

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ CRISPR/Cas9 НА МОДЕЛИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В *in vivo*

© 2022 г. А. П. Костюшева^а, С. А. Брезгин^{а, б}, Н. И. Пономарева^{а, б}, И. А. Гоптарь^с, А. В. Никифорова^с, В. И. Гегечкори^а, В. Б. Ползуктова^а, К. А. Туркадзе^а, А. Е. Судьина^д, В. П. Чуланов^{а, б}, Д. С. Костюшев^{а, б, *}

^аПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения (Сеченовский университет), Москва, 119048 Россия

^бНаучно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354340 Россия

^сНаучно-исследовательский институт медицины труда, Москва, 105275 Россия

^дЦентр стратегического планирования Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 119121 Россия

*e-mail: dkostushev@gmail.com

Поступила в редакцию 31.03.2022 г.

После доработки 23.05.2022 г.

Принята к публикации 23.05.2022 г.

Хронический гепатит В (ХГВ) вызывается вирусом гепатита В (ВГВ) и представляет одну из ключевых проблем мирового здравоохранения. Современные методы терапии не позволяют полностью элиминировать ВГВ из инфицированных клеток и, следовательно, излечить хроническую форму инфекции. Системы сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 могут эффективно разрезать целевые последовательности ДНК, в том числе вирусные геномы. Разрезание основной формы генома ВГВ — кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) — приводит к значительному подавлению вирусной репликации, разрушению либо мутационной инактивации ккзДНК. К числу наиболее перспективных для “стерилизующего” излечения ХГВ, т.е. для полной элиминации вируса из организма, относятся подходы на основе CRISPR/Cas9. На модели ВГВ у мышей *in vivo* нами изучено противовирусное действие комплексов высокоспецифичного белка Cas9 и РНК-проводника, направленных на геном ВГВ. Показано, что однократная инъекция короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 уже к 48 ч снижает уровни ДНК ВГВ в сыворотке и печени мышей примерно в 10 раз, при этом в оставшихся ДНК ВГВ детектируются редкие мутации по типу вставок и делеций. Создание препаратов для лечения ХГВ на основе рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 в перспективе может существенно сократить сроки лечения и привести к полной элиминации вируса из организма.

Ключевые слова: генетическое редактирование, противовирусные препараты, геномные технологии, NGS

DOI: 10.31857/S002689842206012X

ВВЕДЕНИЕ

Хронический гепатит В (ХГВ) — тяжелое заболевание печени, вызываемое инфицированием гепатоцитов человека вирусом гепатита В (ВГВ). ХГВ встречается во всех странах земного шара, при этом наибольшее распространение ХГВ зарегистрировано в Азиатско-Тихоокеанском регионе, странах Африки и бассейне Амазонки, где до 8% населения являются носителями HBsAg ВГВ. В странах Восточной и Южной Европы, Ближнего Востока, Японии и ряде стран Южной Америки распространенность ХГВ варьирует в пределах 2–7%. В странах Северной Америки, Северной и Западной Европы, Австралии доля лиц с ХГВ в общей популяции составляет 0.5–2%. Распро-

страненность ХГВ в Российской Федерации составляет около 2% [1]. Несмотря на существование эффективной вакцины, а также ряда безопасных лекарственных препаратов, способных подавлять репликацию ВГВ, ХГВ остается одной из главных проблем мирового здравоохранения. При прекращении приема противовирусных препаратов происходит восстановление репликации ВГВ, ассоциированной с высокими рисками развития рака и цирроза печени [2]. Причина хронизации инфекции и высокой персистенции вируса — сложный жизненный цикл ВГВ, ориентированный на сохранение в ядре инфицированных клеток основной формы вирусного генома — кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК).

ккзДНК ВГВ представляет собой минихромосому, с которой считываются все вирусные РНК. Длительное (в течение всей жизни инфицированных) поддержание пула ккзДНК связано с высокой стабильностью минихромосом, а также с существованием механизмов восполнения пула ккзДНК за счет образования ккзДНК *de novo* из формы-предшественника. Пул ккзДНК восстанавливается за счет реинфекции (повторного заражения клеток), а также реимпорта геномной формы-предшественника в ядро [3].

