

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Д. В. Ребриков^{1,2,3} ✉

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва

³ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Быстро развивающиеся технологии редактирования генома из научно-исследовательских лабораторий уверенно переходят в клиническую практику. Разработаны принципиально новые методы изменения генома человеческих эмбрионов на ранних стадиях развития. Создан инструментарий для исправления генетических нарушений у людей в любом возрасте. Врач, по сути, становится корректором генетической инструкции по построению и функционированию организма человека. В обзоре обобщены сведения о современном состоянии технологий редактирования генома и существующих подходах к их использованию в клинической практике.

Ключевые слова: редактирование генома, генотерапия, наследственные заболевания, онкология, ВИЧ

✉ **Для корреспонденции:** Денис Владимирович Ребриков
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; drebrikov@gmail.com

Статья получена: 23.06.2016 **Статья принята в печать:** 25.06.2016

HUMAN GENOME EDITING

Rebrikov DV^{1,2,3} ✉

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Kulakov Federal Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The rapidly evolving genome editing techniques are steadily moving from research laboratories to clinical practice. Fundamentally new methods of editing the genome of human embryos in the early stages of development have been developed. Tools for correction of genetic disorders in people of any age have also been created. In fact, the doctor is becoming a corrector of genetic instructions on construction and functioning of the human body. This review generalizes the data on the current state of genome editing techniques and existing approaches to applying them in clinical practice.

Keywords: genome editing, gene therapy, hereditary diseases, oncology, HIV

Correspondence should be addressed: Denis Rebrikov
ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; drebrikov@gmail.com

Received: 23.06.2016 **Accepted:** 25.06.2016

Изменение геномов живых организмов происходит постоянно, определяя ход их эволюции. Человек стал вмешиваться в этот процесс тысячи лет назад, отбирая успешно культивируемые растения и выводя породы домашних животных. Генная инженерия, возникшая немногим более полувека назад, позволила создавать трансгенные организмы: переносить гены между геномами или манипулировать ими внутри одного генома. Идея использования привносимой извне ДНК для лечения наследственных заболеваний человека возникла в начале 1970-х гг. [1]. В 1980-х гг. благодаря усовершенствованию методов работы с генами и созданию эукариотических векторов появилась реальная возможность коррекции генетического материала человека в терапевтических целях, однако сообщение о первом успешном результате было опубликовано лишь в 1990 г. [2]. В том же году исследователи использовали ретровирус для доставки работающего гена аденозиндеаминазы в клетки четырёхлетней и девятилетней пациенток с тяжёлым комбинированным иммунодефицитом. А уже с 1993 г. исследователи стали на регулярной основе применять генную терапию новорожденных с дефицитом аденозиндеаминазы (путем введения гена ADA в недифференцированные клетки пуповинной крови).

Мы живем в эру геномики, и все чаще в литературе можно встретить термин «геномная терапия». Пожалуй, следует уточнить использование терминов «генная терапия» (генотерапия) и «геномная терапия». Поскольку терминологические вопросы не являются принципиальными, можно либо считать эти термины равнозначными, либо принять «геномную терапию» в качестве варианта «генной терапии», при котором изменяется именно ядерный геном (хромосомная ДНК). Дело в том, что генная терапия может и не затрагивать хромосому: доставленный ген может работать как экстрахромосомный элемент (плазмиды) или быть доставлен в виде матричной РНК (мРНК), кроме того, может быть модифицирована митохондриальная ДНК.

С 1989 по 2016 г. в мире было выполнено более 2300 клинических исследований генотерапевтических препаратов [3]. К настоящему моменту существуют более или менее эффективные подходы к генной терапии свыше 50 генетически детерминированных заболеваний человека: первичных комбинированных иммунодефицитов [4], гемофилии [5, 6], гемоглобинопатий [7–13], кистозного фиброза [14, 15], ахроматопсии [16], амавроза Лебера [17–19], эпилепсии [20], остеоартрита [21, 22], болезни Паркинсона [23–25], онкологических заболеваний [26–32].

В последние несколько лет с появлением качественно новых технологий направленного изменения генома (ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9) число заявок на начало клинических исследований генотерапевтических препаратов растет лавинообразно. Благодаря простоте и точности новых методов внесения изменений в геномную ДНК эукариотических клеток даже возник новый термин — редактирование генома (ведь в будущем мы, возможно, будем использовать изменение ДНК не только в терапевтических целях, но и для более праздных задач).

В качестве основных направлений применения геномной терапии можно выделить следующие: лечение наследственных (как правило, моногенных) заболеваний, лечение заболеваний, вызванных соматическими мутациями (в основном онкологических), и попытки лечения ВИЧ-инфекции путем уничтожения встроившихся в геном копий вируса или генов рецепторов, позволяющих вирусу проникнуть в клетку. Геномная терапия — это один из вариантов персонализированной медицины, когда используемый подход индивидуально подбирается к заболеванию (а иногда даже и к геному) пациента.

Федеральный закон Российской Федерации от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» определяет генотерапию как совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний. С появлением Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» можно прогнозировать рост клинических исследований принципиально новых генотерапевтических препаратов в России.

Технологии редактирования генома

Несмотря на существование множества методик направленного изменения сложных эукариотических геномов, в настоящее время на практике используют лишь несколько технологий:

а) не индуцированную разрывом гомологичную рекомбинацию [33];

б) сайт-специфичную рекомбинацию (рекомбиназы и транспозазы) [34, 35];

в) индуцированную сайт-специфичной нуклеазой репарацию, где в качестве нуклеазы используют:

- искусственные (гибридные, «дизайнерские») нуклеазы с доменами «цинковых пальцев» (zinc finger nucleases, ZFNs) [36–38],

- природные или гибридные эндонуклеазы геной конверсии или мегануклеазы (homing endonucleases, HEs) [39],

- искусственные (гибридные, «дизайнерские») нуклеазы с доменами аналогов активаторов транскрипции (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) [40],

- природные РНК-направляемые нуклеазы (RNA-guided nucleases, RGNs), в частности, CRISPR-ассоциированные нуклеазы (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9) с «дизайнерской» наводящей РНК [41],

- сочетания перечисленных подходов [42–44].

На рис. 1 представлена шкала времени с указанием последовательности разработки некоторых технологий редактирования геномов [45].

На сегодняшний день наиболее перспективными являются подходы, основанные на использовании искусственных (гибридных, или «дизайнерских») сайт-специфичных нуклеаз: ZFNs, TALENs и CRISPR/Cas9 [46]. Хотя изначально термин «гибридные» («дизайнерские») нуклеазы применялся к полностью «белковым» технологиям ZFN и TALEN, сегодня к этому же классу можно с уверенностью отнести и технологию CRISPR/Cas9, поскольку РНК-компонент в этой системе является «дизайнерским» (аналогично наводящим блокам доменов ZF или TALE) (рис. 2) [47].

В общем случае каждый из перечисленных инструментов редактирования генома включает три компонента: специфичный к последовательности ДНК «наводчик» (указывающий, где резать), разрезающие ДНК «ножницы» (эндонуклеазу) и собственно привносимую последовательность ДНК (нужна не всегда). Доставка в клетки

