

# ТЕХНОЛОГИЯ CRISPR/CAS В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ

В. П. Мудров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ «ГКБ № 52 ДЗМ», г. Москва, Россия

## Резюме

Технология CRISPR/Cas9 позволяет точно нацеливаться практически на любую область генома с дальнейшим изменением нуклеотидной последовательности. CRISPR адаптирована для удаления функций генов (нокаут), добавления новых функций генов, активации или подавления эндогенных генов, а также для методов геномной диагностики. Такой целенаправленный подход может помочь исправить мутации, вызывающие заболевания, или подавить гены, связанные с возникновением заболеваний. Быстрая диагностика имеет решающее значение в борьбе с высококонтагиозными заболеваниями. Для диагностики в условиях оказания медицинской помощи (РОС, «у постели больного») требуется интуитивно понятное лабораторное оборудование, быстро выдающее легко интерпретируемые результаты. Тесты для обнаружения нуклеиновых кислот на основе CRISPR в различных модификациях можно использовать в условиях РОС. Хотя технология CRISPR/Cas продемонстрировала огромный потенциал в качестве инструмента для редактирования генома, её применение в клинической практике всё ещё находится на ранней стадии. По состоянию на январь 2024 года в настоящее время проводится всего 89 клинических испытаний с использованием CRISPR, что говорит о том, что предстоит ещё много работы, прежде чем эта технология станет одобренным методом генной терапии. Примечательно, что при использовании CRISPR могут возникать непреднамеренные изменения в ДНК, и долгосрочные последствия этих изменений для здоровья пациентов остаются неопределёнными. Технологии CRISPR/Cas, полученные из адаптивных иммунных систем бактерий и архей, превратились в серию новаторских инструментов редактирования генов с использованием нуклеиновых кислот, которые выделяются благодаря их высокой эффективности, нацеливанию на конкретную последовательность, простоте программирования и универсальности. Адаптация различных стратегий CRISPR в различных условиях позволила реализовать множество ранее не существовавших возможностей, начиная от внедрения сложных решений в фундаментальных исследованиях и заканчивая эффективными диагностическими и терапевтическими подходами.

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas, тестирование у постели больного, методы амплификации нуклеиновых кислот, изотермическая амплификация НК, генная терапия.

DOI: 10.58953/15621790\_2024\_15\_3-4\_19

## CRISPR/CAS TECHNOLOGY IN MODERN MEDICINE

V. P. Mudrov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Russian Medical Academy for Continuing Professional Education, Moscow, Russia

<sup>2</sup>City Clinical Hospital No. 52 of the Department of Health of Moscow, Moscow, Russia

## Summary

CRISPR/Cas9 technology allows precise targeting of almost any region of the genome with further modification of the nucleotide sequence. CRISPR has been adapted to remove gene functions (knockout), add new gene functions, activate or suppress endogenous genes, as well as for genomic diagnostic methods. Such a targeted approach can help correct disease-causing mutations or suppress disease-causing genes. Rapid diagnosis is crucial in the fight against highly contagious diseases. For diagnosis in a medical care setting (point-of-care testing, POC) intuitive laboratory equipment is required that quickly produces easily interpretable results. Tests for the detection of nucleic acids based on CRISPR in various modifications can be used in POC conditions. Although CRISPR/Cas technology has demonstrated great potential as a genome editing tool, its application in clinical practice is still at an early stage. As of January 2024, there are currently only 89 clinical trials using CRISPR, which suggests that there is still a lot of work to be done before this technology becomes an approved gene therapy method. Notably, when using CRISPR, unintended changes in DNA can occur, and the long-term effects of these changes on patients' health remain uncertain. CRISPR/Cas technologies derived from the adaptive immune systems of bacteria and archaea have evolved into a series of innovative gene editing tools using nucleic acids, which stand out due to their high efficiency, sequence targeting, ease

of programming, and versatility. The adaptation of various CRISPR strategies in different settings has allowed for the realization of many previously non-existent opportunities, ranging from the introduction of complex solutions in basic research to effective diagnostic and therapeutic approaches.

**Keywords:** CRISPR/Cas, point-of-care testing, nucleic acid amplification methods, isothermal NA amplification, gene therapy.

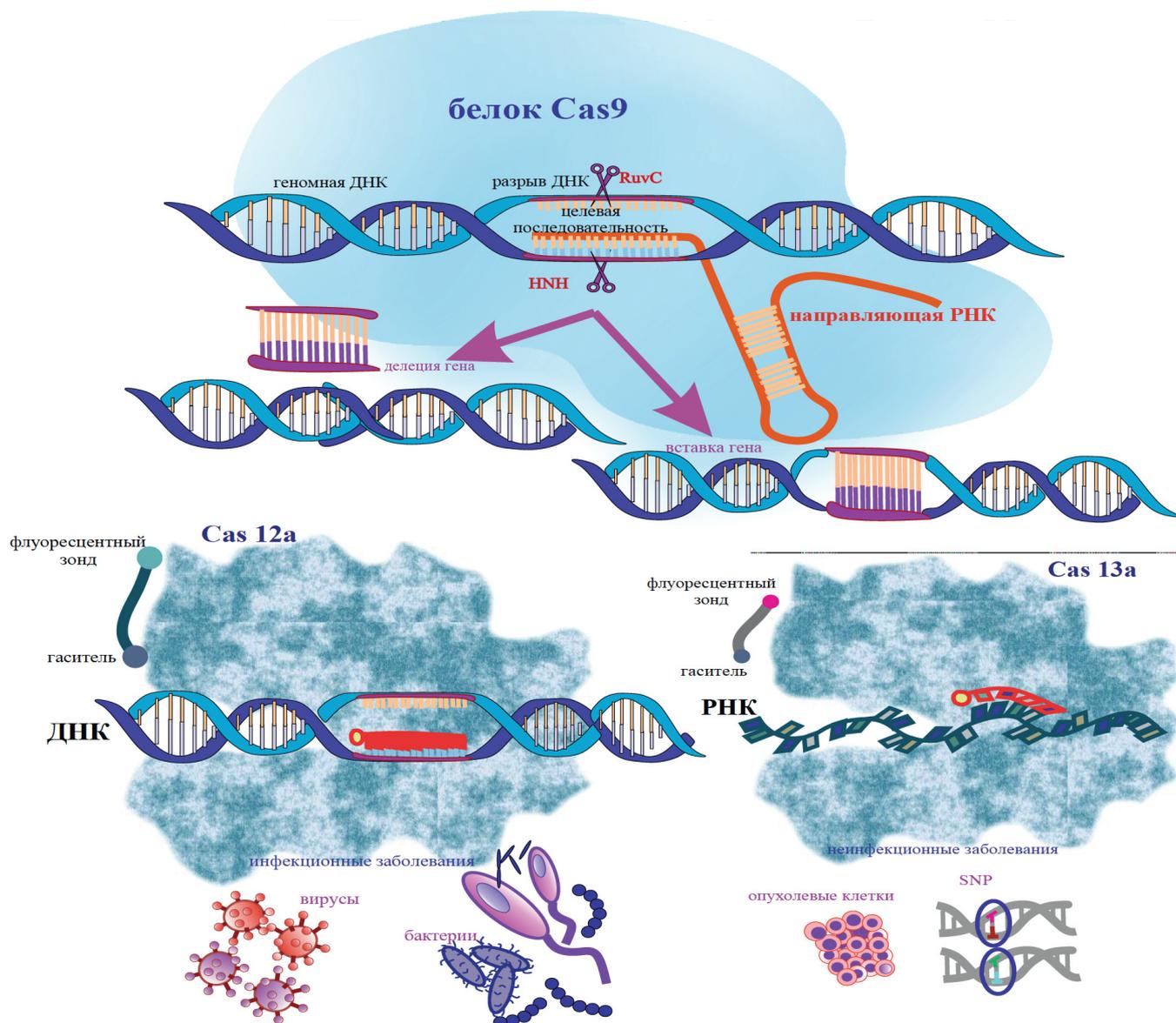
### Введение

В 2020 г. Нобелевской премии по химии были удостоены Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Дудна за исследование метода редактирования генома CRISPR/Cas9<sup>1</sup> [1]. Открытие микробной адаптивной иммунной системы CRISPR/Cas9 произвело революцию в области генетики, значительно расширив возможности редактирования генома. Биоинформа-