Системы CRISPR/Cas9 считаются перспективными молекулярными инструментами, позволяющими осуществлять разработку препаратов для лечения ХГВ. Выраженная противовирусная активность различных систем CRISPR/Cas9 неоднократно показана на моделях ВГВ-инфекции *in vitro* и *in vivo* [4–12]. В ранних работах CRISPR/Cas9 доставляли с использованием ДНК-векторов на основе вирусов, тогда как в последнее время основное внимание привлекают невирусные методы доставки кодирующих мРНК Cas9/РНК-проводников [13] и РНП [14, 15]. Невирусные методы имеют несомненные преимущества как по эффективности действия CRISPR/Cas9, так и по безопасности (меньшая иммуногенность, меньшая вероятность внецелевого действия и др.) [16].

В нашей работе на модели ВГВ у мышей *in vivo* впервые оценен противовирусный эффект однократного введения РНП CRISPR/Cas9.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение РНК-проводника с помощью реакции транскрипции *in vitro*. Продукт ПЦР, кодирующий РНК-проводник под T7-промотором, получен с помощью Q5-полимеразы на основе продукта U6-PCR, как описано ранее [2]. В синтезе использовали праймеры *ultramerT7_f* и *St1_g*. ПЦР-продукт под T7-промотором служил матрицей для *in vitro* транскрипции (IVT) с использованием набора для синтеза РНК HiScribe Quick T7 High Yield (“NEB”, США) по протоколу производителя. Продукт реакции IVT инкубировали в течение ночи, а затем обрабатывали ДНКазой I (“New England Biolabs”, Великобритания) в течение 15 мин при 37°C с последующей очисткой изопропанолом. К реакционной смеси добавляли изопропанол и 0.5 М NaCl, центрифугировали в течение 30 мин. Далее осадок дважды промывали 70 и 95%-ным этанолом. Высушенный на воздухе осадок ресуспендировали в воде, свободной от РНКаз, и хранили при –80°C. Нуклеотидные последовательности спейсеров РНК-проводников и праймеры описаны ранее [6].

Получение и очистка белка Cas9. Белок нарабатывали в клетках *pLysS Escherichia coli* BL21 (DE3)

(“Novagen”). Клетки выращивали в среде LB (с добавлением соответствующего антибиотика, 0.5% сахарозы, 0.5% глицерина, 1 мМ хлорида магния, 50 мМ дигидрофосфата натрия, 50 мМ дигидрофосфата калия, 25 мМ сульфата аммония) при 30°C до OD₆₀₀ = 1.2. Экспрессию белка индуцировали 0.1 мМ IPTG в течение 16 ч при 18°C. Белок очищали с помощью аффинной и ионообменной хроматографии. Клетки ресуспендировали в 50 мМ буфере Трис-НCl pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, 0.2% Triton X-100, 0.1% Tween-20, обрабатывали ультразвуком на льду и центрифугировали при 15000 g в течение 40 мин. Осветленный лизат обрабатывали 0.05%-ным полиэтиленимином в течение 30 мин при 4°C, полученную суспензию центрифугировали при 15000 g в течение 40 мин. Супернатант связывали с Ni-хелатирующей сефарозой (“GE Healthcare”, США), промывали в 50 мМ буфере Трис-НCl pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 0.05% Igepal CA-630, и элюировали 50 мМ Трис-НCl pH 8.0 со 150 мМ NaCl, 0.3 М имидазола, 10% глицерина. Затем белок связывали с SP-сефарозой (“GE Healthcare”) в 50 мМ Трис-НCl-буфере pH 7.5, содержащем 150 мМ NaCl, 0.01% Triton X-100, 2 мМ ДТТ, элюировали линейным градиентом NaCl (150 мМ–1 М). Добавляли глицерин до 50% и хранили при –20°C.

Реакция разрезания ДНК-мишени *in vitro*. Плазмида 1.1-мерВГВ, содержащая 1.1 генома ВГВ (генотип D, подтип ayw), предоставлена Dieter Glebe (Giessen University, Германия). Рекомбинантный белок Cas9 смешивали с транскрибированным *in vitro* РНК-проводником в молярном соотношении 1 : 1 в буфере NEB3.1 и инкубировали в течение 10 мин для сборки РНП-комплексов. Затем в реакцию добавляли 200 нг плазмиды 1.1-мерВГВ. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C с последующей инактивацией при 95°C в течение 3 мин. Продукты разрезания визуализировали с помощью гель-электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле.