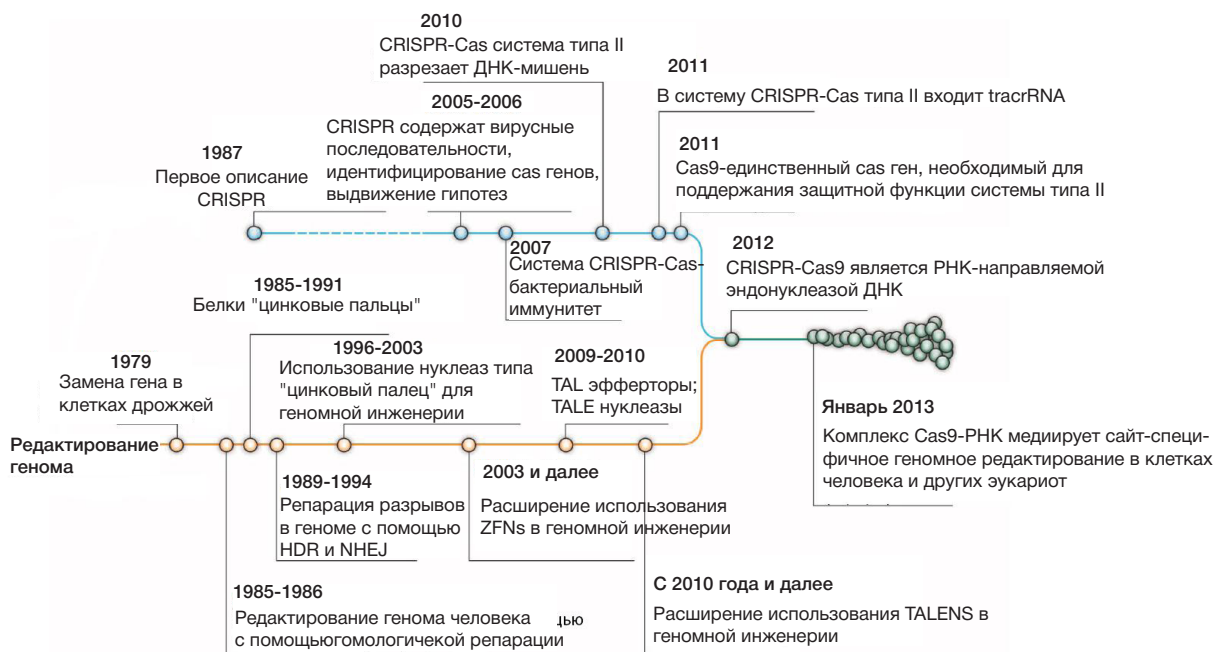


Рис. 1. Шкала времени с указанием последовательности разработки некоторых из систем редактирования геномов (Doudna, Charpentier, 2014 [45], в переводе Станислава Груздева, medach.pro)

«генетической заплатки» (фрагмента ДНК под замену) требуется в тех случаях, когда необходимо добавить или заменить фрагмент генома. Однако в ряде случаев достаточно просто удалить часть последовательности. В табл. 1 указаны особенности наиболее популярных систем редактирования генома.

С помощью «наводчика» мы указываем эндонуклеазе, где необходимо внести надрез в молекулу ДНК. Сшивание же надреза происходит, как правило, за счет внутриклеточных систем репарации (в частности, репарации двуцепочечных разрывов или гомологичной рекомбинации).

Поскольку методы изменения генома, основанные на гомологичной рекомбинации, рекомбиназах и транспозазах, активно используют в клинической практике уже более 30 лет и они широко описаны в литературе (за методы с гомологичной рекомбинацией в 2007 г. даже была вручена Нобелевская премия), в данном обзоре мы позволим себе не приводить их детали. Рассмотрим чуть подробнее сравнительно новые подходы, основанные на гибридных нуклеазах и мегануклеазах и репарации наведенных двуцепочечных разрывов.

Наводка нуклеазы «цинковыми пальцами» (ZFNs)

Примерно в середине 1980-х гг. (впервые в составе транскрипционного фактора TFIIIA *Xenopus laevis*) были идентифицированы небольшие домены, стабилизированные одним или несколькими ионами цинка и получившие название «цинковые пальцы». Эти домены способны эффективно и довольно специфично к последовательности связывать ДНК, РНК, белки и липиды [48]. Оказалось, что один «цинковый палец» специфично связывает триплет нуклеотидов. Если 3–6 «цинковых пальцев» с известной специфичностью соединить в один белок, можно добиться достаточно точного узнавания последовательности ДНК в 9–18 пар нуклеотидов. Если при этом к «цинковым пальцам» добавить какую-нибудь эндонуклеазу (чаще всего используют неспецифичный к последовательности и вносящий одноцепочечный разрыв каталитический домен нуклеазы FokI из *Flavobacterium okeanokoites*), получится наводимая на цель (на конкретный сайт в ДНК) эндонуклеаза. Для получения двуцепочечного разрыва необходимо создать два таких фермента, узнающих близлежащие регионы на противоположных цепях ДНК (рис. 2).

С начала 2000-х гг. и до настоящего времени системы на основе «цинковых пальцев» успешно использовали в широком спектре практических модификаций геномов как на растительных и животных моделях, так и в терапевтических подходах (табл. 2). Преимущество метода — универсальность способа наведения нуклеазы. К его недостаткам относятся довольно высокая сложность генно-инженерной сборки гена фермента; необходимость создать

два фермента для каждой из цепей ДНК; токсичность, связанная с недостаточной специфичностью систем данного типа [49]; риск иммуногенности чужеродного белка [50]. В этой связи применение систем на основе «цинковых пальцев» постепенно вытесняется новыми подходами.

Гибридные мегануклеазы

В 2003 г. Epinat и соавт. предложили метод геномного редактирования, основанный на так называемых мегануклеазах [39] (рис. 2). Мегануклеазы найдены у архей, бактерий, фагов, дрожжей, водорослей и некоторых растений и представляют собой эндодезоксирибонуклеазы — небольшие белки, зеркальные мономеры или гомодимеры, характеризующиеся очень длинным сайтом распознавания последовательности двуцепочечной ДНК: примерно от 10 до 40 пар нуклеотидов. Обычно сайт такой длины встречается лишь раз на геном (или даже ни разу). Например, последовательность сайта узнавания мегануклеазы I-SCEI длиной 18 п. н. теоретически встретится один раз в геноме, превышающем по длине геном человека в 20 раз. Как правило, они находятся в составе интронов или мобильных элементов генома. Биологическая функция мегануклеаз неясна.

Наибольшее распространение как инструмент геномного редактирования получили представители семейства мегануклеаз LAGLIDADG, обнаруженных в митохондриях и хлоропластах одноклеточных эукариот. Достоинства метода — довольно высокая сайт-специфичность и самопроизвольная сборка димера. Недостаток — крайняя ограниченность выбора сайта воздействия.

Технология TALEN (нуклеазы, подобные аналогу активатора транскрипции)

История разработки системы TALEN связана с исследованием бактерий рода *Xanthomonas*. Причиной многолетнего изучения этой группы бактерий стало их патогенное воздействие на культурные растения: томаты, перец, рис и ряд других. Было установлено, что *Xanthomonas* секретируют в цитоплазму растительных клеток регуляторные белки (transcription activator-like effectors, TALE), увеличивающие восприимчивость клетки к патогену. При дальнейшем изучении механизмов действия данных белков было обнаружено, что они способны связываться с ДНК и активировать экспрессию некоторых генов, имитируя факторы транскрипции клетки-хозяина [51, 52].

Оказалось, что узнавание TALE определенного сайта в ДНК идет за счет серии небольших доменов, каждый из которых узнает один-единственный нуклеотид в последовательности сайта. Исследователи довольно быстро разобрались со специфичностью доменов к конкретным

Таблица 1. Состав компонентов основного фермента систем редактирования генома и некоторые особенности систем

Технология	Ограничения по последовательности	«Наводчик»	«Ножницы»	Двуцепочечный разрыв обеспечивает:
ZFNs	Практически нет	3–6 белковых домена типа «цинковый палец»	Неспецифичная к последовательности эндонуклеаза (например FokI)	искусственный гетеродимер
HEs	Ограниченный набор сайтов	Мегануклеаза	Мегануклеаза	естественный зеркальный мономер или гомодимер
TALENs	Практически нет	12–20 белковых доменов от «активаторов транскрипции»	Неспецифичная к последовательности эндонуклеаза (например FokI)	искусственный гетеродимер
RGNs (CRISPR/Cas9)	Нет	РНК длиной около 40 нуклеотидов	Нуклеаза Cas9	естественный мономер