ционный анализ CRISPR, спейсеров<sup>2</sup> и белков Cas позволил предсказать участие этой системы в анти-вирусной защите. Это было успешно подтверждено экспериментально, исследования CRISPR превратились в динамично развивающееся направление биологии и медицины со значительным биотехнологическим потенциалом. Технология CRISPR позволяет точно нацеливаться практически на любую область ге-

Рисунок 1.

Системы CRISPR/ Cas (адаптировано по [6])



<sup>1</sup> CRISPR – кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы, Cas – CRISPR-ассоциированный фермент-нуклеаза.

<sup>2</sup> Спейсер – нетранскрибируемая последовательность ДНК между тандемно повторяющимися генами

Таблица 1.

Сравнительная оценка трех систем CRISPR / Cas (адаптировано по [6])

Система	Преимущества	Ограничения
CRISPR / Cas9	Хорошо изучена для эффективного и точного редактирования генома Простота в использовании; возможность одновременного воздействия на несколько генов в широком спектре организмов и типов клеток. Обеспечивает точное редактирование, включая делеции, вставки и точечные мутации Модифицированный Cas9 позволяет регулировать гены и осуществлять эпигенетическое редактирование.	Побочные эффекты. Трудно доставить в клетки из-за относительно большого размера. Требования PAM* ограничивают выбор целевых сегментов генов.
CRISPR / Cas12a	Повышенная чувствительность к несоответствиям в нуклеотидах, что приводит к снижению побочных эффектов. Меньший размер облегчает доставку в клетки и ткани. Более точная вставка донорской ДНК. Активность <i>транс</i> -расщепления обеспечивает универсальные стратегии обнаружения.	Требования PAM ограничивают выбор целевых сегментов генов. Повышенные требования к температурному режиму. Неспецифичность <i>транс</i> -расщепления потенциально может привести к нежелательному результату.
CRISPR / Cas13a	Цель – РНК. Может использоваться для подавления экспрессии генов без необратимого изменения генома. Требуется только одно основание, состоящее из PFS**, что обеспечивает большую гибкость при выборе генов-мишеней. Активность <i>транс</i> -расщепления обеспечивает универсальные стратегии обнаружения.	Трудно доставить в клетки из-за относительно большого размера. Неспецифичность <i>транс</i> -расщепления может привести к нежелательному расщеплению транскриптов РНК.

PAM\* – мотив, прилегающий к протоспейсеру; PFS\*\* – фланкирующий сайт протоспейсера.

нома с дальнейшим изменением нуклеотидной последовательности. CRISPR был адаптирован для удаления функций генов (нокаут), добавления новых функций генов, активации или подавления эндогенных генов, а также для методов геномной диагностики. Такой целенаправленный подход может помочь исправить мутации, вызывающие заболевания, или подавить гены, связанные с возникновением заболеваний [2–4].

Система CRISPR состоит из ассоциированной с CRISPR эндонуклеазы и одной направляющей РНК (нРНК), предназначенной для нацеливания на определённую последовательность ДНК или РНК (Рис. 1). Нуклеазы Cas – это ферменты, которые могут связываться с ДНК и создавать двухцепочечные разрывы. нРНК содержат каркасную структуру, связывающуюся с белком Cas, и уникальный сегмент, который может направить белок Cas на определённую интересующую последовательность ДНК или РНК [5,6].

Системы CRISPR/Cas были разделены на два основных класса и шесть категорий на основе свойств эффекторных комплексов и генов, кодирующих белок Cas. Системы класса 1, включающие типы I, III и IV, используют для интерференции несколько белковых комплексов Cas, в то время как системы класса 2, включающие типы II, V и VI, используют для интерференции один эффекторный белок [1,3,7]. Благодаря

своей простоте и удобству системы класса 2, представленные Cas9, Cas12a и Cas13a (Табл. 1), стали широко применяться в лабораторной диагностике и генной терапии.

CRISPR произвёл революцию в нашем понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе приобретённой устойчивости к вирусным инфекциям. Изначально система CRISPR рассматривалась как фактор наследственного адаптивного иммунитета прокариот против чужеродного генетического материала, такого как бактериофаги и бактериальные плазмиды. CRISPR/Cas– система адаптивного иммунитета у бактерий и архей, функционирующая с помощью особого механизма распознавания «свой/чужой» на основе уникальных спейсеров, гомологичных вирусной или плазмидной нуклеиновой кислоте (НК) и интегрированных в локусы CRISPR. Система CRISPR/Cas сохраняет память о предыдущих контактах с инфекционными агентами. Эта память воплощена в коротких фрагментах нуклеотидов, соответствующих несамостоятельной ДНК, которые вставляются в массив CRISPR и затем используются для атаки и уничтожения родственного вируса или плазмиды. Поэтому CRISPR/Cas часто называют системой адаптивного иммунитета прокариот.

Рисунок 2.

Основные структурные и функциональные блоки систем CRISPR/Cas (адаптировано по [7])