Эксперименты на мышах. Эксперименты проводили согласно [17] на мышах линии BALB/c (самцы 6–8 недель, по три особи в группе) с небольшими модификациями. Плазмиду 1.1-мерВГВ (4 мкг) вводили в хвостовую вену мышей в 0.9%-ном растворе NaCl, эквивалентном по массе 8% массы тела животного, в течение 5–8 с. Через 6 ч после гидродинамической инъекции в пробирках смешивали белок StCas9 и РНК-проводник St10 (либо контрольный РНК-проводник Stnc) в соотношении 3.15 мкг белка к 0.63 мкг РНК-проводника на мышь, смесь инкубировали в течение 10 мин для образования РНП-комплексов. Полученные РНП смешивали с 36 мкл реактива Lipofectamine3000 и инкубировали в течение 10 мин. Полученные липосомы вводили в хвостовую вену мышей. Через 48 ч после инъекции ВГВ-

кодирующих плазмид животных усыпляли в экзикаторе с хлороформом, подвергали дислокации шейных позвонков, затем проводили эксплантацию органов, забор крови и отделение плазмы. Печень мышей погружали в среду О.С.Т. (“SCigen”, США), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Выделение нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора РИБО-преп (“AmpliSens”, Россия) по протоколу производителя. Образцы печени животных гомогенизировали с помощью прибора MagNA Lyser (“Hoffmann-La Roche”, Швейцария) по протоколу производителя, к гомогенату добавляли лизирующий буфер. ДНК ВГВ выделяли из плазмы мышей с помощью набора РИБО-преп (“AmpliSens”) по протоколу производителя. Образцы нуклеиновых кислот, выделенных из гомогената печени, использовали для анализа внутрипеченочной ДНК ВГВ с нормированием на ген β -глобина, в образцах плазмы определяли количество ДНК ВГВ.

ПЦР-анализ. Полуколичественную ПЦР проводили со специфическими праймерами и зондами TaqMan для ДНК ВГВ и гена β -глобина [7, 12] на приборе Rotor Gene 6000. Использовали праймеры на ДНК ВГВ и ген β -глобина из коммерческого набора AmpliSens HBV-FL и V31-FER-CE — AMPLISENS® HPV HCR-SCREEN (“AmpliSens”).

Иммуногистохимия. Криостатные срезы толщиной 6 мкм получены из блоков О.С.Т. печени мышей. Срезы фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. Срезы после отмывки в Трис-НСI (50 мМ, pH 8.0, 3 раза по 10 мин) инкубировали с блокирующим буфером (0.02% Triton X-100, 10% сыворотки лошади, 150 мМ NaCl в растворе Трис-НСI (50 мМ, pH 8.0)) в течение 30 мин. Далее срезы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными анти-НВсAg-антителами мыши (ab8637) и первичными анти-FLAG-антителами кролика (ab1162), отмывали 3 раза по 10 мин промывочным буфером (0.02% Triton X-100, 200 мМ NaCl в растворе Трис-НСI (50 мМ, pH 8.0)), а затем инкубировали со вторичными антимышиными антителами козы AlexaFluor488 (ab150105), вторичными антикроличьими антителами козы AlexaFluor594 (ab150080) и реактивом Hoechst33324 (“Abcam” ab228351, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы повторно промывали 3 раза по 10 мин промывочным буфером и фиксировали реагентом Fluoroshield (“Abcam” ab104135), визуализировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000 с иммерсионными объективами $\times 20$. Работу проводили с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

Высокопроизводительное секвенирование. Регион ДНК ВГВ, кодирующий РНК-проводник St10, амплифицировали с помощью высокоточной полимеразы Q5 (“New England Biolabs”, США) из образцов ДНК из ткани печени. Использовали праймеры:

Seq_f: 5'-ТТААСАГГССАТТГАТТГГААА-3';
Seq_r: 5'-САГАГГАГССГАААААГГТТС-3'. Ампликоны очищали на агарозном геле и выделяли с помощью набора Qiagen Gel Extraction Kit (“QIAGEN”, США), концентрацию ампликонов измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (“Life Technologies”, США). Далее проводили лигирование адапторов для секвенирования на платформе Illumina. Полученные библиотеки секвенировали с помощью парных прочтений на инструменте MiSeq (“Illumina”, США). Выравнивание на референсную последовательность и получение сборок проводили в программе Geneious. Количество вставок и делеций нуклеотидов в сборках подсчитывали с помощью кода Python (доступен на GitHub, https://github.com/babinyurii/crispr_cas9).

