

На пути к искусственной печени

Болезни, связанные с нарушением функции печени, достаточно широко распространены. Радикальным способом их лечения является трансплантация печени. Однако трансплантационная медицина сталкивается с постоянной проблемой острой нехватки донорских органов, в результате чего значительное количество больных умирает, не дождавшись операции.

Казалось бы, неограниченным источником материала для трансплантации могли бы стать гепатоциты (клетки печени), культивируемые *in vitro*. К сожалению, культивирование гепатоцитов *in vitro* представляет собой проблему, которая в настоящее время остается нерешенной [1]. При выделении гепатоцитов большое количество клеток гибнет, а у выживших изменяются адгезивные свойства клеточной поверхности, так что их прикрепление на культуральном пластике с целью дальнейшего культивирования и накопления происходит с большими потерями. При последующем длительном культивировании гепатоциты теряют ряд своих функциональных свойств.

Работа исследователей из Центра регенеративной медицины Эдинбургского университета является фундаментальным прорывом в области регенерации печени из стволовых клеток. Ученым удалось дифференцировать эмбриональные и плюропатентные клетки человека в форме 3D клеточных агрегатов в зрелые клетки печени (гепатоциты), которые сохраняли свои свойства в течение одного года культивирования *in vitro* [2]. Затем клетки помещали в скаффолд из капролактона, площадью 1 см² и толщиной в несколько мм, и подкожно вводили мышам, не отторгающим человеческие клетки (иммуно-компетентные мыши). Имплантат успешно интегрировался с кровеносной системой животных. В плазме крови мышей были обнаружены белки печени человека, а нейтрализация токсинов подтвердила функциональность трансплантата. Процесс подкожной имплантации безопаснее и проще, чем трансплантация печени, и может рассматриваться как промежуточный этап в операции по пересадке печени для пациентов вынужденных ожидать донорский орган.

Целлюлозный этанол. Состояние производства и перспективы его развития

Производство топливного этанола в мире на базе зерна кукурузы (США, Европа), сахарного тростника (Бразилия), пшеницы и сахарной свеклы (Ев-

ропа) достигло 100 млн. т/год. Почти весь бензин в США содержит 10% биоэтанола. Производство топливного этанола в США превысило 40 млн. т/год, и для его производства расходуется треть всего урожая кукурузы. За период 2004–2012 гг. построено более 200 крупных заводов – практически создана заново мощная промышленность. Правительством США планировалось к 2022 г. довести производство до 100 млн. т., и при этом предполагалось, что начиная с 2012 г. весь прирост будет осуществляться за счет непищевого сырья (лигноцеллюлозы). В качестве сырья предполагалось использовать кочерыжки и стебли кукурузы, пшеничную солому, отходы лесопроизводства (опилки, стружка и т.д.) Следует отметить, что планы по производству целлюлозного этанола реализовать не удалось из-за дорогостоящих и трудоемких процедур декомпозиции лигноцеллюлозного комплекса, гидролиза целлюлозы до сахаров и только затем ферментативного сбраживания сахаров в этаноле.

В последние 25 лет доминировала технологическая парадигма, заключающаяся в измельчении растительной биомассы, термообработки слабой кислотой и ферментативным осахариванием целлюлозы грибными целлюлазами. Для осуществления этих процессов, особенно производства ферментов, в промышленных масштабах, были задействованы силы многих исследовательских коллективов, затрачены огромные средства, исчисляемые в млрд. долл. США. Например, в 2007 г. Energy Bioscience Institute осуществлял работы по 75 проектам в области получения энергии из биомассы. Институт был создан как совместное предприятие фирмы British Petroleum (вклад в проект 500 млн. долл.) и университетов Беркли (Калифорния) и Урбан-Шампань (Иллинойс), правительственные дотации составили 125 млн. долл. За 10 лет работы таким фирмам, как Novozyme и Novo Nordisk, получившим значительные дотации, удалось удешевить производство целлюлозы в 40 раз.

Несмотря на оптимистические прогнозы ученых, образование нескольких венчурных компаний, государственные дотации и агрессивную рекламу, позиционирующую целлюлозный этанол как «биотопливо» 2-го поколения, до 2012 г. целлюлозный этанол в США не производился.

В 2012 г. компания Blue Sugar Corporation произвела 20000 галлонов (~80000 л) целлюлозного этанола. Однако в 2013 г. производство прекратилось, и компания в 2014 г. была признана банкротом.

В США сырьем для производства служат ко-черыжки и стебли кукурузы, в Европе – пшеничная солома, в Бразилии – багасса сахарного тростника. В 2014 г в США были введены в строй несколько заводов по производству целлюлозного этанола общей мощностью около 250 тыс. т/год (Abengoa, Du Pont, POET/DSM), тогда же в Италии начал давать продукцию завод мощностью около 50 тыс. т/год (Beta Reheveable). В Бразилии построены заводы фирмой Raizen.