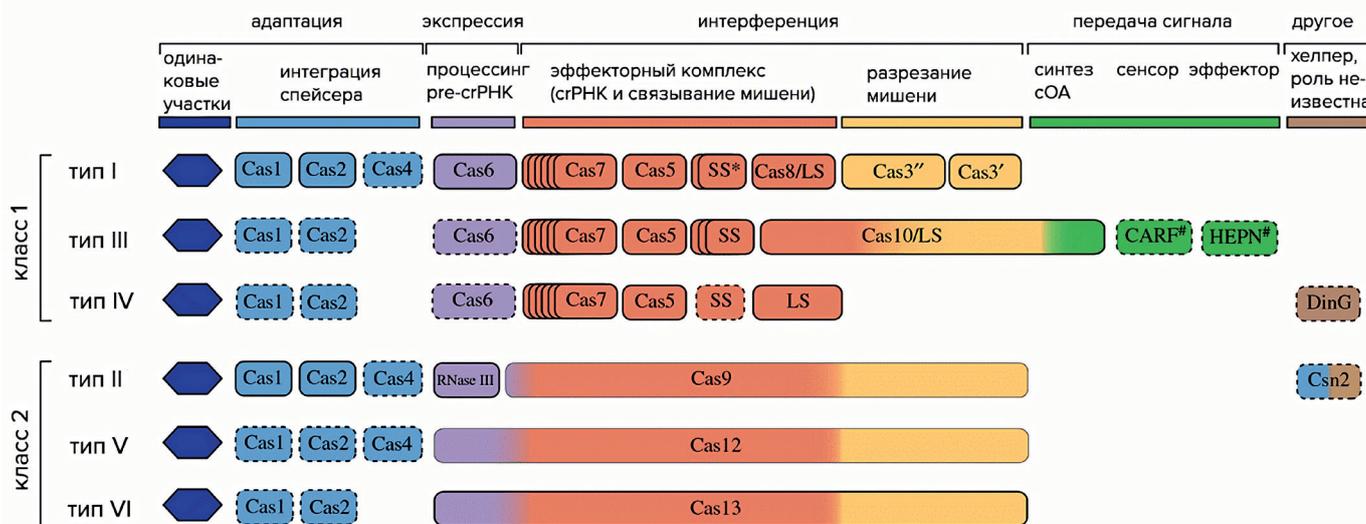
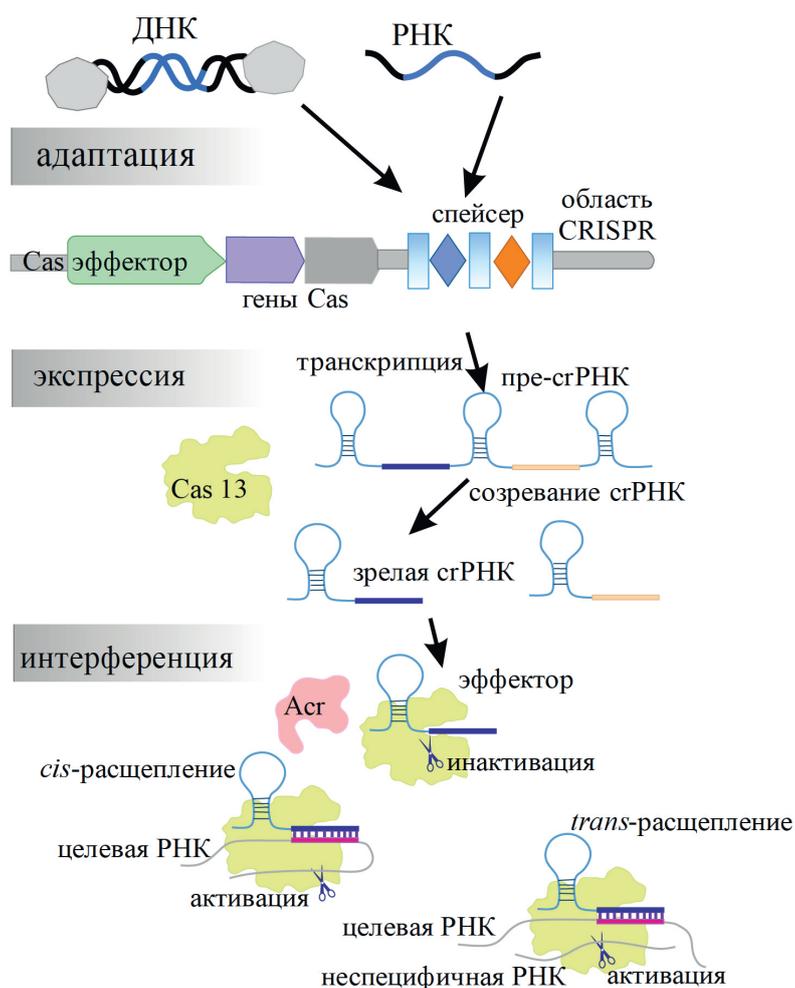


Рисунок 3.

Три этапа адаптивного иммунитета CRISPR/Cas13: адаптация, экспрессия и интерференция (адаптировано по [5])



Во многих случаях компоненты системы CRISPR/Cas заменяются гомологичными или аналогичными белками или доменами в некоторых линиях бактерий и архей (Рис. 2). Однако недавние достижения в области сравнительного анализа последовательностей, структурных исследований и экспериментальных данных позволяют предположить, что, несмотря на эту удивительную эволюционную пластичность, все системы используют одни и те же архитектурные и функциональные принципы и, учитывая сохранение основных строительных блоков, имеют общее происхождение [7].

Очерченные строительные блоки соответствуют трем функциональным стадиям иммунного ответа CRISPR/Cas, а также охватывают предполагаемые ассоциированные компоненты иммунитета, которые, по прогнозам, вовлечены в состояние покоя или запрограммированное самоубийство клеток в сочетании с ответом CRISPR.

Действие системы CRISPR/Cas обычно делится на три этапа (Рис. 3). Первый этап — адаптация или встраивание спейсеров чужеродной ДНК в кассеты CRISPR. Для этого процесса достаточно двух белков, Cas1 и Cas2. Вторым этапом является экспрессия и процессинг пре-crRNA<sup>3</sup> в короткие направляющие crRNA, обычно выполняемые специальным механизмом из одного или не-

<sup>3</sup> пре-crRNA — предшественник CRISPR RNA

скольких Cas-белков, образующих каскад (CRISPR-ассоциированный комплекс для противовирусной защиты), а в некоторых случаях включает РНК. Третья и заключительная стадия иммунитета, опосредованного CRISPR, — интерференция, когда каскад нацеливается на чужеродную ДНК или РНК с направляющей связанной кРНК.

Сравнительный анализ модульной организации систем CRISPR/Cas выявляет поразительную пластичность, при которой блоки либо не требуются, либо могут быть заменены гомологичными или аналогичными компонентами. Такие замены особенно выражены в системах типа II. Эндонуклеаза Cas1 и CRISPR-массив обладают уникальной особенностью CRISPR-систем — способностью сохранять память о встречах с инфекционными агентами. Cas1 тесно связан с рибонуклеазой Cas2. Оба белка и один CRISPR-повтор необходимы и достаточны для интеграции спейсера. Все разнообразие белков Cas, по-видимому, основано на диверсификации лишь нескольких базовых типов доменов, представленных в разнообразных комбинациях с другими доменами. Вторым ключевым обобщением является тесная связь между системами адаптивного иммунитета CRISPR/Cas и различными системами токсинов / антитоксинов, что подразумевает тесную координацию иммунного ответа с состоянием покоя и запрограммированной клеточной гибелью архей и бактерий.

### Применение системы CRISPR/Cas в диагностике

Быстрая диагностика имеет решающее значение в борьбе с высококонтагиозными заболеваниями. Для диагностики в условиях оказания медицинской помощи РОС (point-of-care testing, у постели больного) требуется доступное лабораторное оборудование, которое позволяет быстро получить легко интерпретируемые результаты. РОС-диагностика инфекционных заболеваний основана на выявлении антигенов патогена для определения возбудителя заболевания у инфицированного пациента. Тесты для обнаружения антигенов позволяют получить быстрые результаты, однако их точность может варьировать, а успешное выявление зависит от созревания вируса и концентрации вируса в биоматериале. Тесты для обнаружения нуклеиновых кислот (НК) могут выявить возбудителя инфекции до её клинического проявления. Недавно появились тесты для обнаружения НК на основе CRISPR, которые можно использовать в условиях РОС.

Исследователи объединили технологии АНК (амплификация НК) и CRISPR/Cas. Такое сочетание успешно применяется для быстрого обнаружения различных патогенов (Табл. 2). К преимуществам такого сочетания относятся низкая стоимость исследования, высокая чувствительность и специфичность, возможность быстрого обнаружения по месту оказания медицинской помощи, количественное определение НК. Изотермические МАНК (методы АНК) требуют меньше времени и затрат на анализ, особенно в сочетании с системами CRISPR/Cas [6]. Эти подходы обычно сочетают технологии амплификации с ферментами CRISPR/Cas и используют свойства распознавания последовательностей НК для обнаружения патогенов. В основном используют два основных типа эффекторов CRISPR для выявления НК: системы типа V (Cas 9 и 12), нацеленные на ДНК, и системы типа VI (Cas13), нацеленные на РНК.