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с помощью t -критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7; попарные апостериорные сравнения проводили с помощью критерия Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка разрезания генома ВГВ РНП-комплексами CRISPR/Cas9

В работе мы использовали белок Cas9 *Streptococcus thermophilus* (StCas9) и высокоэффективный РНК-проводник St10, описанные ранее [6]. Для оценки возможности разрезания плазмиды 1.1-мерВГВ (плазида содержит 1.1-мер генома ВГВ под контролем цитомегаловирусного промотора) получены РНП CRISPR/Cas9, состоящие из рекомбинантного белка StCas9 и РНК-проводника St10, транскрибированного в реакции *in vitro*. При инкубации РНП CRISPR/Cas9 с ВГВ-кодирующей плазмидой (1 ч при 37°C) система StCas9-St10 эффективно разрезала ДНК-мишень, о чем можно судить по изменению электрофоретической подвижности линейаризованной плазмиды (рис. 1). Следовательно, полученные комплексы РНП CRISPR/Cas9 эффективно разрезают мишень ВГВ в плазмиде.

РНП CRISPR/Cas9 снижают уровни ДНК и НВсAg ВГВ *in vivo*

Плазмиду 1.1мерВГВ вводили в хвостовую вену мышей BALB/c с помощью гидродинамической инъекции. Через 6 ч с использованием реак-

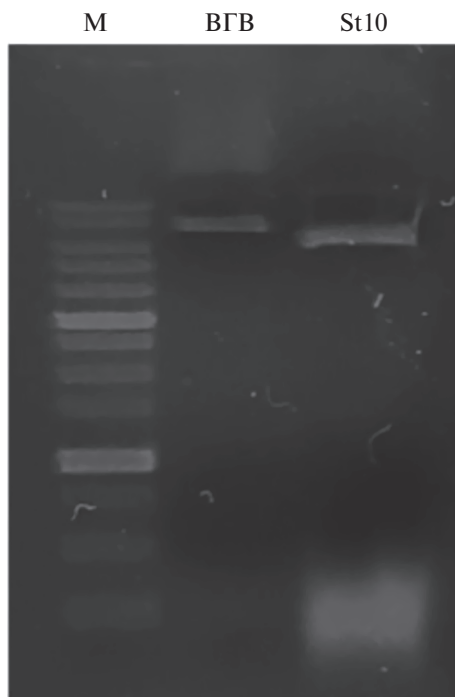


Рис. 1. Нуклеолитическое действие РНП StCas9 с РНК-проводником St10 с ВГВ-кодирующей плазмидой. М – маркер длин фрагментов ДНК; ВГВ – ВГВ-кодирующая плазида; St10 – ВГВ-кодирующая плазида, разрезанная комплексом StCas9 с РНК-проводником St10.

тива Lipofectamine 3000 проводили инъекцию РНП StCas9-St10. Контролем служили комплексы РНП StCas9-Stnc с некодирующим РНК-проводником. Противовирусное действие анализировали через 48 ч после начала эксперимента по уровню ДНК ВГВ в сыворотке крови и ткани печени, а также по иммуногистохимическому окрашиванию на НВсAg ВГВ. Для определения меченных FLAG StCas9-белков в гепатоцитах мыши проводили иммуногистохимическое окрашивание с антителами к FLAG (схема эксперимента представлена на рис. 2а).

В результате, к 48 ч после однократного введения РНП StCas9-St10 наблюдали снижение уровня ДНК ВГВ в сыворотке крови (ns, $p = 0.0520$) (рис. 2б) и в ткани печени примерно в 10 раз ($p = 0.0203$) (рис. 2в).

С использованием иммуногистохимического окрашивания на срезах печени выявлены многочисленные НВсAg-позитивные клетки, что подтверждает эффективную доставку ВГВ-кодирующих плазмид в гепатоциты при помощи гидродинамической инъекции. Сравнение групп StCas9-St10 и StCas9-Stnc показало незначительное снижение содержания (%) НВсAg-позитивных клеток в группе с ВГВ-таргетирующим РНК-проводником St10, однако эти различия оказались статисти-

чески незначимыми ($p = 0.1021$). Окрашивание на белок StCas9 не выявило клеток с внутриядерной локализацией StCas9, что может свидетельствовать либо об исчезновении короткоживущих РНП из ткани печени, либо о низкой эффективности доставки РНП в составе липосом.