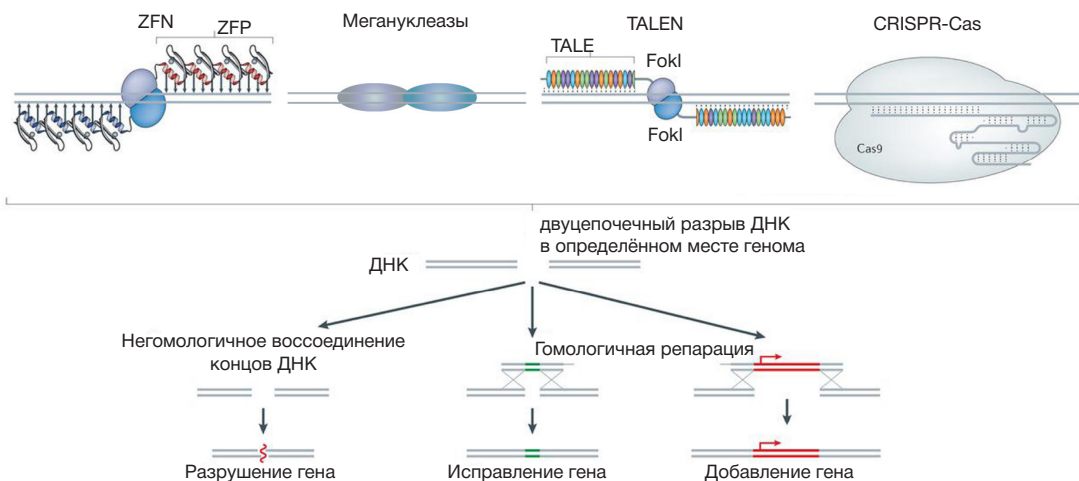


Рис. 2. Схема геномного редактирования на основе гибридных нуклеаз с «цинковыми пальцами», мегануклеаз, гибридных нуклеаз с TALE и CRISPR/Cas9 (Yip и соавт., 2014 [47], с дополнениями)

нуклеотидам, что позволило собирать из них «пачки», точно распознающие определенную последовательность оснований в ДНК.

Таким образом, принцип использования системы TALEN аналогичен описанной выше системе с использованием триплет-специфичных доменов «цинковых пальцев» с той лишь разницей, что в качестве «наводчика» используют нуклеотид-специфичные домены «аналогов активаторов транскрипции», соединенные в серии по 12–20 штук. В качестве нуклеазы используют тот же каталитический домен FokI. Для получения двуцепочечного разрыва необходимо создать два таких фермента, целевые сайты посадки TALE-«наводчиков» которых должны находиться на противоположных цепях ДНК и быть разделены участком около 20 п. н. (рис. 2). Достоинствами метода являются универсальность способа наведения нуклеазы и универсальность технологии сборки «дизайнерской» нуклеазы, а недостатками — высокая сложность генно-инженерной сборки гена фермента и необходимость создавать два фермента для каждой из цепей ДНК.

Существуют и попытки «скрещивания» отдельных элементов разных технологий. Так, описаны гибриды TALE-«наводчика» и мегануклеазы (megaTALs) [42]. К мегануклеазам пытаются прикреплять ферменты, тем или иным способом обрабатывающие (например разрушающие) концы двуцепочечного разрыва, с целью усиления мутагенного эффекта этого разрыва и т. п. [43, 44].

В 2012 г. журнал Nature Methods назвал методы высокоточного редактирования геномов (среди которых была и система TALEN) методическим открытием года.

Технология CRISPR/Cas9 (нуклеаза, ассоциированная с короткими регулярно расположенными палиндромными повторами)

Принципиально иной с точки зрения механизма наведения нуклеазы на цель является предложенная спустя всего несколько лет после TALEN система CRISPR/Cas9. Она отличается от описанных выше тем, что в качестве «наводчика» в ней используют не белковые домены, а молекулу РНК (single guide RNA, sgRNA) длиной около 40 нуклеотидов, состоящую из двух частей: собственно наводящей crRNA и адаптерной (транс-активационной) tracrRNA. Еще в конце 1980-х гг. в геноме бактерий и архей были обнаружены ре-

гионы CRISPR. Оказалось, что это своеобразный элемент «иммунной системы» бактерии, защищающий ее от чужеродных ДНК (например от проникновения бактериофагов) путем считывания повторов с комплементарных ДНК фага молекул РНК, которые в ассоциации со специальной нуклеазой разрушают геном фага. Причем бактерии умеют «запоминать» в своем геноме последовательности ДНК заражавших их вирусов с тем, чтобы в дальнейшем использовать их для считывания «наводящих» РНК [53].

Оказалось также, что последовательность этих «наводящих» РНК можно менять, делая их комплементарными любому участку ДНК без потери нуклеазной активности фермента Cas9 (рис. 2). Более того, можно использовать саму РНК как донор «генетической заплатки», если встроить в нее соответствующую последовательность [54].

На данный момент система CRISPR/Cas9 выглядит наиболее перспективным инструментом редактирования генома, поскольку она универсальна, довольно проста в исполнении и обладает высокой сайт-специфичностью.

У метода сразу несколько важных достоинств: универсальность способа наведения нуклеазы; отсутствие потребности в генно-инженерной сборке фермента — меняется только наводящая РНК; способность нуклеазы Cas9 резать обе цепи ДНК; возможность встроить «генетическую заплатку» в наводящую РНК. Недостаток метода — потенциальная иммуногенность чужеродного белка.

Алгоритмы проведения геномной терапии

Терапевтические направления использования систем редактирования генома можно разделить на три группы: 1) изменение генома гамет/зиготы/бластомеров с целью получения целого организма из одной измененной клетки (фетальная генотерапия); 2) изменение генома отобранных из организма отдельных соматических клеток с целью последующего возврата в организм измененных клеток (клеточная соматическая генотерапия); 3) изменение генома отдельных групп (или всех) соматических клеток непосредственно в многоклеточном организме (тканевая соматическая генотерапия).

Если первые два подхода предполагают манипуляции с культурами клеток в лабораторных условиях (для чего на данный момент выработана широчайшая технологическая база), то для третьего направления необходимо

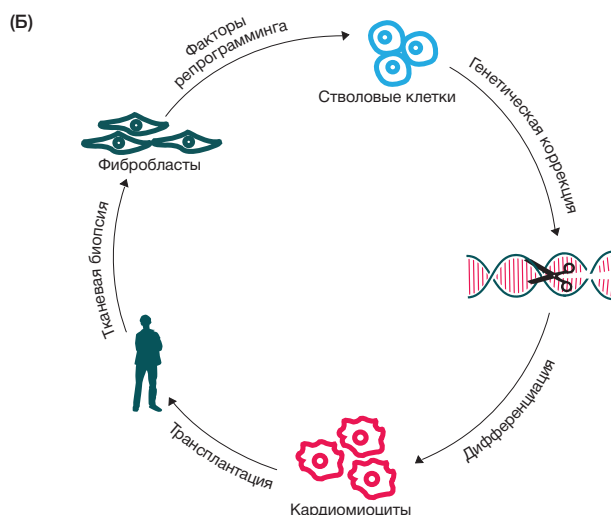
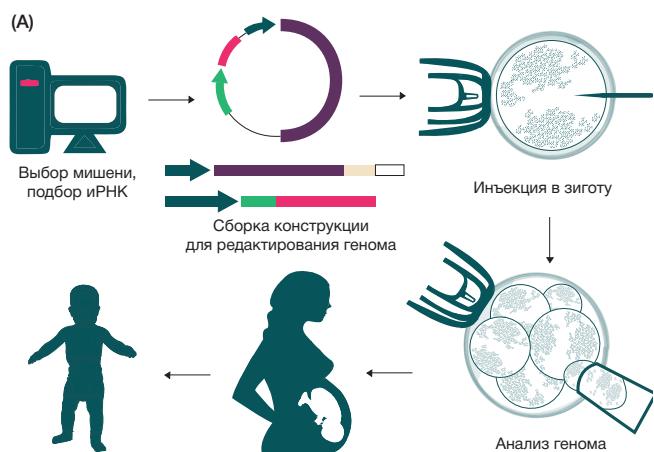


Рис. 3. Алгоритмы фетальной (А) и клеточной соматической генотерапии (Б)

использовать специальные системы (желательно тканеспецифичной) доставки генно-инженерных конструкций в клетки организма.

Генно-инженерные конструкции

Как правило, гибридные нуклеазы и «генетические заплатки» (генетический материал под замену) доставляют в клетку в виде генно-инженерных конструкций, с которых уже внутри клетки нарабатываются соответствующие РНК и белки. Описаны варианты прямого введения в клетку матричной РНК, в частности, для системы CRISPR/Cas9 [55].

Типичная генетическая конструкция для системы сайт-специфичной дизайнерской нуклеазы содержит сигнал ядерной локализации, искусственный блок «наведения» («цинковые пальцы», TALE или наводящую РНК), каталитический домен нуклеазы (например FokI) и, если требуется, фрагмент под замену.