### Выявление патогенов на основе ПЦР-CRISPR

ПЦР<sup>4</sup> является наиболее широко используемым техническим инструментом на основе АНК для обнаружения патогенов, повышенной или сниженной экспрессии определенных генов, репрессоров этих генов [8,9]. Имитируя процесс репликации ДНК, ПЦР работает *in vitro* путем репликации дочерней цепи ДНК комплементарной родительской цепи ДНК-матрицы после цикла денатурации-отжига-элонгации. Для улучшения эффективности обнаружения НК были разработаны мультиплексная ПЦР (мПЦР) и количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР, qPCR). Однако эти методы обнаружения имеют недостатки: длительное время обнаружения анализа и неудобство тестирования в формате РОС.

Yang H. и др. (2022) интегрировали систему CRISPR/Cas для амплификации рефрактерной к амплификации системы мутаций qPCR (ARMS-qPCR) для обнаружения однонуклеотидного полиморфизма (SNP<sup>5</sup>) в *Salmonella enterica* [10]. Результаты эксперимента показали, что чувствительность детекции превышает возможность визуализации методом гель-электрофореза. Этот метод можно использовать для анализа различных генов, которые определяют устойчивость к лекарственным препаратам. Разработан метод обнаружения бактерий на основе CRISPR/Cas13a для прямого обнаружения *Staphylococcus aureus* после ПЦР с высокой чувствительностью и специфичностью. Результаты позво-

<sup>4</sup> ПЦР — полимеразная цепная реакция

<sup>5</sup> SNP — single nucleotide polymorphism

Таблица 2.

Применение методов обнаружения CRISPR/Cas, основанных на амплификации нуклеиновых кислот (адаптировано по [6])

Технология	Тип Cas	Цель обнаружения НК	Предел обнаружения
ПЦР	Cas 9	инвазивная карцинома протоков, солидные опухоли	не указан
	Cas 12	Salmonella	не указан
	Cas 13	Staphylococcus aureus	1 копия/мл
		Klebsiella pneumoniae (карбапенем-резистентная) Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis D virus (HDV)	1 копия/мкл
LAMP	Cas 9	Salmonella, пять серотипов Neisseria meningitidis, Zika virus	не указан
	Cas 12	Salmonella	12,2 копий/мл
		SARS-CoV-2 Campylobacter jejuni	не указан 8 копий/мл
	Cas 13	SARS-CoV-2	не указан
RPA	Cas 9	SARS-CoV-2	не указан
		Мутации с одним основанием	0,2 фмоль
	Cas 12	Aspergillus besseyi, ВПЧ16, ВПЧ18	не указан
		Streptococcus agalactiae Listeria monocytogenes	5 копий/мкл 10 копий/мл
SDA	Cas 9	двуспиральная ДНК	не указан
		Escherichia coli O157: H7	40 копий/мл
	Cas 12	Простато-специфический антиген	0,03 нг/мл
		HBV	41,8 фмоль
		микроРНК SARS-CoV-2	6,28 пмоль 270 копий/мл
Cas 14	микроРНК	680 фмоль	
HDA	Cas 12	E. coli O157: H7	10 <sup>3</sup> копий/мл
RCA	Cas 9	микроРНК	фмоль
	Cas 12	микроРНК/ Parvovirus B19	0,83 фмоль/0,52 фмоль
HCR	Cas 12	Кольцевая опухолевая ДНК	5,43 фмоль
		Salmonella	2 копии/мл
		Альфа-фетопроtein	0,17 нг/мл
		Вирус папилломы человека (ВПЧ)	не указан
	Cas 13	TEV (внеклеточные везикулы опухолевого происхождения)	10 <sup>2</sup> частиц /мкл
	Cas 13	SARS-CoV-2	не указан

ляют успешно обнаруживать геномную ДНК в концентрации 1 КОЕ/мл, а динамический диапазон обнаружения *S. aureus* составляет 1 ~ 10<sup>7</sup> КОЕ/мл.

Несмотря на стремительное развитие различных способов детекции результатов ПЦР и их широкое применение в сочетании с методом CRISPR/Cas для обнаружения НК, необходимость соблюдения температурного цикла во время выполнения ПЦР значительно затрудняет их использование для обнаружения/определения концентрации в реальном времени в формате РОС. Изотермическая амплификация НК (МАНК при постоянной температуре) позволяет из-

бежать необходимости соблюдения сложного температурного цикла, требуемого при каноническом выполнении ПЦР и, следовательно, обычно позволяет завершить процесс амплификации за более короткое время, сохраняя при этом высокую эффективность, чувствительность и точность.

Типичные технологии изотермической амплификации включают петлевую изотермическую амплификацию (LAMP), рекомбиназную полимеразную амплификацию (RPA), амплификацию со смещением цепи (SDA), хеликазозависимую амплификацию (HDA), амплификацию по вращающе-

муся кругу (RCA), цепную реакцию гибридизации (HCR) и др.

### Совместное использование LAMP<sup>6</sup>-CRISPR

Технология LAMP (петлевая изотермическая амплификация) основана на синтезе ДНК-цепи с помощью ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (например, ДНК-полимераза Bst) при наличии в реакционной смеси двух пар специфических праймеров, комплементарных искомой мишени. Праймеры могут связываться с целевой последовательностью при температуре 60–65 °С, а продукт представляет собой структуру ДНК со стеблем и петлей. В течение реакции (15–60 мин) получается 10<sup>9</sup>–10<sup>10</sup> кратное увеличение исходной матрицы.

Совместное использование изотермической амплификации и методов CRISPR/Cas может значительно повысить точность результатов тестирования. Биосенсор на основе LAMP-CRISPR/Cas12a был разработан и использован для обнаружения сальмонеллы с пределом обнаружения 12,2 КОЕ/мл. RT-LAMP в сочетании с Cas12a может обнаружить одну копию SARS-CoV-2 за 45 минут. Метод RT-LAMP-CRISPR-Cas13a не требует выделения РНК и может использоваться для обнаружения РНК вирусов SARS-CoV-2 в образцах из носоглотки со 100%-ной специфичностью и 83%-ной чувствительностью. Метод CRISPR/Cas12a на основе LAMP с использованием иммуномагнитных шариков (ICB-LAMP-CRISPR/Cas12a) позволяет обнаружить ДНК *Campylobacter jejuni* при концентрации 8 геном-экв/мл.

### Технологии RPA<sup>7</sup> и CRISPR

Рекомбинантная полимеразная амплификация (RPA) — высокочувствительный и селективный метод изотермической амплификации различных мишеней, работающий при температуре 37–42 °С, способный амплифицировать от 1 до 10 копий ДНК-мишени менее чем за 20 минут. Новый метод термостатической амплификации НК разработан Пипенбургом и др. в 2006 году с использованием белковых механизмов рекомбинации и репарации, участвующих в синтезе клеточной ДНК. С момента своего появления RPA широко используется для изучения бактерий, грибов, паразитов, вирусов, генов устойчивости к лекарственным препаратам и др. В условиях АТФ и ПЭГ рекомбиназа связывается с праймерами, образуя комплекс, и ДНК-матрица этого комплекса ищет гомологичные последовательности, чтобы запустить реакцию замещения цепи и сформировать новую ДНК.