Таким образом, на модели гидродинамической инъекции ВГВ *in vivo* нами впервые показана противовирусная активность однократно введенных короткоживущих комплексов РНП CRISPR/Cas9.

*Анализ генетического редактирования ДНК ВГВ при использовании StCas9 РНП *in vivo**

Разрезание генома ВГВ системами CRISPR/Cas9 приводит к значительному подавлению репликации вируса. Разрывы генома ВГВ, вызванные действием сайт-специфических нуклеаз, либо репарируются, как правило, со сдвигом рамок считывания [4], либо разрушаются [7]. Для оценки частоты мутаций в геноме ВГВ в ответ на РНП CRISPR/Cas9 из ткани печени мышей выделена ДНК ВГВ. Участок вирусного генома, фланкирующей мишень St10, был амплифицирован с помощью специфических праймеров и проанализирован с помощью высокопроизводительного секвенирования.

В результате, в образцах, полученных от контрольных мышей с StCas9-Stnc, не обнаружили мутаций по типу делеций и вставок нуклеотидов в целевом сайте В то же время, в группе мышей с таргетирующим РНК-проводником St10 детектируются редкие делеции и вставки нуклеотидов. Таким образом, частоты генетического редактирования внутрипеченочной ДНК ВГВ составляют 0.319693 – для делеций и 0.155376 – для вставок нуклеотидов на 1000 прочтений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффективность противовирусного действия CRISPR/Cas9 на моделях ХГВ определяется множеством вирусологических, иммунологических, молекулярных и технических факторов (подробно рассмотрено в обзоре [16]). Наиболее перспективной для создания препаратов, эффективных при ХГВ, представляется доставка РНП CRISPR/Cas9 в гепатоциты человека с помощью функционализированных (гепатотропных) наночастиц. Быстрое разрезание вирусных геномов при минимальных рисках внецелевого разрезания короткоживущими РНП может обеспечивать широкое окно терапевтического действия с минимальными рисками развития токсических эффектов. Дополнительные уровни безопасности могут обеспечиваться высокоспецифичными вариантами Cas-белков (слитые белки и белки с увеличенной специфичностью, такие как eSpCas9, Нура-Cas9, Sniper-Cas9, evoCas9 и др.) [6, 16, 18], а также улучшен-