Системы доставки генотерапевтических препаратов в клетки

С целью доставки «терапевтических» генов или генетических конструкций разработаны разнообразные вирусные и невирусные системы, распознающие большое число потенциальных тканей-мишеней (кожа, мышцы, легкие, мозг, толстая кишка, селезенка, печень, клетки крови и т. д.). Система доставки должна обеспечивать высокую эффективность поглощения генетической конструкции клетками-мишенями, устойчивость к внутриклеточному разрушению при транспорте в ядро и поддержание необходимого уровня экспрессии.

Невирусные системы включают прямое введение ДНК-конструкций в клетки и ткани (например электропорацию), липосомы, катионные полимеры и др. Среди вирусных систем наиболее распространены системы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и вируса простого герпеса. Адресная доставка определяется наличием на поверхности вирусных частиц или на мембране липосом специальных молекул, узнаваемых рецепторами клеток-мишеней. Такими молекулами могут быть белки вирусного капсида, антитела к поверхностным клеточным антигенам (встраивают в мембрану липосом), молекулы фолиевой кислоты

(усиленно захватываемые опухолевыми клетками) и др.

Для доставки векторов с гибридными нуклеазами также пытаются применять вирусные и невирусные способы доставки [47, 56].

Геномная терапия наследственных заболеваний

Как уже было сказано выше, терапевтические подходы, основанные на добавлении генетического материала в клетку при помощи вирусных векторов, используют с начала 1990-х гг. Эти методы позволяют восстановить наработку белка, ген которого нефункционален в обеих копиях на хромосоме. Однако изменение или удаление участков ДНК долгое время оставалось крайне сложным и невозможным производимым подходом. С появлением «дизайнерских» нуклеаз стали бурно развиваться методы направленного изменения участков ДНК непосредственно в структуре хромосомы. На сегодняшний день предложены варианты лечения пигментного ретинита, глаукомы, гемоглобинопатий, мышечных дистрофий (табл. 2).

Наиболее активно развивается фетальное направление. В 2015–2016 гг. о своих планах по модификации геномов человеческих эмбрионов при помощи технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 заявило множество лабораторий в США, Китае, Великобритании и ряде других стран, а также несколько биотехнологических компаний: Ovascience (США), Editas Medicine (США) и др. Если у данной пары индивидов из «естественных» вариантов эмбрионов не может быть отобран потенциально здоровый генотип, возможно использование методов редактирования генома с целью добавления/исправления патогенного аллеля на стадии зиготы.

В апреле 2015 г. вышла работа Liang и соавт., в которой при помощи системы CRISPR/Cas9 на уровне зиготы производили «починку» мутантного гена бета-глобина. Из 86 взятых в эксперимент зигот починка произошла в 4-х случаях [7].

Геномная терапия соматических мутаций

«Через 20 лет химиотерапия уйдет в прошлое, — уверен глава Wellcome Trust Sanger Institute, профессор Джереми Фаррер. — Мы будем оглядываться на сегодняшние методы лечения рака и ужасаться им. Равно как сегодня

ужасаемся примерам лечения электричеством в начале прошлого века. Генетика — главное подспорье медицины в будущем. Редкие врожденные пороки, рак и даже инфекции мы будем лечить, используя геномную терапию» [57].

«Дизайнерские» нуклеазы позволяют эффективно и точно воздействовать на ДНК с целью исправления возникших мутаций, что открывает широкие возможности их использования в исправлении нарушений, повлекших опухолеобразование [29, 30]. Предложены варианты использования системы CRISPR/Cas9 для лечения саркомы, рака легких [31, 32]. В частности, для рака легких предложен вариант исправления или удаления мутантного варианта гена EGFR при помощи доставляемой вирусом системы CRISPR/Cas9 [32].

Антивирусная терапия

Геномная терапия ВИЧ

Еще одним направлением терапевтического применения гибридных нуклеаз является борьба с ВИЧ-инфекцией. Сегодня существует два направления борьбы: удаление копий ВИЧ из генома ВИЧ-носителя и изменение генов рецепторов, через которые вирус проникает в Т-лимфоциты (в частности, гена CCR5) (табл. 2). Уничтожая копии провирусной ДНК в геноме, теоретически можно полностью обезвредить вирус и исключить возможность его реактивации в клетках пациента. Другой подход — нарушение гена рецептора — не позволяет вирусу заражать лимфоциты, и популяция Т-клеток пациента восстанавливается.

Одна из проблем в разработке противовирусных препаратов на основе геномного редактирования заключается в способности вируса чрезвычайно быстро менять последовательность и тем самым уходить от «наводчика», специфичного к определенной последовательности сайта атаки. Однако при правильном законодательном регулировании выпуска модификаций генотерапевтических препаратов мы легко можем обгонять ВИЧ в выпуске очередных версий «антивируса».

Борьба с не встраивающимися вирусами

Системы редактирования генома пытаются применять и для борьбы с вирусами, не интегрирующими свой генетический материал в клеточный геном. Принцип их уничтожения тот же, что и в случае с ВИЧ, но гибридная нуклеаза атакует свободный вирусный геном. Так, описано применение системы CRISPR/Cas9 для борьбы с вирусом гепатита В [58].

Нетерапевтические задачи геномного редактирования

Генетический допинг

Генетический допинг представляет собой вариант нетерапевтического применения редактирования генома с целью улучшения результатов в спорте высоких достижений. Не секрет, что максимальные спортивные результаты во многом определяются генетической составляющей индивида. В марафоне почти всегда побеждает спортсмен из Кении или Эфиопии, поскольку в африканской популяции этих стран наиболее развит генетически детерминированный путь метаболизма глюкозы, определяющий способность быстро бежать марафон.

Со спортивной успешностью на сегодня связывают более 150 полиморфных позиций в ДНК, из которых 93 ассоциированы с выносливостью и 62 — с силовой нагрузкой [91]. Спектр потенциальных генов воздействия при помощи геномного редактирования очень широк: эритропоэтин, инсулиноподобный фактор роста 1, человеческий гормон роста, миостатин, эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, эндорфины, энкефалины, гены белков цитоскелета и т. д. Для ряда этих генов уже разработаны подходы и проведены клинические испытания по введению в геном человека конкретных аллелей генов [85].

Репрогенетика

В классической интерпретации репрогенетика предполагает отбор человеческих эмбрионов с определёнными свойствами из получаемых «естественных» вариантов. Однако технология редактирования генома позволяет расширить возможности подхода за счет создания вариантов, невозможных для данной пары родителей [88]. При этом возникает множество вопросов этического свойства, которые человечеству еще предстоит решить [90].

Этические вопросы геномного редактирования и правовое регулирование

Несмотря на то, что технологии геномного редактирования с использованием «дизайнерских» нуклеаз обладают огромным потенциалом создания эффективной терапии для пациентов, страдающих от генетических заболеваний, их применение в терапевтических целях все еще находится в зачаточном состоянии. В этой связи развитие этической и нормативно-правовой базы, обеспечивающей эффективность и безопасность использования геномного

Таблица 2. Примеры заболеваний, для лечения которых используют геномное редактирование на основе дизайнерских нуклеаз

Область действия	Принципы	Методы	Ссылка
Наследственные заболевания глаз	Разрушение гена	TALENs, CRISPR/Cas9	[59-63]
Гемоглобинопатии (серповидноклеточная анемия, β-талассемия)	Вставка рабочего гена β-глобина	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9	[7-13]
Мышечные дистрофии	Вставка рабочего гена дистрофина или удаление «плохого» экзона в имеющемся гене	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9	[64-71]
Онкология	Удаление или исправление мутантного варианта гена	TALENs, CRISPR/Cas9	[29–32]
ВИЧ	Вырезание копии ДНК вируса из генома человека или удаление гена рецептора, через который вирус проникает в клетку	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9	[72-82]
Вирус гепатита В	Уничтожение генома вируса	CRISPR/Cas9	[58]
Генетический допинг	Добавление требуемого аллеля гена	TALENs, CRISPR/Cas9	[83-87]
Репрогенетика	Все виды изменений	TALENs, CRISPR/Cas9	[83-87]

редактирования, чрезвычайно важно [92].

В рамках работы этических комитетов и уполномоченных государственных органов необходимо фиксировать и уточнять аспекты, оказывающие влияние на клиническую реализацию технологий редактирования генома. Эти структуры должны предложить такую «дорожную карту» развития и внедрения технологий геномного редактирования, которая позволит безопасно и быстро переводить новейшие методы в клиническую практику.