По сравнению с традиционной технологией ПЦР, диапазон исследования при этой технологии составляет 37–42 °С, требуемая исходная концентрация образца низкая, можно амплифицировать всего 1–10 копий ДНК за 10 минут, а также другие мишени, включая РНК, микроРНК, односпиральную ДНК и двуспиральную ДНК. Результаты реакции RPA можно обнаружить с помощью флуоресценции в реальном времени, гель-электрофореза, хемилюминесценции и других технологий.

Разработана технология определения безопасности пищевых продуктов (RPA-Cas12a-FS), объединяющая RPA и CRISPR-Cas12a для быстрого обнаружения патогенов, передающихся алиментарным путем. Zhang A. и др. (2022) использовали CRISPR/Cas12a в сочетании с RPA для обнаружения *Aspergillus besseyi* с пределом обнаружения 1 копия/мкл, в сочетании с анализом на полосках для визуализации результатов [11]. Tian Y. и др. (2021) объединили метод RPA-Cas12a с иммуноферментным анализом в проточном латеральном потоке, что позволило быстро выявлять *Listeria monocytogenes* [12]. Кроме того, они разработали метод, сочетающий технологию цифровых микрофлюидных капельных чипов для одновременного выявления четырёх патогенных бактерий с высокой чувствительностью и специфичностью, которая может достигать 10 КОЕ/мл. Мультиплексная микрофлюидная платформа сочетает в себе технологии RPA и CRISPR с помощью нагреваемой мембраны и позволяет выявлять ВПЧ<sup>8</sup>-16 и ВПЧ-18 менее чем за 30 минут с высокой специфичностью и чувствительностью.

### Сочетание SDA<sup>9</sup> и CRISPR

Амплификация со смещением цепей (SDA) — метод амплификации ДНК, основанный на способности фрагмента Клёнова с дефицитом экзонуклеазы удлинять 3'-конец в месте расщепления, смещать цепь ДНК и вытеснять фрагменты ДНК, расположенные далее по цепи. Экспоненциальное усиление является результатом сочетания смысловых и антисмысловых реакций, в которых нуклеиновые последовательности, вытесненные из смысловой реакции, служат мишенью для антисмысловой реакции, и наоборот. Метод также хорошо совместим с различными сигнатурными зондами. Эти свойства делают SDA инновационной методикой усиления сигнала, обладающей значительным потенциалом для многих типов биосенсоров, включая колориметрию, флуоресценцию и хемилюминесценцию.

<sup>6</sup> LAMP — Loop-mediated Isothermal Amplification

<sup>7</sup> RPA — Recombinase Polymerase Amplification

<sup>8</sup> ВПЧ — вирус папилломы человека

<sup>9</sup> SDA — Strand Displacement Amplification

Исследователи Wang W. и др. (2022) разработали платформу для колориметрического анализа, которая сочетает SDA с CRISPR/Cas12a для обнаружения простат-специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови [13]. Платформа способна дифференцировать образцы крови с раком предстательной железы, другими видами рака и здоровых людей. SDA генерирует ампликоны, распознаваемые системой CRISPR-Cas12a, и способствуют расщеплению транс-односпиральной ДНК в соседней лигированной ДНК, тем самым активируя наночастицы золота (AuNPs), подающие сигнал. Эта колориметрическая система детекции имеет предел обнаружения 0,03 нг/мл.

Gong S. и др. (2021) описали метод CRISPR-Cas12a с использованием SDA для колориметрического анализа НК различных вирусов [14]. ДНК вируса гепатита В использовалась в качестве мишени для запуска, активируя транс-расщепляющую активность CRISPR-Cas12a и производя одноцепочечную ДНК. Затем эта одноцепочечная ДНК гибридизировалась с ДНК-матрицей на модифицированных магнитных шариках. Chi и др. (2022) объединили SDA с Cas14 для обнаружения циркулирующих микроРНК — биомаркёров холангиокарциномы [15]. МикроРНК напрямую амплифицируется с помощью SDA без обратной транскрипции, что снижает риск неспецифической амплификации, позволяет различать микроРНК с похожими последовательностями и повышает чувствительность анализа до 680 фмоль.

### Сочетание HDA<sup>10</sup>-CRISPR

Реакция HDA избирательно амплифицирует целевую последовательность с помощью двух олигонуклеотидных праймеров. HDA использует фермент хеликазу для разделения нитей ДНК, а не денатурацию при нагревании, в отличие от ПЦР. Это позволяет амплифицировать ДНК без необходимости проведения термоциклирования.

Термофильная деконволюция с фермент-зависимой амплификацией (tHDA) в сочетании с CRISPR/Cas12a позволяет специфически обнаруживать фактор вирулентности *stx2 E. coli* O157:H7 количестве  $10^3$  КОЕ/г, устраняя ложноположительные эффекты димеров праймеров из-за связывания крРНК и Cas12a с мишенью [16].

### Технология RCA<sup>11</sup>-CRISPR

Амплификация по кругу (RCA) — изотермический ферментативный процесс, при котором короткий прай-

мер ДНК или РНК амплифицируется с образованием длинной одноцепочечной ДНК или РНК с использованием кольцевой матрицы ДНК. Два конца петлевого шаблона отжигаются с лигазным шаблоном и соединяются, образуя петлю, после чего праймеры и петлевой шаблон отжигаются и удлиняются с помощью ДНК-полимеразы, и в конечном итоге можно получить длинную одноцепочечную ДНК, содержащую несколько повторений последовательности шаблона, с эффективностью амплификации до  $10^9$  раз.

Технология RCA-CRISPR-разделения-HRP позволяет выявлять микроРНК с чувствительностью до фмоль и однонуклеотидной специфичностью. Амплификация с помощью разветвлённых колец (BRCA) и CRISPR-Cas12a (BRCA-Cas) позволяет обнаруживать в сыворотке крови различные циркулирующие некодирующие РНК, связанные с колоректальным раком. Abnous K. и др. (2021) объединили CRISPR-Cas12a, RCA и наночастицы золота, чтобы создать аптамерный датчик для высокочувствительного обнаружения афлотоксина [17].

### Тесты HCR<sup>12</sup> — CRISPR

Реакция цепной гибридизации (HCR) — неферментативная реакция полимеризации НК с каскадными реакциями гибридизации с несколькими термодинамически стабильными цепями ДНК-матрицы. HCR была представлена в 2004 году как разновидность изотермической и не требующей ферментов технологии АНК. Одноцепочечный инициатор ДНК запускает чередуемые процессы гибридизации между двумя шпильками, формирующими полимер с двойной спиралью. HCR с её уникальными свойствами изотермичности, отсутствия ферментов и высокой эффективности амплификации широко используется в биосенсорах и биомедицине, благодаря своим превосходным аналитическим возможностям и широкому спектру применения [18].

На основе двойной амплификации HCR и CRISPR-Cas12a разработан тест apta-HCR-CRISPR для прямого высокочувствительного обнаружения белка внеклеточных везикул, полученных из опухоли (TEV) [6]. Qiao Z. и др. (2023) был разработан метод обнаружения сальмонеллы без амплификации с помощью магнитного разделения поливалентных аптамеров с каркасом HCR и двойной функцией, связанных с активностью CRISPR/Cas12a [19]. Система обнаружения может выполнять сверхчувствительное обнаружение сальмонеллы в линейном диапазоне от 1 до  $10^7$  КОЕ/мл с пределом обнаружения 2 КОЕ/мл.