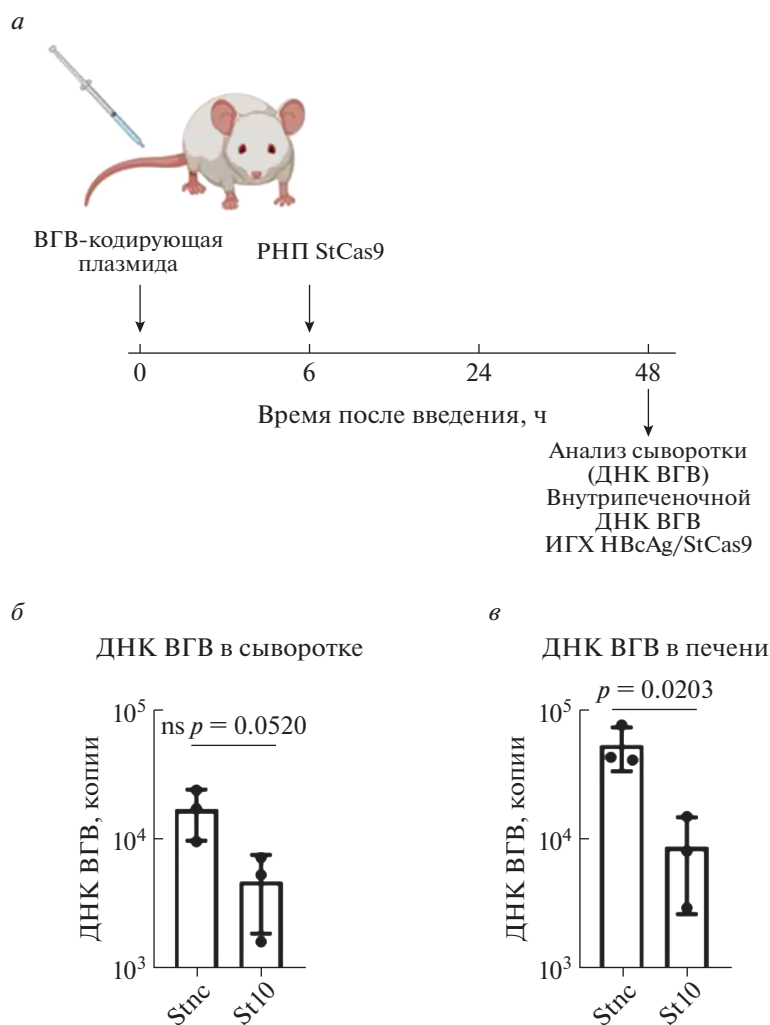


Рис. 2. Противовирусное действие РНП CRISPR/Cas9 на модели гидродинамической инъекции ВГВ-кодирующей плазмиды. *а* – Схема эксперимента. Анализ уровней ДНК ВГВ: ДНК ВГВ в сыворотке крови (*б*) и внутрипеченочная ДНК ВГВ (*в*) через 48 ч после инъекции. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ns – статистически незначимые отличия. Рис. *а* создан в программе BioRender. ИГХ – иммуногистохимический анализ.

ными версиями РНК-проводников, в том числе, с помощью химических и генетических модификаций структуры РНК-проводников и отдельных нуклеотидов [19].

Создание эффективных и безопасных методов системной доставки РНП CRISPR/Cas9 является одним из ключевых направлений в области разработки лекарственных средств на основе технологий генетического редактирования. В последние годы создан ряд перспективных средств доставки, включая вирусоподобные частицы, биологические частицы, наночастицы на основе биополимеров, композитных материалов и др. [20, 21].

Нами впервые изучено противовирусное действие РНП CRISPR/Cas9 при его однократном введении на модели ВГВ у мышей *in vivo*. Однократное введение РНП CRISPR/Cas9, даже с учетом неоптимальной системы доставки в виде

коммерческих липосом, снижало примерно в 10 раз вирусную нагрузку по параметру ДНК ВГВ в сыворотке крови и печени мышей (рис. 2б, в). Процент ВГВ-положительных клеток (по параметру НВсАg) практически не изменялся, что можно объяснить как длительным периодом полужизни вирусных белков, так и неполной элиминацией вируса из инфицированных клеток. При анализе целевых мутаций, обусловленных действием CRISPR/Cas9, обнаружены редкие делеции и вставки нуклеотидов (частота ~0.1–0.3/1000 прочтений). Важно отметить, что схожие значения частоты мутаций в целевом сайте наблюдались в ходе длительной (до 62 суток) продукции CRISPR/Cas9 с аденоассоциированного вектора у гуманизированных мышей, инфицированных ВГВ [22]. Низкая частота мутаций в сайте целевого разрезания на моделях ВГВ с одновременным значительным

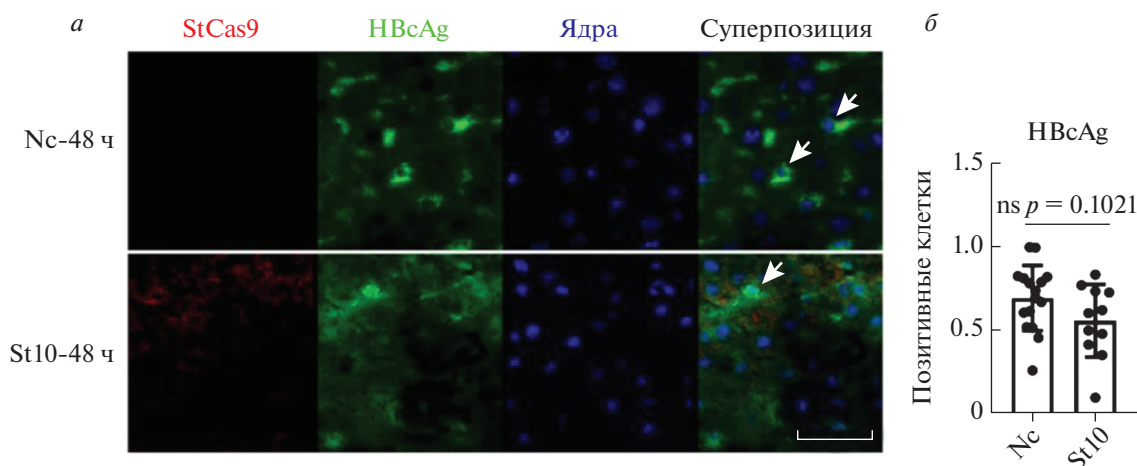


Рис. 3. Оценка StCas9- и HBcAg-позитивных клеток в гистологических срезах печени мышей. *a* – Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов печени мышей через 48 ч после инъекции: StCas9 (красное), HBcAg (зеленое), ядра клеток (синее). Размерная шкала 50 нм. *б* – Полуколичественная оценка содержания HBcAg-позитивных клеток в группах мышей (процент от общего числа клеток в видимом поле). Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ns – статистически незначимые отличия.