Опережающее развитие принципиально новых технологий в медицине не позволяет законодателю работать над правовой основой их использования так же, как раньше. В настоящее время назрела смена парадигмы законодательного регулирования выхода новых медицинских технологий из научно-исследовательской лаборатории в клинику. Глобализация привела к тому, что инновации распространяются по миру буквально со скоростью света. Новая перспективная медицинская технология, где бы она ни была создана, неизбежно находит развитие и используется в первую очередь в странах с более гибким или либеральным законодательством. Такие государства получают «фору» за счет раннего внедрения инновационных подходов даже с учетом рисков, заключенных в нем. Многие законодательные ограничения перехода «наука–медицина» в отдельных странах не имеют смысла, поскольку технологии, созданные в этих странах, рано или поздно попадают в «научные офшоры», откуда быстро распространяют по остальному миру, а также привлекают на территорию «офшоров» клиентов.

Некоторые страны сперва пытаются запрещать применение систем редактирования генома человека при по-

мощи «дизайнерских» нуклеаз, однако вынуждены быстро менять позицию, дабы не оказаться в хвосте технологических лидеров. После выхода в 2015 г. работы китайских авторов по редактированию генома человеческих эмбрионов методом CRISPR/Cas9 в феврале 2016 г. группе британских ученых было дано разрешение на генетическую модификацию человеческих эмбрионов с помощью CRISPR/Cas9 и родственных методов «дизайнерских» нуклеаз [93].

Общественное мнение на фоне внедрения технологий в отдельных юрисдикциях быстро меняется и начинает давить на собственное законодательное регулирование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Созданные за последние несколько лет методы редактирования генома представляют собой развитие существующих с конца прошлого века подходов к генной терапии. Однако можно с уверенностью утверждать, что сегодня мы наблюдаем смену парадигмы в области геномной медицины. На начало второго десятилетия XXI в. пришлось сразу несколько технологических прорывов, обладающих мощным синергетическим эффектом: усовершенствование технологии направленной клеточной дифференцировки, значительное удешевление и рутинное применение геномных секвенаторов и создание описанных в данном обзоре систем редактирования генома. Все это в сумме неизбежно приведет к появлению в ближайшие 3–5 лет персонализированной геномной медицины нового качества. Технологии направленного изменения генома станут рутинным инструментом врача-клинициста.

Литература

- Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science*. 1972; 175 (4025): 949–55. doi:10.1126/science.175.4025.949.
- Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990 Aug 30; 323 (9): 570–8. doi:10.1056/NEJM199008303230904.
- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database [Интернет]. John Wiley and Sons Ltd., provided by the Journal of Gene Medicine. с2016 – [обновлено: февраль 2016 г.; дата обращения: июнь 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- De Ravin SS, Wu X, Moir S, Anaya-O'Brien S, Kwatemaa N, Little P, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*. 2016 Apr 20; 8 (335): 335ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8856.
- Ward P, Walsh CE. Current and future prospects for hemophilia gene therapy. *Expert Rev Hematol*. 2016 May 26: 1–11. [Epub ahead of print].
- Swystun LL, Lillcrap D. Gene Therapy for Coagulation Disorders. *Circ Res*. 2016 Apr 29; 118 (9): 1443–52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307015.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
- Canver MC, Orkin SH. Customizing the genome as therapy for the β -hemoglobinopathies. *Blood*. 2016 May 26; 127 (21): 2536–45. doi: 10.1182/blood-2016-01-678128. Epub 2016 Apr 6.
- Cottle RN, Lee CM, Bao G. Treating hemoglobinopathies using gene-correction approaches: promises and challenges. *Hum Genet*. 2016 Jun 17. [Epub ahead of print].
- Tasan I, Jain S, Zhao H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum Genet*. 2016 Jun 1. [Epub ahead of print].
- Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, Voytas DF. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int J Hematol*. 2016 May 27. [Epub ahead of print].
- Yang Y, Zhang X, Yi L, Hou Z, Chen J, Kou X, et al. Naive Induced Pluripotent Stem Cells Generated From β -Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jan; 5 (1): 8–19. doi: 10.5966/sctm.2015-0157. Epub 2015 Dec 16. Erratum in: *Stem Cells Transl Med*. 2016 Feb; 5 (2): 267.
- Smith EC, Orkin SH. Hemoglobin genetics: recent contributions of GWAS and gene editing. *Hum Mol Genet*. 2016 Jun 23. pii: ddw170. [Epub ahead of print].
- Lee TW, Southern KW, Perry LA, Penny-Dimri JC, Aslam AA. Topical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene replacement for cystic fibrosis-related lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jun 17; 6: CD005599.
- Alton EW, Armstrong DK, Ashby D, Bayfield KJ, Bilton D, Bloomfield EV, et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Sep; 3 (9): 684–91. doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3.
- Ye GJ, Budzynski E, Sonnentag P, Nork TM, Sheibani N, Gurel Z, et al. Cone-Specific Promoters for Gene Therapy of Achromatopsia and Other Retinal Diseases. *Hum Gene Ther*. 2016 Jan; 27 (1): 72–82. doi: 10.1089/hum.2015.130.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358 (21): 2240–8. doi:10.1056/NEJMoa0802315.
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene therapy on visual function in

- Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008; 358 (21): 2231–9. doi:10.1056/NEJMoa0802268.
19. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, et al. Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. *Hum Gene Ther.* 2008 Oct; 19 (10): 979–90. doi:10.1089/hum.2008.107.
 20. Walker MC, Schorge S, Kullmann DM, Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L. Gene therapy in status epilepticus. *Epilepsia.* 2013 Sep; 54 Suppl 6: 43–5. doi:10.1111/epi.12275.
 21. Giuncamp C, Pap T, Schedel J, Pap G, Moller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Gene therapy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2000; 67 (6): 570–1.
 22. Evans CH, Gouze JN, Gouze E, Robbins PD, Ghivizzani SG. Osteoarthritis gene therapy. *Gene Ther.* 2004 Feb; 11 (4): 379–89. doi:10.1038/sj.gt.3302196.
 23. Carlsson T, Winkler C, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Cenci A, et al. Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain.* 2005 Mar; 128 (Pt 3): 559–69. doi:10.1093/brain/awh374.
 24. Forsayeth J, Bankiewicz KS, Aminoff MJ. Gene therapy for Parkinson's disease: Where are we now and where are we going? *Expert Rev Neurother.* 2010 Dec; 10 (12): 1839–45. doi:10.1586/ern.10.161.
 25. Palfi S, Gurruchaga, JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisce S, Buttery PC, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet.* 2014 Mar 29; 383 (9923): 1138–46. doi:10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
 26. Cross D, Burmester JK. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clin Med Res.* 2006 Sep; 4 (3): 218–27.
 27. Andersen JB, Thorgerisson SS. A perspective on molecular therapy in cholangiocarcinoma: present status and future directions. *Hepat Oncol.* 2014 Jan 1; 1 (1): 143–57.
 28. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther.* 2014 Sep 10; 2: 27. doi:10.1186/2052-8426-2-27.
 29. Khan FA, Pandupuspitasari NS, Chun-Jie H, Ao Z, Jamal M, Zohaib A, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget.* 2016 May 26. doi:10.18632/oncotarget.9646. [Epub ahead of print].
 30. White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget.* 2016 Mar 15; 7 (11): 12305–17. doi:10.18632/oncotarget.7104.
 31. Liu T, Shen JK, Li Z, Choy E, Hornicek FJ, Duan Z. Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma. *Cancer Lett.* 2016 Apr 1; 373 (1): 109–18. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.030. Epub 2016 Jan 21.
 32. Tang H, Shrager JB. CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy. *EMBO Mol Med.* 2016 Jan 8; 8 (2): 83–5. doi:10.15252/emmm.201506006.
 33. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Chapter 8.5: Gene Replacement and Transgenic Animals: DNA Is Transferred into Eukaryotic Cells in Various Ways. In: *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2002. ISBN 0-7167-3136-3.
 34. O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science.* 1991 Mar 15; 251 (4999): 1351–5. doi:10.1126/science.1900642.
 35. Karow M, Calos MP. The therapeutic potential of phiC31 integrase as a gene therapy system. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Oct; 11 (10): 1287–96. doi:10.1517/14712598.2011.601293.
 36. Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and Selection of Novel Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annu. Rev Biochem.* 2001; 70: 313–40.
 37. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell.* 2008 Jul 25; 31 (2): 294–301. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.016.
 38. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics.* 2011 Aug; 188 (4): 773–82. doi:10.1534/genetics.111.131433.
 39. Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochemaix P, Desfontaines D, Puzin C, et al. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jun 1; 31 (11): 2952–62. doi:10.1093/nar/gkg375.
 40. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol.* 2011 Feb; 29 (2): 135–6. doi:10.1038/nbt.1767.
 41. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 957–63. doi:10.1038/nmeth.2649.
 42. Boissel S, Jarjour J, Astrakhan A, Adey A, Gouble A, Duchateau P, et al. megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2014 Feb; 42 (4): 2591–601. doi:10.1093/nar/gkt1224.
 43. Certo MT, Gwiazda KS, Kuhar R, Sather B, Curinga G, Mandt T, et al. Coupling endonucleases with DNA end-processing enzymes to drive gene disruption. *Nat Methods.* 2012 Oct; 9 (10): 973–5. doi:10.1038/nmeth.2177.
 44. Delacôte F, Perez C, Guyot V, Duhamel M, Rochon C, Ollivier N, et al. High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e53217. doi:10.1371/journal.pone.0053217.
 45. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. doi:10.1126/science.1258096.
 46. Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. П., Закирян С. М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas — инструменты открытий. *Acta naturae.* 2014; т. 6, 3 (22): 20–41.
 47. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug; 15 (8): 541–55. doi:10.1038/nrg3763. Epub 2014 Jul 15.
 48. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 6; 93 (3): 1156–60.
 49. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing Off-Target Cleavage Specificities of Zinc Finger Nucleases by in Vitro Selection. *Nat Methods.* 2011 Aug 7; 8 (9): 765–70. doi:10.1038/nmeth.1670.
 50. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science.* 2011 Jul 15; 333 (6040): 307. doi:10.1126/science.1207773.
 51. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1509–12. doi:10.1126/science.1178811.
 52. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1501. Bibcode:2009Sci...326.1501M. doi:10.1126/science.1178817. PMID 19933106.
 53. Horvath P, Barrangou R (January 2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". *Science* 327 (5962): 167–70. doi:10.1126/Science.1179555.
 54. Swartz DC, Mosterd C, van Passel MW, Brouns SJ. CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e35888. doi:10.1371/journal.pone.0035888.
 55. Boroviak K, Doe B, Banerjee R, Yang F, Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis.* 2016 Feb; 54 (2): 78–85. doi:10.1002/dvg.22915. Epub 2016 Jan 25.
 56. Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol.* 2016 Mar; 34 (3): 328–33. doi:10.1038/nbt.3471. Epub 2016 Feb 1.
 57. End of chemotherapy within 20 years as pioneering DNA project launched. *The Daily Telegraph.* 01.08.2014
 58. Zhu W, Xie K, Xu Y, Wang L, Chen K, Zhang L, Fang J. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and