<sup>10</sup> HDA — Helicase Dependent Amplification

<sup>11</sup> RCA — Rolling Circle Amplification

<sup>12</sup> HCR — Hybridization chain reaction

Эффективность метода Cas-HCR была продемонстрирована на оптоволоконном биосенсоре затухающей волны, способном улавливать флуоресценцию, возникающую в экспоненциально затухающем вокруг оптического волокна.

### Сочетание CRISPR и других методов изотермической амплификации

В дополнение к вышеупомянутым широко используемым технологиям изотермической амплификации существует множество изотермических технологий, которые активно изучаются и совершенствуются. Ферментативная рекомбиназная амплификация (ERA) — технология, основанная на рекомбиназе, полученной из низкотемпературных бактериофагов, заменяющая аминокислоты в определённых местах. Флуоресцентная изотермическая амплификация НК в реальном времени (SAT) — сочетание изотермической АНК и флуоресцентной детекции в реальном времени. С помощью этого метода можно разработать специфические праймеры для НК патогенов, быстро амплифицировать и обнаружить *Mycoplasma pneumoniae* с высокой чувствительностью и специфичностью.

Амплификация на основе последовательности НК (NASBA<sup>13</sup>) усиливает экспрессию целевой РНК в изотермических условиях, используя одноцепочечную РНК в качестве матрицы для имитации механизма репликации ретровирусов *in vivo* с помощью обратной транскриптазы, РНКазы Н и РНК-полимеразы Т7, а также прямого и обратного праймеров. Технология NASBA применяется для диагностики криптококковой инфекции с пределом обнаружения 10 КОЕ/мл. Pardee K. и др. (2016) разработали хроматографическую платформу связывания с CRISPR/Cas9 для быстрого обнаружения и идентификации штаммов вируса Зика [20]. Это позволяет напрямую обнаруживать 2,8 фмоль РНК вируса Зика в сыворотке крови инфицированной макаки-резуса.

Новая технология изотермической АНК с помощью экзонуклеазы (Exo-NAT), разработанная Ye X. и др. (2018), была применена со сверхвысокой специфичностью и хорошими пределами обнаружения как при одноплексном, так и при мультиплексном обнаружении ротавируса [21]. Метод амплификации с помощью шпилек (HMA), разработанный Shan H. и др. (2022), сочетает в себе технологию LFD<sup>14</sup> для обнаружения специфических продуктов амплификации и ослабление сигнала неспецифической гибридизации олигонуклеотидов, что делает его более специфичным [22].

Технология изотермической реакции экспоненциальной амплификации (EXPAR) основана на взаимодействии нуклеазы и ДНК-полимеразы с функцией смещения цепи для достижения экспоненциальной амплификации мишеней в буферных системах, содержащих дезоксинуклеотидтрифосфаты, праймеры (в большинстве случаев измеряемые мишени) и матрицы для амплификации [23]. Huang M. и др. (2018) создали революционную стратегию изотермической реакции экспоненциальной амплификации на основе CRISPR/Cas9 для быстрого и специфичного для участка обнаружения НК. CRISPR/Cas9 с экспоненциальной амплификацией генерирует множество копий ДНК, которые обнаруживаются с помощью флуоресцентного мониторинга в реальном времени. Этот метод отличается специфичностью и быстрой кинетикой амплификации [24].

Программируемые функции CRISPR-Cas12a, точная идентификация мишеней и характеристики неспецифического разрезания открывают большие перспективы для создания флуоресцентных и колориметрических сенсорных платформ, особенно с учётом того, что система CRISPR-Cas12a хорошо совместима с SDA и другими технологиями усиления слабого сигнала.

На сегодняшний день изотермическая амплификация, как новая технология, имеет множество преимуществ, но также сталкивается со многими проблемами, такими как ложноположительные сигналы, генерируемые неспецифической амплификацией LAMP, и сложностью разработки праймеров. По сравнению с другими изотермическими методами, RPA ограничена концентрацией ДНК: слишком высокая концентрация подавляет реакцию, процесс амплификации легко загрязняется, а очистка продуктов RPA затруднена. Амплификация NASBA состоит из множества этапов, реакционная система более сложная, её непросто разработать, реакционную систему необходимо добавлять в раствор для ферментативной реакции, стоимость высока. Метод HDA требует от 2 до 3 температурных позиций в реакции, незамкнутая лигандная зонд-матрица и ДНК-матрица или РНК-матрица, несвязанные с лигандным зондом в процессе RCA, также могут генерировать сигналы, что может снизить чувствительность анализа. Поэтому необходимо постоянное совершенствование методик. Одной из основных проблем, с которыми сегодня сталкивается технология изотермической амплификации, является правильное и эффективное амплифицирование целевых последовательностей при соответствующих температурах,

<sup>13</sup> NASBA — Nucleic acid sequence-based amplification

<sup>14</sup> LFD - детекция методом латерального потока

а также возможность точно определять последовательности и различать сигналы без помех. Несмотря на простоту, низкую стоимость и высокую точность современных биосенсоров на основе CRISPR/Cas, синергетическое использование систем двойной амплификации сигналов на основе CRISPR/Cas для быстрой диагностики патогенов по-прежнему встречается редко.

## Биосенсоры и CRISPR

Применение биосенсоров в диагностике обеспечивает высокочувствительное, высокоспецифичное, быстрое и портативное обнаружение НК. Технологии CRISPR/Cas применяются в биосенсорных исследованиях [25]. CRISPR/Cas9 используется в сочетании с бионической платформой для обнаружения штрих-кодов на основе фотонных кристаллов [26].

Система CRISPR/Cas9 распознаёт и расщепляет ДНК. При помощи амплификации Cas9 и комплекса малых направляющих РНК, фрагмента Клёнова и амплификации со сдвигом цепи получается большое количество одноцепочечной ДНК. Штрихкод на основе фотонного кристалла, покрытый полидофамином, захватывает одноцепочечную ДНК, а HCR может запускаться с помощью FAM-меток. При дальнейшем усилении сигнала с помощью HCR одновременно выявляются несколько типов ВПЧ ВКР (вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска) с пределом обнаружения 0,025 пМоль. Исследователи объединили методы Cas12a и RPA для обнаружения ВПЧ-16 и ВПЧ-18 с помощью одноцепочечной ДНК, меченой флуорофором и гасителем флуоресценции, в качестве выходных сигналов. В перспективе при комбинации CRISPR/Cas12a и RPA возможно одновременное определение 13 типов ВПЧ ВКР с пределом обнаружения 500 копий в реакции за 35 минут [25,27].

Динамическая водная многофазная реакционная система, использующая градиент плотности концентрации сахарозы в сочетании с CRISPR/Cas12a, была использована для создания диагностической платформы обнаружения ВПЧ ВКР [28]. Эта многофазная система с уникальным динамическим диффузионным интерфейсом может объединять несовместимые, но связанные между собой реакции. С помощью субстрата высокой плотности ДНК амплифицируется с помощью реакции RPA. Увеличенные в размере продукты реакции динамически диффундируют в верхний слой с низкой плотностью, запуская неспецифическую рестрикционную активность эндонуклеазы Cas12a. Зонд одноцепочечной ДНК, меченый флуорофором или гасителем флуоресценции, расщепляется для получения флуорес-

центного сигнала. Устройство для микрофлюидики, созданное с помощью 3D-печати из черных волокон полимолочной кислоты, считывает флуоресценцию непосредственно при освещении синим светом. Этот метод позволяет осуществлять многоканальное мультидетектирование в одной системе с пределом обнаружения 10–100 копий и выявлять ДНК ВПЧ в биологических образцах без необходимости сложной предварительной обработки. Чувствительность и точность анализа соответствуют методу ПЦР.