подавлением вирусной нагрузки, скорее всего, связана с преимущественным разрушением вирусных геномов, как описано ранее [7].

Системы CRISPR/Cas9 позволяют в короткие сроки элиминировать большую часть геномов ВГВ из инфицированных клеток. Использование CRISPR/Cas9 в виде РНП в сочетании с невирусными методами доставки может существенно сократить процесс лечения пациентов с ХГВ и обеспечить полную элиминацию ВГВ из организма. Учитывая, что уже существуют подходы к созданию эффективных и безопасных комплексов CRISPR/Cas9 для разрезания ВГВ, ключевым барьером на пути использования систем генетического редактирования в клинической практике является отсутствие эффективных и безопасных средств системной доставки РНП.

Благодарим Юрия Бабина за помощь в анализе биоинформатических данных.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 20-15-00373).

Все процедуры, проведенные с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений или принятой практике таких исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization (2017) *Global Hepatitis Report*, 2017.
- Чуланов В.П., Зуева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В. (2017) Гепатит С стал излечим. Гепатит В – следующий? *Терапевтический архив*. **89**, 4–13.
- Ko C., Chakraborty A., Chou W.-M., Hasreiter J., Wetengel J.M., Stadler D., Bester R., Asen T., Zhang K., Wisskirchen K. (2018) Hepatitis B virus (HBV) genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels. *J. Hepatol.* **69**(6), 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.012>
- Seeger C., Sohn J.A. (2016) Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther.* **24**, 1258–1266. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.94>
- Seeger C., Sohn J.A. (2014) Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **3**, e216. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.68>
- Kostyushev D., Brezgin S., Kostyusheva A., Zarifyan D., Goptar I., Chulanov V. (2019) Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**(9), 1779–1794. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03021-8>
- Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Zarifyan D., Utkina A., Goptar I., Chulanov V. (2019) Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* **9**, 1847.
- Li H., Sheng C., Liu H., Wang S., Zhao J., Yang L., Jia L., Li P., Wang L., Xie J., Xu D., Sun Y., Qiu S., Song H. (2018) Inhibition of HBV expression in HBV transgenic mice using AAV-delivered CRISPR-SaCas9. *Front. Immunol.* **9**, 2080. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02080>
- Lin S.-R., Yang H.-C., Kuo Y.-T., Liu C.-J., Yang T.-Y., Sung K.-C., Lin Y.-Y., Wang H.-Y., Wang C.-C., Shen Y.-C., Wu F.-Y., Kao J.-H., Chen D.-S., Chen P.-J. (2014) The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*.