- transgenic mouse. *Virus Res.* 2016 Jun 2; 217: 125–32. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.003. Epub 2016 Apr 2.
59. Hung SS, McCaughey T, Swann O, Pébay A, Hewitt AW. Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Jun; 53: 1–20. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.05.001. [Epub ahead of print].
 60. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep.* 2016 Jan 27; 6:19969. doi: 10.1038/srep19969.
 61. Nafissi N, Foldvari M. Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Front Neurosci.* 2015 Oct 14; 9: 355. doi: 10.3389/fnins.2015.00355.
 62. Li Y, Chan L, Nguyen HV, Tsang SH. Personalized Medicine: Cell and Gene Therapy Based on Patient-Specific iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 854: 549–55. doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_73
 63. Wu WH, Tsai YT, Justus S, Lee T, Zhang L, Lin CS, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 2016 May 20. doi: 10.1038/mt.2016.107. [Epub ahead of print].
 64. Mendell JR, Rodino-Klapac LR. Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment. *Cell Res.* 2016 May; 26 (5): 513–4. doi: 10.1038/cr.2016.28. Epub 2016 Mar 1.
 65. Himes CL, Jones TI, Jones PL. Scalpel or Straitjacket: CRISPR/Cas9 Approaches for Muscular Dystrophies. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Apr; 37 (4): 249–51. doi: 10.1016/j.tips.2016.02.001. Epub 2016 Feb 22.
 66. Iyombe-Engembe JP, Ouellet DL, Barbeau X, Rousseau J, Chapdelaine P, Lagüe P, Tremblay JP. Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016 Jan 26; 5: e283. doi: 10.1038/mtna.2015.58.
 67. Maggio I, Stefanucci L, Janssen JM, Liu J, Chen X, Mouly V, Gonçalves MA. Selection-free gene repair after adenoviral vector transduction of designer nucleases: rescue of dystrophin synthesis in DMD muscle cell populations. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 18; 44 (3): 1449–70. doi: 10.1093/nar/gkv1540. Epub 2016 Jan 13.
 68. Kawecka K, Theodoulides M, Hasoglu Y, Jarmin S, Kymalainen H, Le-Heron A, et al. Adeno-Associated Virus (AAV) Mediated Dystrophin Gene Transfer Studies and Exon Skipping Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *Curr Gene Ther.* 2015; 15 (4): 395–415.
 69. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015 Feb 18; 6: 6244. doi: 10.1038/ncomms7244.
 70. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Perez-Pinera P, Brown MT, Majoros WH, et al. Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther.* 2015 Mar; 23 (3): 523–32. doi: 10.1038/mt.2014.234. Epub 2014 Dec 10.
 71. Maggio I, Chen X, Gonçalves MA. The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing. *Genome Med.* 2016 May 23; 8 (1): 59. doi: 10.1186/s13073-016-0316-x.
 72. Reardon S. Gene-editing method tackles HIV in first clinical test. *Nature.* 2014 Mar 05. doi: 10.1038/nature.2014.14813.
 73. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014 Mar 6; 370 (10): 901–10. doi: 10.1056/NEJMoa1300662.
 74. Kaminski R, Bella R, Yin C, Otte J, Ferrante P, Gendelman HE, et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 2016 May 19. doi: 10.1038/gt.2016.41. [Epub ahead of print].
 75. Ueda S, Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Koyanagi Y. Insufficient anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system for full viral replication. *Microbiol Immunol.* 2016 Jun 9. doi: 10.1111/1348-0421.12395. [Epub ahead of print].
 76. Stone D, Niyonzima N, Jerome KR. Genome editing and the next generation of antiviral therapy. *Hum Genet.* 2016 Jun 8. [Epub ahead of print].
 77. Pernet O, Yadav SS, An DS. Stem cell-based therapies for HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 May 2. pii: S0169-409X(16)30137-5. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.027. [Epub ahead of print].
 78. Kim M, Siliciano RF. Genome editing for clinical HIV isolates. *Nat Biotechnol.* 2016 Apr 7; 34 (4): 388–9. doi: 10.1038/nbt.3531.
 79. Wang CX, Cannon PM. The clinical applications of genome editing in HIV. *Blood.* 2016 May 26; 127 (21): 2546–52. doi: 10.1182/blood-2016-01-678144. Epub 2016 Apr 6.
 80. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep.* 2016 Apr 19; 15 (3): 481–9. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.042. Epub 2016 Apr 7.
 81. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol Ther.* 2016 Mar; 24 (3): 522–6. doi: 10.1038/mt.2016.24. Epub 2016 Jan 22.
 82. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Yet al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep.* 2016 Mar 4; 6: 22555. doi: 10.1038/srep22555.
 83. Momaya A, Fawal M, Estes R. Performance-enhancing substances in sports: a review of the literature. *Sports Med.* 2015 Apr; 45 (4): 517–31. doi: 10.1007/s40279-015-0308-9.
 84. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code: The 2015 Prohibited List of International Standards. Montreal (Quebec); 2014 Sep 20. 10 p.
 85. Adis Insight [Интернет]. Cham (Switzerland): Springer International Publishing AG; [дата обращения: июнь 2016 г.]. Drug Profile: Erythropoietin gene therapy — Oxford BioMedica. Доступно по ссылке: <http://adisinsight.springer.com/drugs/800017416>.
 86. Barry P. Finding the golden genes. *Science News.* 2008 Jul 18.
 87. Miah A. Genetically Modified Athletes: Biomedical Ethics, Gene Doping and Sport. London; New York: Routledge; 2004. 208 p.
 88. Regalado A. Engineering the Perfect Baby. *MIT Technology Review.* 2015 Mar 5.
 89. Parens E, Knowles LP. Reprogenetics and public policy. Reflections and recommendations. *Hastings Cent Rep.* 2003 Jul–Aug; 33 (4): S1–24.
 90. Pray L. Embryo screening and the ethics of human genetic engineering. *Nature Education.* 2008; 1 (1): 207.
 91. Ahmetov II, Egorova ES, Gabdrakhmanova LJ, Fedotovskaya ON. Genes and Athletic Performance: An Update. *Med Sport Sci.* 2016; 61: 41–54. doi: 10.1159/000445240. Epub 2016 Jun 10.
 92. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015 Apr 3; 348 (6230): 36–3. doi: 10.1126/science.aab1028.
 93. Knapton S. British scientists granted permission to genetically modify human embryos. *The Daily Telegraph.* 2016 Feb 1.