Электрохимические биосенсоры CRISPR/Cas12a, усиленные электрическим полем, могут использоваться для обнаружения целевой ДНК в однородной жидкой фазе [29]. В качестве биосенсора применяется одноцепочечная ДНК, меченая метиленовым синим (оДНК-МС). Импульсное электрическое поле притягивает одноцепочечную ДНК к положительно заряженной поверхности рабочего электрода за счет статической электрической силы. CRISPR/Cas12a активируется для расщепления оДНК-МС, высвобождая метиленовый синий. Скорость диффузии высвободившегося метиленового синего к поверхности отрицательного электрода и уменьшение силы электростатического отталкивания на поверхности электрода приводят к увеличению сигнала. Используя разницу в скорости диффузии между электрохимическими олигонуклеотидными зондами и зондами для расщепления CRISPR на отрицательно заряженных рабочих электродах, удалось добиться простого и чувствительного электрохимического обнаружения ДНК без необходимости в сложной процедуре иммобилизации электрохимических зондов. Пиковые значения окислительно-восстановительного тока измеряют методом дифференциальной импульсной вольт-амперометрии с пределом обнаружения 1 пМоль.

Сочетание CRISPR/Cas12a с микрофлюидным двукapelьным устройством и мультиплексным анализом RPA также позволяет обнаруживать ДНК ВПЧ ВКР [27]. Эта система изготовлена из полидиметилсилоксана с использованием стандартной технологии мягкой литографии для подготовки двукapelьных устройств, с регуляцией давления для управления жидкостью. Платформа инкапсулирует специфическую ДНК-мишень и связанные с ней CRISPR/Cas12a cr-РНК в два набора капель и запускает неспецифическую расщепляющую активность Cas12a, генерируя соответствующие флуоресцентные сигналы. ВПЧ ВКР эффективно обнаруживается по интенсивности флуоресценции капель. Время реакции составляет примерно 30 минут, а предел обнаружения —  $10^{-18}$  М/мл. Оптимизировав LFA, микрофлюидику и CRISPR/Cas12a, можно

добиться визуализации ДНК ВПЧ ВКР непосредственно в образце.

### Технологии CRISPR/Cas и применение генной терапии

Генная терапия была признана «медициной XXI века». Для создания многообещающих препаратов генной терапии были применены передовые биотехнологии. С 1998 года в мире более двадцати препаратов на основе технологии CRISPR/Cas были одобрены для клинического применения. Действие большинства этих средств сосредоточено на генной аугментационной терапии, то есть на доставке определённого гена в ткань-мишень и производстве генных продуктов обеспечивающих необходимый терапевтический эффект.

В настоящее время активно разрабатывается ещё один перспективный метод — редактирование генома, при котором мутация исправляется на месте для создания копии дикого типа в ткани-мишени. Этот подход включает нуклеазы цинкового пальца, эффекторные нуклеазы подобные активаторам транскрипции и кластеризованные короткие палиндромные повторы с регулярным интервалом CRISPR/Cas. CRISPR/Cas нуклеазы могут разрушать, вставлять или удалять сегменты ДНК посредством негомологичного соединения концов или вносить точные изменения посредством репарации, направленной на гомологию в клетках. Эта система широко используется в областях регуляции генов, эпигенетической инженерии и визуализации. Поскольку большинство генетических заболеваний возникает из-за точечных мутаций, вышеупомянутые подходы к коррекции точечных мутаций пока неэффективны и обычно приводят к случайным вставкам и удалениям (инсерции+делеции =инделам) в целевом локусе в ответ на разрывы двуспиральной ДНК. Это не позволяет на сегодняшний день применять данный подход в терапии.

Продвинутые подходы CRISPR, такие как редактирование оснований и праймированное редактирование, используют модифицированные ферменты Cas, которые могут вызывать точные однонуклеотидные изменения в геноме, не создавая двуспиральных разрывов ДНК [30]. CRISPR также можно использовать для активации генов (CRISPRa) или их инактивации (CRISPRi), направляя модифицированные комплексы sgRNA/Cas на промоторную область гена, привлекая факторы транскрипции для повышения экспрессии гена или репрессоры для снижения экспрессии гена, что является перспективным направлением в персонализированной терапии онкогематологических и солидных онкологических заболеваний [9,31,32].

Редактирование на основе CRISPR/Cas9 начинается с разрывов ДНК (или других повреждений) преимущественно в целевых участках и, к сожалению, в нецелевых участках генома. Системы репарации ДНК, различающиеся по точности, участвуют в создании желаемых генетических изменений, но также вносят нежелательные мутации, которые могут привести к наследственным, онкологическим и другим заболеваниям. Новые подходы к снижению рисков, связанных с редактированием генома, включают ослабление нецелевой активности комплекса редактирования за счёт использования модифицированных форм нуклеазы Cas9 и одноцепочечной направляющей РНК (нРНК), совершенствование методов доставки комплекса нРНК/Cas9 и направление повреждений ДНК, вызванных нРНК/Cas9, на немутагенные пути восстановления.

Хотя технология CRISPR/Cas продемонстрировала огромный потенциал в качестве инструмента для редактирования генома, её применение в клинической практике всё ещё находится на ранней стадии. По состоянию на январь 2024 года в настоящее время проводится всего 89 клинических испытаний с использованием CRISPR, что говорит о том, что предстоит ещё много работы, прежде чем эта технология станет одобренным методом генной терапии [33]. Примечательно, что при использовании CRISPR могут возникать непреднамеренные изменения в ДНК, и долгосрочные последствия этих изменений для здоровья пациентов остаются неопределёнными.

В США в 2020 году FDA выпустило руководство по разработке генной терапии редких заболеваний с рекомендациями по разработке и проведению клинических испытаний генной терапии редких наследственных заболеваний. В Китае проводились исследования с CRISPR/Cas9 редактированием генома с эмбрионами человека с  $\beta$ -талассемией. Однако во всех клетках редактируемых эмбрионов возникло большое количество незапланированных мутаций. В связи с этим, появились этические вопросы, не имеющие единого решения о порядке применения редактирования генома. В Китае запрещено использование преимплантационной генетической диагностики для выбора пола будущего ребенка, Великобритания официально разрешила геномное редактирование эмбрионов человека. В России запрещено работать с человеческими эмбрионами старше 14 дней.

### Заключение

Благодаря прогрессу в различных дисциплинах, таких как биоинформатика, структурная биология и высокопроизводительное секвенирование, открытия и разработка различных инновационных систем

быстро расширяется набор инструментов CRISPR/Cas. Технологии CRISPR/Cas превратились в новаторские инструменты редактирования генов с использованием нуклеиновых кислот, которые в конечном итоге выделяются среди нескольких сконструированных нуклеаз благодаря их высокой эффективности, нацеливанию на конкретную последовательность, простоте программирования и универсальности. Это создает прорыв в исследованиях не только редактирования генома, но и различных других манипуляций с использованием нуклеиновых кислот, таких как контроль транскрипции и геномная визуализация. Адаптация разнообразных стратегий CRISPR в различных условиях позволила реализовать множество ранее не существовавших возможностей, начиная от внедрения сложных решений в фундаментальных исследованиях и заканчивая эффективными диагностическими и терапевтическими подходами.