- Mol. Ther. Nucl. Acids.* **3**, e186.
<https://doi.org/10.1038/mtna.2014.38>
10. Kennedy E.M., Kornepati A.V.R., Cullen B.R. (2015) Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. *Antiviral Res.* **123**, 188–192.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.004>
 11. Zhen S., Hua L., Liu Y.H., Gao L.C., Fu J., Wan D.Y., Dong L.H., Song H.F., Gao X. (2015) Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Ther.* **22**, 404–412.
<https://doi.org/10.1038/gt.2015.2>
 12. Kostyusheva A.P., Kostyushev D.S., Brezgin S.A., Zarifyan D.N., Volchkova E.V., Chulanov V.P. (2019) Small molecular inhibitors of DNA double strand break repair pathways increase the anti-HBV activity of CRISPR/Cas9. *Mol. Biol.* **53**, 274–285.
 13. Jiang C., Mei M., Li B., Zhu X., Zu W., Tian Y., Wang Q., Guo Y., Dong Y., Tan X. (2017) A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and psc9 *in vivo*. *Cell. Res.* **27**, 440.
 14. Suzuki Y., Onuma H., Sato R., Sato Y., Hashiba A., Maeki M., Tokeshi M., Kayesh M.E.H., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K., Harashima H. (2021) Lipid nanoparticles loaded with ribonucleoprotein-oligonucleotide complexes synthesized using a microfluidic device exhibit robust genome editing and hepatitis B virus inhibition. *J. Control. Release.* **330**, 61–71.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.013>
 15. Wang D., Chen L., Li C., Long Q., Yang Q., Huang A., Tang H. (2022) CRISPR/Cas9 delivery by NIR-responsive biomimetic nanoparticles for targeted HBV therapy. *J. Nanobiotechnol.* **20**, 1–16.
 16. Kostyushev D., Kostyusheva A., Ponomareva N., Brezgin S., Chulanov V. (2021) CRISPR/Cas and hepatitis B therapy: technological advances and practical barriers. *Nucl. Acid Ther.* **32**(1), 14–28.
<https://doi.org/10.1089/nat.2021.0075>
 17. Li L., Li S., Zhou Y., Yang L., Zhou D., Yang Y., Lu M., Yang D., Song J. (2017) The dose of HBV genome contained plasmid has a great impact on HBV persistence in hydrodynamic injection mouse model. *Virology J.* **14**, 1–11.
 18. Liu Y., Zhao M., Gong M., Xu Y., Xie C., Deng H., Li X., Wu H., Wang Z. (2018) Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus*. *Antiviral Res.* **152**, 58–67.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.02.011>
 19. Yin H., Song C.-Q., Suresh S., Wu Q., Walsh S., Rhym L.H., Mintzer E., Bolukbasi M.F., Zhu L.J., Kauffman K. (2017) Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1179–1187.
 20. Banskota S., Raguram A., Suh S., Du S.W., Davis J.R., Choi E.H., Wang X., Nielsen S.C., Newby G.A., Randolph P.B. (2022) Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins. *Cell.* **185**(2), 250–265.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.021>
 21. Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Smirnov V., Volchkova E., Lukashev A., Chulanov V. (2020) Gene editing by extracellular vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7362.
 22. Stone D., Long K.R., Loprieno M.A., De Silva Felixge H.S., Kenkel E.J., Liley R.M., Rapp S., Roychoudhury P., Nguyen T., Stensland L., Colón-Thillet R., Klouser L.M., Weber N.D., Le C., Waggoner J., Goecker E.A., Li A.Z., Eichholz K., Corey L., Tyrell D.L., Greninger A.L., Huang M.-L., Polyak S.J., Aubert M., Sagartz J.E., Jerome K.R. (2020) CRISPR/Cas9 gene editing of hepatitis B virus in chronically infected humanized mice. *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.* **20**, 258–275.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.014>

Antiviral Activity of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes at Hepatitis B Virus Model *in vivo*

A. P. Kostyusheva¹, S. A. Brezgin^{1,2}, N. I. Ponomareva^{1,2}, I. A. Goptar³, A. V. Nikiforova³,
 V. I. Gegechkori¹, V. B. Poluektova¹, K. A. Turkadze¹, A. E. Sudina⁴,
 V. P. Chulanov^{1,2}, and D. S. Kostyushev^{1,2,*}

¹ *Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases (Sechenov University), Moscow, 119048 Russia*

² *Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia*

³ *Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, 105275 Russia*

⁴ *Federal State Budgetary Institution Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121 Russia*

*e-mail: dkostushev@gmail.com

Chronic hepatitis B (CHB) caused by hepatitis B virus (HBV) infection, is one of the key issues of global health. Complete elimination of HBV from infected cells and, therefore, cure of chronic infection cannot be achieved with the use of modern antivirals. CRISPR/Cas9 systems of site-specific nucleases can effectively cleave target DNA, including viral genomes. Cleavage of the major form of HBV genome, covalently closed circular DNA (cccDNA), results in robust reduction in viral replication, degradation or mutational inactivation of cccDNA. CRISPR/Cas9-based approaches are one of the most promising for achieving a “sterilizing”

cure of CHB, i.e. complete elimination of the virus from the body. In this study, we analyzed antiviral activity of a high-specificity Cas9 protein and an sgRNA targeting HBV genome, at HBV mouse model *in vivo*. We found that a single injection of short-lived ribonucleoprotein complexes of CRISPR/Cas9 results in ~10-fold reduction in HBV DNA levels in serum and liver of mice as early as 48 hours after the start of the experiment. The remaining HBV DNA templates were found to harbor rare indel mutations at the target site. Developing new antivirals for treating CHB based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes could substantially reduce duration of CHB therapy and, potentially, achieve complete elimination of viral infection.

Keywords: gene editing, antiviral drugs, deletions, insertions, genome technologies, NGS