

ОБЗОРЫ

DOI: 10.23868/201912026

ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ МИОДИСТРОФИИ ДЮШЕННАМ.И. Зайнитдинова¹, С.А. Смирнихина¹, А.В. Лавров¹, И.И. Еремин^{2,3}, А.А. Пулин^{3,4}¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия³ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия**GENE THERAPY APPROACHES TO THE DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY TREATMENT**M.I. Zaynitdinova¹, S.A. Smirnikhina¹, A.V. Lavrov¹, I.I. Eremin^{2,3}, A.A. Pulin^{3,4}¹ N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia² National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia³ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia⁴ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

e-mail: milyazayn@gmail.com

Миодистрофия Дюшенна (МДД) — распространенное наследственное заболевание, развивающееся вследствие мутации в гене *DMD*, кодирующем дистрофин. В настоящем обзоре рассмотрены основные экспериментальные терапевтические подходы, основанные на генной терапии. Вирусная доставка микро- и минидистрофина в мышечные клетки обладает неоспоримым преимуществом — независимостью от типа мутации в гене *DMD*, однако обеспечивает лишь временный эффект. При повышении уровня утrophина специфичность мутации также не имеет значения, однако данный белок не может полноценно заменить дистрофин. Препараты, способствующие чтению через стоп-кодон, отличаются низкой эффективностью и подходят лишь 10–15% пациентов с МДД. Принимая во внимание доминирующий тип мутации при МДД, самым многообещающим подходом для лечения является пропуск экзона, который подойдет 90% больных. Он может быть осуществлен как антисмысловыми олигонуклеотидами, так и с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. Наиболее перспективным подходом следует считать CRISPR/Cas9-опосредованный пропуск экзона, в связи с тем, что он позволяет внести необходимые изменения в геном с большой эффективностью в результате однократного применения.

Ключевые слова: миодистрофия Дюшенна, дистрофин, генная терапия, пропуск экзона, антисмысловый олигонуклеотид, CRISPR/Cas9.

Введение

Миодистрофия Дюшенна (МДД, OMIM#310200) — рецессивное X-сцепленное наследственное заболевание, проявляющееся поражением скелетной мускулатуры, гладкомышечной ткани, нервной, пищеварительной и выделительной систем, а также миокарда. Так как МДД является X-сцепленной патологией, ей страдают в большинстве случаев мужчины, которые являются гемизиготами по X-хромосоме. Носительницы женского пола не проявляют никаких признаков патологии, однако примерно 2,5–20% женщин-носителей могут иметь слабые симптомы заболевания, такие как повреждение мышц и нарушение сердечного ритма [1, 2]. Более тяжелые проявления можно выявить у девочек с синдромом Шерешевского-Тернера (кариотип 45, XO) [3].

МДД диагностируют в среднем у 1 из 3500 мальчиков. Клинические проявления МДД обычно регистрируют впервые к 3–5 годам жизни: отмечая слабость проксимальных мышц ног и таза, которая затем распространяется на руки, шею и другие области [4]. По мере прогрессирования болезни происходит гибель миоцитов, атрофия мышечных волокон, постепенное замещение мышечной ткани

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common genetic disease which develops as a result of a mutation in the gene encoding dystrophin. In this review, the main experimental therapeutic approaches based on gene therapy are described. Independence of the type of mutation in the *DMD* gene is an advantage of the viral delivery of micro- and minidystrophin in muscle cells, but this method provides only a temporary effect. The specificity of the mutation also does not matter with an increase in the level of utrophin, however, this protein cannot fully replace dystrophin. The drugs which promote reading through the stop codon have low efficiency and are suitable for only 10–15% of patients with DMD. The most promising approach for the treatment of DMD is the exon skipping, which will suit 90% of patients. It can be implemented by antisense oligonucleotides or using the CRISPR/Cas9 genome editing system. CRISPR/Cas9-mediated exon skipping is thought to be the most promising approach, because it allows to make the necessary changes in the genome with great efficiency after single application.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, dystrophin, gene therapy, exon skipping, antisense oligonucleotide, CRISPR/Cas9.

