ценной особенностью** человеческой расы является именно **огромное разнообразие ее генотипов, обеспечивающих прогрессивную эволюцию человека** при самых разнородных случайностях ее неведомого нам будущего».

*Н.К. Кольцов.*

*Улучшение человеческой породы. Речь на годовом заседании Русского евгенического общества*

*20 октября 1924 г.*

По-видимому, **для человека эволюция завершилась, потому что практически перестали действовать факторы естественного отбора.** Как отбирать? По признаку более сильных мышц? По признаку более здорового сердца? Более умных? Нет, потому что у нас равные возможности для всех. Все имеют одинаковые шансы оставить потомство. ...И это, наверное, справедливо, потому что таким образом **сохраняется максимальное генетическое разнообразие — на все случаи изменения среды обитания.** Это и есть главное богатство вида.

*А.Я.Каплан*

**Сейчас невозможно предсказать, какие особенности генома могут оказаться полезными в условиях непредсказуемого экологического и технологического будущего**



*Благодарю за внимание!*



# Редактирование генома эмбрионов человека в исследовательских целях

## Цели подобных исследований:

1. Подробные исследования нарушений раннего развития эмбрионов
2. Поиск решения проблем имплантации эмбрионов и бесплодия
3. Совершенствование вспомогательных репродуктивных технологий
4. Разработка подходов профилактики и лечения заболеваний

**РАЗРЕШЕНО  
РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА  
ЭМБРИОНОВ**

- США
- Великобритания
- Китай
- Швеция

**РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА  
ЭМБРИОНОВ НЕ  
ЗАПРЕЩЕНО**

- Испания
- Япония

• **РОССИЯ ?**

**ЗАПРЕЩЕНО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
ЭМБРИОНОВ**

- Германия
- Швейцария

Целесообразно выработать единую международную политику в отношении использования эмбрионов