Масштабный технологический анализ показал, что стоимость этанола, получаемого из ферментированной целлюлозы, на сегодняшний день достаточно высока. по сравнению с продуктом, получаемым из пищевого сырья. Производство не спасают даже правительственные дотации.

Высокая цена целлюлозного этанола связана с низким выходом целевого продукта, высокой стоимостью стадии предобработки целлюлозного сырья, низкой скоростью ферментативного гидролиза целлюлозы и очень высокими затратами на капитальное строительство заводов.

Цена ферментов составляет 0,4–0,45 долл/л. При этом следует отметить, что цена биоэтанола в 2014–2017 г. в США была около 0,43 долл. за литр, а в Европе – 0,5–0,55 долл/л. Капитальные затраты по введению в строй заводов в среднем составили 13,47 долл. за галлон. Капитальные затраты зависят от используемого сырья и способа ферментации. Самые высокие затраты на заводе фирмы Du Pont – 16,67 долл. за галлон, где используются в качестве сырья стебли кукурузы, а в качестве сбраживающих микроорганизмов – бактерии *Zymomonas mobilis*. В Бразилии самые низкие затраты при производстве этанола из багассы – 9,2 долл/галлон. В то же время капитальные затраты на биоэтанол из кукурузы не превышают 2,8 долл/галлон [3].

В 2014 г в США было произведено 728 тыс. галлонов целлюлозного этанола. В 2015–2016 гг. большинство заводов остановлено полностью. Хотя наблюдался рост производства (2015 г. – 2,2 млн. гал.; 2016 г. – 3,8 млн. гал.), в 2017 г. около 10 млн. галлонов составили менее 10% мощности и только около 1,8% – от производства биоэтанола из кукурузы [4]. Очевидно, что программа США по производству 60 млн. т целлюлозного этанола к 2022 г выполнена не будет. В Европе до 2019 г не планируется введение новых производственных мощностей для целлюлозного этанола.

Технологический прорыв в рамках господствующей парадигмы мало вероятен. При условии постепенного снижения себестоимости по-

лучаемого биоэтанола большой потенциал также представляет использование «консолидированных» процессов, где предобработка биомассы и ферментация совмещены в одном реакторе. Для таких процессов могут использоваться анаэробные термофильные бактерии, такие как *Clostridium thermocellum* или *Thermoanaerobacterium sacharolyticum*. Эти бактерии обладают мощным целлюлолитическим комплексом. Механизм его действия еще не до конца изучен, но предполагается, что бактериальные целлюлозы могут «расплетать» с концов сплетенные целлюлозные микрофибриллы. Эти бактерии устойчивы в процессе измельчения биомассы, например в шаровой мельнице. Дрожжи такой обработки не выдерживают. Дикие представители *Clostridium* при ферментации на сахарах синтезируют в основном органические кислоты и лишь небольшое количество этанола. Были проведены работы по реконструкции метаболизма и получен штамм *T. sacharolyticum*, осуществляющий конверсию сахаров в этанол с выходом 0,46 г/л сахаров и конечной концентрацией в 70 г/л. Эти параметры близки к ферментации сахаров дрожжами.

Новая технология находится в начальной стадии разработки, но дает надежду на принципиальное удешевление процесса [3].

Осахаривание лигноцеллюлозы остается сложной задачей, которая, несмотря на усилия многих поколений ученых и инженеров, не находит решения уже более чем 100 лет. Современное состояние технологий производства целлюлозного этанола не внушает оптимизма по поводу его влияния в ближайшие 5–7 лет на рынок биотоплива. Вместе с тем для экологически значимой области исследований, связанной с производством целлюлозного этанола поддержка научных и технических инновационных решений особенно перспективна. На поддержку исследований и производства целлюлозного этанола направлена политика Евросоюза, сформированная в плане REDII на период 2021–2030 гг. [5].

Новости CRISPR/Cas технологий

«Патентная война». в области научных исследований и коммерциализации технологий редактирования геномов на базе технологии CRISPR/Cas продолжается. В июне 2018 г. патентное ведомство США выдало два патента, касающихся CRISPR/Cas технологий: ученым из университета Беркли Калифорния и их коллегам из университета Вены (патент US 99904834

и US10000772). Первый патент относился к модификации однонитевой нуклеиновой кислоты и затрагивал узкую область CRISPR/Cas-технологий и, вероятно, не сильно повлиял на патентную ситуацию. Второй патент (US10000772) описывал оптимизацию направляющей РНК (gRNA) и, по всей видимости, мог бы иметь большое значение. В использовании патентов заинтересованы компании, основанные Калифорнийским университетом Intellia Therapeutics, CRISPR Therapeutics, Caribon Biosciences [6].