## Список литературы

1. Волков А.А., Долгова А.С., Дедков В.Г. Молекулярные диагностические платформы, созданные на базе систем CRISPR/Cas // *Инфекция и иммунитет*. – 2022. – № 1. – С. 9–20.
2. Колбин А.С., Гомон Ю.М. Перспективы применения системы CRISPR/Cas9 с позиции клинической фармакологии // *Клин фармакол тер.* – 2024. – №2. – С.7–15.
3. Птицина С.Н. Применение методов редактирования генома и генной терапии в лечении заболеваний человека // *Русский медицинский журнал*. – 2021. – № 10. – С. 57–62.
4. Шарипов Р.А., Омаров М.А., Мулюков А.Р. и др. Возможности применения системы CRISPR-Cas9 для коррекции генетических мутаций // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2023. – № 3. – С.3–8.
5. Yang H., Patel D. Structures, mechanisms and applications of RNA-centric CRISPR-Cas13 // *Nat Chem Biol*. – 2024. – Vol. 20. – P.673–688.
6. Zeng D., Jiao J., Mo T. Combination of nucleic acid amplification and CRISPR/Cas technology in pathogen detection // *Front Microbiol*. 2024; 15:1355234. doi: 10.3389/fmicb.2024.1355 234
7. Makarova K., Wolf Y., Koonin E. The basic building blocks and evolution of CRISPR-Cas systems // *Biochem Soc Trans*. – 2013. – Vol. 41. – P.1392–1400.
8. Карпищенко А.И., Антонов В.Г., Бутенко А.Б. и др. / *Медицинские лабораторные технологии: в 2-х томах. т. 2. Медицинские лабораторные технологии и диагностика*. – Санкт-Петербург: Интермедика, 1999 – 654 с.
9. Скворцов С.В., Казаков С.П. Полимеразная цепная реакция в клинико-диагностической практике многопрофильных лечебных учреждений / Под общей редакцией заместителя главного специалиста по лабораторному делу МО РФ полковника медицинской службы Л.С. Суслова. – Москва: Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко, 2000. – 50 с.
10. Yang H., Yang S., Xia X. et al. Sensitive detection of a single-nucleotide polymorphism in foodborne pathogens using CRISPR/Cas12a-Signaling ARMS-PCR // *J. Agric. Food Chem*. – 2022. – Vol. 70. – P. 8451–8457.
11. Zhang A., Sun B., Zhang J. et al. Crispr/Cas12a coupled with recombinase polymerase amplification for sensitive and specific detection of *Ap-helenchoides besseyi* // *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2022; 10:912959. doi: 10.3389/fbioe.2022.912959
12. Tian Y., Liu T., Liu C. et al. An ultrasensitive and contamination-free on-site nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the Crispr-Cas12a system combined with recombinase polymerase amplification // *LWT*. 2021; 152:112166. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112166
13. Wang W., Liu J., Wu L. et al. Nicking enzyme-free strand displacement amplification-assisted Crispr-Cas-based colorimetric detection of prostate-specific antigen in serum samples // *Anal. Chim. Acta*. 2022;1195:339479. doi: 10.1016/j.aca.2022.339479
14. Gong S., Zhang S., Wang X. et al. Strand displacement amplification assisted Crispr-Cas12a strategy for colorimetric analysis of viral nucleic acid // *Anal. Chem*. – 2021. – Vol. 93. – P.15216–15223.
15. Chi Z., Wu Y., Chen L. et al. Crispr-Cas14a-integrated strand displacement amplification for rapid and isothermal detection of cholangiocarcinoma associated circulating micrnas // *Anal. Chim. Acta*. 2022; 1205:339763. doi: 10.1016/j.aca.2022.339763.
16. Kim U., Lee S., Oh S. Thermophilic helicase-dependent amplification-based Crispr/Cas12a system: detection of *stx2* in *Escherichia coli* O157:H7 by controlling primer dimmers // *Anal. Chim. Acta*. 2023; 1239:340679. doi: 10.1016/j.aca.2022.340679
17. Abnous K., Danesh N., Ramezani M. et al. A novel colorimetric aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin M (1) based on the combi-

- nation of Crispr-Cas12a, rolling circle amplification and catalytic activity of gold nanoparticles // *Anal. Chim. Acta.* 2021; 1165:338549. doi: 10.1016/j.aca.2021.338549
18. Zhou W., Hu L., Ying L. et al. A Crispr-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection // *Nat. Commun.* 2018; 9:5012. doi: 10.1038/s41467-018-07324-
19. Qiao Z., Xue L., Sun M. et al. Highly sensitive detection of Salmonella based on dual-functional HCR-mediated multivalent aptamer and amplification-free Crispr/Cas12a system // *Anal. Chim. Acta.* 2023; 1284:341998. doi: 10.1016/j.aca.2023.341998
20. Pardee K., Green A., Takahashi M. et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components // *Cell.* - 2016. - Vol. 165. - P. 1255-1266.
21. Ye X., Li Y., Wang L. et al. A novel exonuclease-assisted isothermal nucleic acid amplification with ultrahigh specificity mediated by full-length BstDna polymerase // *Chem. Commun. (Camb.)* - 2018. - Vol. 54. - P. 10562-10565.
22. Shan H., Wang Y., Wu T. et al. Development of asymmetric hairpins-mediated nucleic acid isothermal amplification-based lateral flow detection of Mycobacterium tuberculosis // *Sensors Actuators B Chem.* 2022; 350:130836. doi: 10.1016/j.snb.2021.130836
23. Reid M., Le X., Zhang H. Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: an Expar example // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2018. - Vol. 57. - P. 11856-11866.
24. Huang M., Zhou X., Wang H., Xing D. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection // *Anal. Chem.* - 2018. - Vol. 90. - P. 2193-2200.
25. Ma C., Zou M., Xu N., et al. Portable and ultrasensitive HR-HPV tests based on nucleic acid biosensors // *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14:1357090. doi: 10.3389/fcimb.2024.1357090
26. Zhang D., Cai L., Wei X. et al. Multi-plexed CRISPR/Cas9 quantifications based on bio-inspired photonic barcodes // *Nano Today.* 2021; 40, 101268. doi: 10.1016/j.nantod.2021.101268
27. Zhao Y., Chen D., Xu Z. et al. Integrating CRISPR-Cas12a into a microfluidic dual-droplet device enables simultaneous detection of HPV16 and HPV18 // *Anal. Chem.* - 2023. - Vol. 95. - P. 3476-3485.
28. Yin K., Ding X., Li Z. et al. Dynamic aqueous multiphase reaction system for one-pot CRISPR-Cas12a-based ultrasensitive and quantitative molecular diagnosis // *Anal. Chem.* - 2020. - Vol. 92. - P. 8561-8568.
29. Li Z., Ding X., Yin K. et al. Electric field-enhanced electrochemical CRISPR biosensor for DNA detection // *Biosens Bioelectron.* 2021; 192, 113498. doi: 10.1016/j.bios.2021.113498
30. Mani I. CRISPR-Cas9 for treating hereditary diseases // *Prog Mol Biol Transl Sci.* - 2021. - Vol. 181. - P.165-183.
31. Тарасов А.В., Казаков С.П., Масенко В.П., Гринев Е.А. CAR-иммуноterapia - прорыв в клеточной биологии и медицине // *Лабораторная медицина.* - 2024. - Т. 15, № 1-2 - С. 5-12.
32. Becirovic E. Maybe you can turn me on: CRISPRa-based strategies for therapeutic applications // *Cell Mol Life Sci.* 2022; 79(2):130. doi: 10.1007/s00018-022-04175-8
33. WH Organization. 2023. <https://trialsearch.who.int/Default.aspx>