References

- Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science*. 1972; 175 (4025): 949–55. doi:10.1126/science.175.4025.949.
- Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990 Aug 30; 323 (9): 570–8. doi:10.1056/NEJM199008303230904.
- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database [Internet]. John Wiley and Sons Ltd., provided by the Journal of Gene Medicine. c2016 – [updated 2016 Feb; cited 2016 Jun]. Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- De Ravin SS, Wu X, Moir S, Anaya-O'Brien S, Kwatema N, Little P, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*. 2016 Apr 20; 8 (335): 335ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8856.
- Ward P, Walsh CE. Current and future prospects for hemophilia gene therapy. *Expert Rev Hematol*. 2016 May 26: 1–11. [Epub ahead of print].
- Swystun LL, Lillicrap D. Gene Therapy for Coagulation Disorders. *Circ Res*. 2016 Apr 29; 118 (9): 1443–52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307015.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5. Epub 2015 Apr 18.
- Canver MC, Orkin SH. Customizing the genome as therapy for the β -hemoglobinopathies. *Blood*. 2016 May 26; 127 (21): 2536–45. doi: 10.1182/blood-2016-01-678128. Epub 2016 Apr 6.
- Cottle RN, Lee CM, Bao G. Treating hemoglobinopathies using gene-correction approaches: promises and challenges. *Hum Genet*. 2016 Jun 17. [Epub ahead of print].
- Tasan I, Jain S, Zhao H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum Genet*. 2016 Jun 1. [Epub ahead of print].
- Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, Voytas DF. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int J Hematol*. 2016 May 27. [Epub ahead of print].
- Yang Y, Zhang X, Yi L, Hou Z, Chen J, Kou X, et al. Naïve Induced Pluripotent Stem Cells Generated From β -Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jan; 5 (1): 8–19. doi: 10.5966/sctm.2015-0157. Epub 2015 Dec 16. Erratum in: *Stem Cells Transl Med*. 2016 Feb; 5 (2): 267.
- Smith EC, Orkin SH. Hemoglobin genetics: recent contributions of GWAS and gene editing. *Hum Mol Genet*. 2016 Jun 23. pii: ddx170. [Epub ahead of print].
- Lee TW, Southern KW, Pery LA, Penny-Dimri JC, Aslam AA. Topical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene replacement for cystic fibrosis-related lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jun 17; 6: CD005599.
- Alton EW, Armstrong DK, Ashby D, Bayfield KJ, Bilton D, Bloomfield EV, et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Sep; 3 (9): 684–91. doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3.
- Ye GJ, Budzynski E, Sonnentag P, Nork TM, Sheibani N, Gurel Z, et al. Cone-Specific Promoters for Gene Therapy of Achromatopsia and Other Retinal Diseases. *Hum Gene Ther*. 2016 Jan; 27 (1): 72–82. doi: 10.1089/hum.2015.130.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358 (21): 2240–8. doi:10.1056/NEJMoa0802315.
- Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358 (21): 2231–9. doi:10.1056/NEJMoa0802268.
- Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, et al. Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. *Hum Gene Ther*. 2008 Oct; 19 (10): 979–90. doi:10.1089/hum.2008.107.
- Walker MC, Schorge S, Kullmann DM, Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L. Gene therapy in status epilepticus. *Epilepsia*. 2013 Sep; 54 Suppl 6: 43–5. doi:10.1111/epi.12275.
- Giuncamp C, Pap T, Schedel J, Pap G, Moller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Gene therapy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2000; 67 (6): 570–1.
- Evans CH, Gouze JN, Gouze E, Robbins PD, Ghivizzani SG. Osteoarthritis gene therapy. *Gene Ther*. 2004 Feb; 11 (4): 379–89. doi: 10.1038/sj.gt.3302196.
- Carlsson T, Winkler C, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Cenci A, et al. Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain*. 2005 Mar; 128 (Pt 3): 559–69. doi: 10.1093/brain/awh374.
- Forsayeth J, Bankiewicz KS, Aminoff MJ. Gene therapy for Parkinson's disease: Where are we now and where are we going? *Expert Rev Neurother*. 2010 Dec; 10 (12): 1839–45. doi: 10.1586/ern.10.161.
- Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavis S, BATTERY PC, et al. Long-term safety and tolerability of Pro Savin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*. 2014 Mar 29; 383 (9923): 1138–46. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
- Cross D, Burmester JK. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clin Med Res*. 2006 Sep; 4 (3): 218–27.
- Andersen JB, Thorgeirsson SS. A perspective on molecular therapy in cholangiocarcinoma: present status and future directions. *Hepat Oncol*. 2014 Jan 1; 1 (1): 143–57.
- Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther*. 2014 Sep 10; 2: 27. doi: 10.1186/2052-8426-2-27.
- Khan FA, Pandupusitasari NS, Chun-Jie H, Ao Z, Jamal M, Zohaib A, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget*. 2016 May 26. doi: 10.18632/oncotarget.9646. [Epub ahead of print].
- White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget*. 2016 Mar 15; 7 (11): 12305–17. doi: 10.18632/oncotarget.7104.
- Liu T, Shen JK, Li Z, Choy E, Hornicek FJ, Duan Z. Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma. *Cancer Lett*. 2016 Apr 1; 373 (1): 109–18. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.030. Epub 2016 Jan 21.
- Tang H, Shrager JB. CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy. *EMBO Mol Med*. 2016 Jan 8; 8 (2): 83–5. doi: 10.15252/emmm.201506006.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Chapter 8.5: Gene Replacement and Transgenic Animals: DNA Is Transferred into Eukaryotic Cells in Various Ways. In: *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2002. ISBN 0-7167-3136-3.
- O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*. 1991 Mar 15; 251 (4999): 1351–5. doi: 10.1126/science.1900642.
- Karow M, Calos MP. The therapeutic potential of phiC31 integrase as a gene therapy system. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Oct; 11 (10): 1287–96. doi:10.1517/14712598.2011.601293.
- Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and Selection of Novel Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annu. Rev Biochem*. 2001; 70: 313–40.
- Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*. 2008 Jul 25; 31 (2): 294–301. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
- Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases.