В сентябре 2018 г. опубликована патентная заявка тех же авторов из университета Беркли Калифорния и университета Вены (20180251795) «Method and composition for RNA – directed target DNA modification...». Пока не ясно, смогут ли эти патенты оспорить права на CRISPR-технологии, запатентованную институтом Broad при Гарвардском университете и Массачусетским институтом технологии (ИМТ).

Технология редактирования геномов с большим успехом используется при создании новых сортов культурных растений. Заметный успех сопутствовал группе ученых из Шанхая (Центр биологии стрессов растений и Центр молекулярной биологии растений) совместно с учеными из университета Пардю (США), которые создали сорт риса, показавший повышение урожайности на 25~30% [7].

Ученые провели множественные мутации (в 13 генах), связанных с мишенями действия фитогормона – абцизовой кислоты. Этот фитогормон с одной стороны, активирует гены, защищающие растения от стресса, с другой – замедляет рост растений. Ученым удалось усилить рост и урожайность, почти не снизив устойчивость растения (риса) к стрессам.

Не так успешно развиваются исследования по применению CRISPR-технологии в медицине. В недавно опубликованной в журнале «Nature Biotechnology» работе Казицкого с соавт. [8] показано, что в окрестностях сайта атаки CRISPR нуклеазой Cas9 могут происходить крупные геномные перестройки (размером в тысячи пн). До сих пор под пристальным вниманием ученых находились последовательности, прилегающие к целевым (on-target) и нецелевым (off-target) сайтам, и было сделано заключение о достаточной специфичности CRISPR-системы. Авторы, используя протяженные секвенирование и PCR-генотипирование, показали наличие больших геномных перестроек на достаточно удаленном расстоянии от сайта атаки нуклеазой. Опыты проводились на

стволовых эмбриональных клетках мыши и дифференцированных человеческих линиях клеток. Очевидно, что наблюдаемые перестройки могут иметь патогенные последствия.

Прогресс в использовании CRISPR/Cas в генотерапии не достиг клинических испытаний, так как все еще есть сомнения в безопасности этого метода. FDA остановил первые клинические испытания (без серьезных объяснений), проводимые фирмой CRISPR Therapeutics по поводу лечения серповидной клеточной анемии. Предполагалось изолировать стволовые клетки у пациентов и затем использовать CRISPR для производства единичного генетического изменения, приводящего к повышению уровня фетального гемоглобина в эритроцитах [9]. Интерес бизнеса и грантодателей к разработке таких продуктов может сильно снизиться из-за фактического отсутствия у них краткосрочных коммерческих перспектив. Акции CRISPR Therapeutics уже упали на 19%.

Заявка на проведение испытаний по лечению рака (множественная меланома, саркома и меланома) в университете Пенсильвания все еще рассматривается FDA. На сегодняшний день Китай остается единственной страной, где проводятся клинические испытания.

Литературный источник

1. Agarwal N. et al. Biofabrication of autologous human hepatocytes for transplantation: How do we get there?// Gene Expr. 2018 Aug. 24 doi: 10.3727/105221618x153503664478989
2. Rashidi H., Lun N.T., Alwahsh S.M. et al. 3D human liver tissue from pluripotent stem cells displays stable phenotype in vitro and support compromised liver function in vivo// Arch. Toxicol., 2018, 92(10), 3117–3129.
3. Lynd L.R., Liang X., Biddy M.J., Allee A. et al. Cellulosic ethanol: status and innovation. Current Opinion Biotechnology, 2017, 45, 202–211
4. Rapier R. Cellulosic ethanol falling far short of the hype. <https://www.forbes.com>
5. Europa Biofuel Annual 2017. 6./21/2017 Gain Report Number NL 7015. Подготовлен B.Flech, S. Liebez, A.Rosett, одобрен S. Phillips
6. C. Hartson. *Nature Biotechnology*. 2018, 36, 673.
7. Mico C., Xiao L., Hua K. et al. Mutations in sulfamoyl of abscisic acid receptor genes promote rice growth and production. *PNAS*, 2018, doi 10.1073/pnas.1804774115
8. Kosicki M., Tomberg A., Bradley A. *Nature Biotechnology*, 2018, 36, 765–771.
9. [http://newatlas.com/us-crispr-trial-hold-fda\(54862](http://newatlas.com/us-crispr-trial-hold-fda(54862)

*Материалы рубрики подготовил
акад. В.Г. Дебабов*