- Genetics. 2011 Aug; 188 (4): 773–82. doi: 10.1534/genetics.111.131433.
39. Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochaix P, Desfontaines D, Puzin C, et al. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jun 1; 31 (11): 2952–62. doi: 10.1093/nar/gkg375.
 40. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol.* 2011 Feb; 29 (2): 135–6. doi: 10.1038/nbt.1767.
 41. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 957–63. doi: 10.1038/nmeth.2649.
 42. Boissel S, Jarjour J, Astrakhan A, Adey A, Gouble A, Duchateau P, et al. megaTALS: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2014 Feb; 42 (4): 2591–601. doi: 10.1093/nar/gkt1224.
 43. Certo MT, Gwiazda KS, Kuhar R, Sather B, Curinga G, Mandt T, et al. Coupling endonucleases with DNA end-processing enzymes to drive gene disruption. *Nat Methods.* 2012 Oct; 9 (10): 973–5. doi: 10.1038/nmeth.2177.
 44. Delacôte F, Perez C, Guyot V, Duhamel M, Rochon C, Ollivier N, et al. High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e53217. doi: 10.1371/journal.pone.0053217.
 45. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. doi: 10.1126/science.1258096
 46. Nemudriy AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakiyan SM. Sistemy redaktirovaniya genomov TALEN i CRISPR/Cas — instrumenty otkrytiy. *Acta naturae.* 2014; vol. 6, 3 (22): 20–41.
 47. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug; 15 (8): 541–55. doi: 10.1038/nrg3763. Epub 2014 Jul 15.
 48. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 6; 93 (3): 1156–60.
 49. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing Off-Target Cleavage Specificities of Zinc Finger Nucleases by in Vitro Selection. *Nat Methods.* 2011 Aug 7; 8 (9): 765–70. doi: 10.1038/nmeth.1670.
 50. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science.* 2011 Jul 15; 333 (6040): 307. doi: 10.1126/science.1207773.
 51. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1509–12. doi: 10.1126/science.1178811.
 52. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science.* 2009 Dec 11; 326 (5959): 1501. Bibcode:2009Sci...326.1501M. doi:10.1126/science.1178817. PMID 19933106.
 53. Horvath P, Barrangou R (January 2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". *Science* 327 (5962): 167–70. doi: 10.1126/Science.1179555.
 54. Swarts DC, Mosterd C, van Passel MW, Brouns SJ. CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e35888. doi: 10.1371/journal.pone.0035888.
 55. Boroviak K, Doe B, Banerjee R, Yang F, Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis.* 2016 Feb; 54 (2): 78–85. doi: 10.1002/dvg.22915. Epub 2016 Jan 25.
 56. Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol.* 2016 Mar; 34 (3): 328–33. doi: 10.1038/nbt.3471. Epub 2016 Feb 1.
 57. End of chemotherapy within 20 years as pioneering DNA project launched. *The Daily Telegraph*, 01.08.2014
 58. Zhu W, Xie K, Xu Y, Wang L, Chen K, Zhang L, Fang J. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse. *Virus Res.* 2016 Jun 2; 217: 125–32. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.003. Epub 2016 Apr 2.
 59. Hung SS, McCaughey T, Swann O, Pébay A, Hewitt AW. Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Jun; 53; 1–20. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.05.001. [Epub ahead of print].
 60. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep.* 2016 Jan 27; 6:19969. doi: 10.1038/srep19969.
 61. Nafissi N, Foldvari M. Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Front Neurosci.* 2015 Oct 14; 9: 355. doi: 10.3389/fnins.2015.00355.
 62. Li Y, Chan L, Nguyen HV, Tsang SH. Personalized Medicine: Cell and Gene Therapy Based on Patient-Specific iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 854: 549–55. doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_73
 63. Wu WH, Tsai YT, Justus S, Lee T, Zhang L, Lin CS, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 2016 May 20. doi: 10.1038/mt.2016.107. [Epub ahead of print].
 64. Mendell JR, Rodino-Klapac LR. Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment. *Cell Res.* 2016 May; 26 (5): 513–4. doi: 10.1038/cr.2016.28. Epub 2016 Mar 1.
 65. Himeda CL, Jones TI, Jones PL. Scalpel or Straitjacket: CRISPR/Cas9 Approaches for Muscular Dystrophies. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Apr; 37 (4): 249–51. doi: 10.1016/j.tips.2016.02.001. Epub 2016 Feb 22.
 66. Iyombe-Engembe JP, Ouellet DL, Barbeau X, Rousseau J, Chappdelaine P, Lagüe P, Tremblay JP. Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016 Jan 26; 5: e283. doi: 10.1038/mtna.2015.58.
 67. Maggio I, Stefanucci L, Janssen JM, Liu J, Chen X, Mouly V, Gonçalves MA. Selection-free gene repair after adenoviral vector transduction of designer nucleases: rescue of dystrophin synthesis in DMD muscle cell populations. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 18; 44 (3): 1449–70. doi: 10.1093/nar/gkv1540. Epub 2016 Jan 13.
 68. Kawecka K, Theodoulides M, Hasoglu Y, Jarmin S, Kymalainen H, Le-Heron A, et al. Adeno-Associated Virus (AAV) Mediated Dystrophin Gene Transfer Studies and Exon Skipping Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *Curr Gene Ther.* 2015; 15 (4): 395–415.
 69. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015 Feb 18; 6: 6244. doi: 10.1038/ncomms7244.
 70. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Perez-Pinera P, Brown MT, Majoros WH, et al. Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther.* 2015 Mar; 23 (3): 523–32. doi: 10.1038/mt.2014.234. Epub 2014 Dec 10.
 71. Maggio I, Chen X, Gonçalves MA. The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing. *Genome Med.* 2016 May 23; 8 (1): 59. doi: 10.1186/s13073-016-0316-x.
 72. Reardon S. Gene-editing method tackles HIV in first clinical test. *Nature.* 2014 Mar 05. doi: 10.1038/nature.2014.14813.
 73. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014 Mar 6; 370 (10): 901–10. doi: 10.1056/NEJMoa1300662.
 74. Kaminski R, Bella R, Yin C, Otte J, Ferrante P, Gendelman HE, et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 2016 May 19. doi: 10.1038/gt.2016.41. [Epub ahead of print].
 75. Ueda S, Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Koyanagi Y. Insufficient anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system for full viral replication. *Microbiol Immunol.* 2016 Jun 9. doi: 10.1111/1348-0421.12395. [Epub ahead of print].
 76. Stone D, Niyonzima N, Jerome KR. Genome editing and the next generation of antiviral therapy. *Hum Genet.* 2016 Jun 8. [Epub ahead of print].
 77. Pernet O, Yadav SS, An DS. Stem cell-based therapies for

- HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 May 2. pii: S0169-409X(16)30137-5. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.027. [Epub ahead of print].
78. Kim M, Siliciano RF. Genome editing for clinical HIV isolates. *Nat Biotechnol.* 2016 Apr 7; 34 (4): 388-9. doi: 10.1038/nbt.3531.
 79. Wang CX, Cannon PM. The clinical applications of genome editing in HIV. *Blood.* 2016 May 26; 127 (21): 2546-52. doi: 10.1182/blood-2016-01-678144. Epub 2016 Apr 6.
 80. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep.* 2016 Apr 19; 15 (3): 481-9. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.042. Epub 2016 Apr 7.
 81. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol Ther.* 2016 Mar; 24 (3): 522-6. doi: 10.1038/mt.2016.24. Epub 2016 Jan 22.
 82. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Yet al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep.* 2016 Mar 4; 6: 22555. doi: 10.1038/srep22555.
 83. Momaya A, Fawal M, Estes R. Performance-enhancing substances in sports: a review of the literature. *Sports Med.* 2015 Apr; 45 (4): 517-31. doi: 10.1007/s40279-015-0308-9.
 84. World Anti-Doping Agency. *The World Anti-Doping Code: The 2015 Prohibited List of International Standards.* Montreal (Quebec); 2014 Sep 20. 10 p.
 85. Adis Insight [Internet]. Cham (Switzerland): Springer International Publishing AG; [cited 2016 Jun]. Drug Profile: Erythropoietin gene therapy — Oxford BioMedica. Available from: <http://adisinsight.springer.com/drugs/800017416>.
 86. Barry P. Finding the golden genes. *Science News.* 2008 Jul 18.
 87. Miah A. *Genetically Modified Athletes: Biomedical Ethics, Gene Doping and Sport.* London; New York: Routledge; 2004. 208 p.
 88. Regalado A. Engineering the Perfect Baby. *MIT Technology Review.* 2015 Mar 5.
 89. Parens E, Knowles LP. Reprogenetics and public policy. Reflections and recommendations. *Hastings Cent Rep.* 2003 Jul-Aug; 33 (4): S1-24.
 90. Pray L. Embryo screening and the ethics of human genetic engineering. *Nature Education.* 2008; 1 (1): 207.
 91. Ahmetov II, Egorova ES, Gabdrakhmanova LJ, Fedotovskaya ON. Genes and Athletic Performance: An Update. *Med Sport Sci.* 2016; 61: 41-54. doi: 10.1159/000445240. Epub 2016 Jun 10.
 92. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015 Apr 3; 348 (6230): 36-3. doi: 10.1126/science.aab1028.
 93. Knapton S. British scientists granted permission to genetically modify human embryos. *The Daily Telegraph.* 2016 Feb 1.