жировой и фиброзной тканью. Часто возникает и прогрессирует сколиоз. К 13 годам более 95% пациентов оказываются прикованными к инвалидному креслу [4]. Моторные нарушения у части больных сочетаются с психокогнитивными расстройствами [5], генез которых будет описан далее. Около 73% больных имеют различные проявления патологии сердца (тахикардия, аритмии), которые впервые диагностируют в возрасте 6–7 лет, а к 20 годам наблюдают у 95% больных. Недостаток дистрофина также является причиной развития кардиомиопатии. Прогрессирующая атрофия кардиомиоцитов и замещение их фиброзной тканью приводят к атрофии и фиброзу миокарда (особенно левого желудочка) [6]. Дыхательная недостаточность является самой распространенной причиной смерти пациентов с МДД [7] и развивается в результате ряда факторов: из-за слабости поперечно-полосатой мускулатуры возникает нарушение акта глотания, что ведет к периодической аспирации, гипоксемии и гиперкапнии, развитию ателектазов; формирование сколиоза в груднопоясничном отделе позвоночника вызывает снижение жизненной емкости легких и эпизоды апноэ [8]. В первом десятилетии жизни превалируют obstructивные

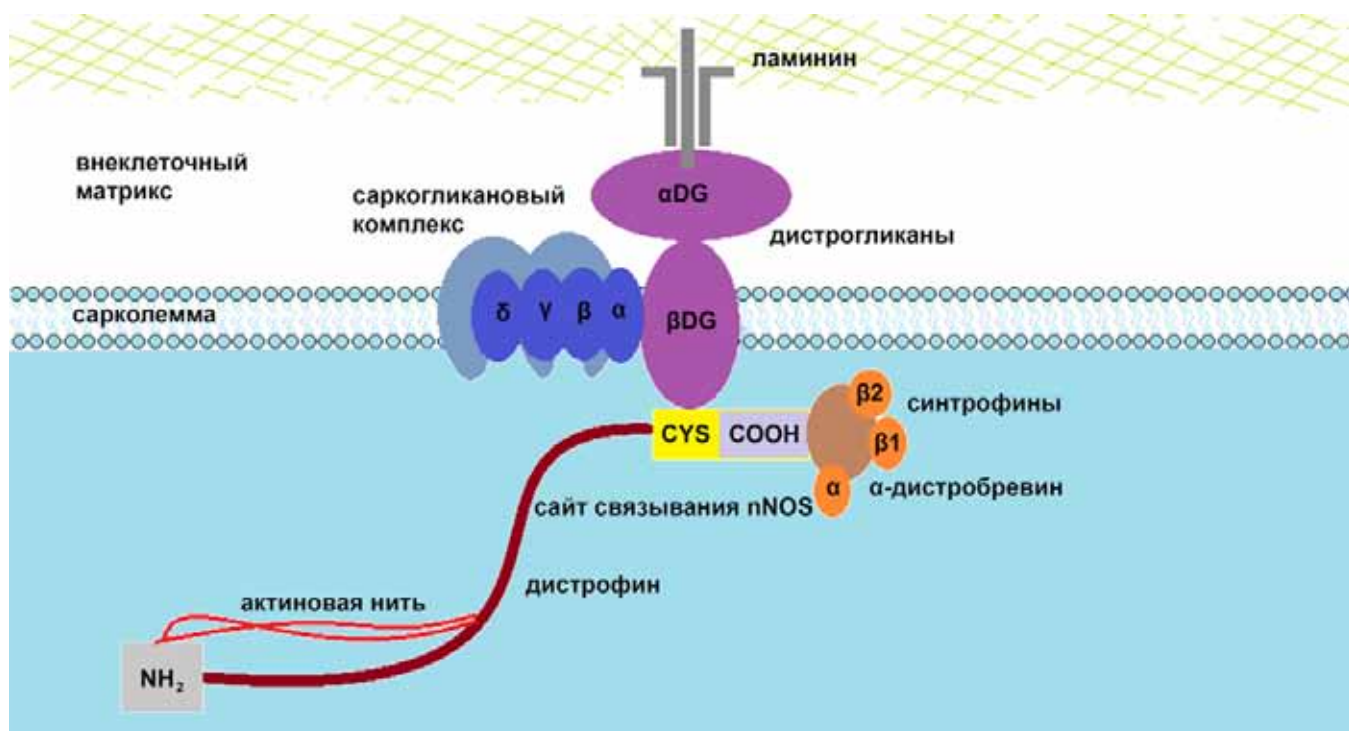


Рис. 1. Дистрифин-ассоциированный белковый комплекс: αDG, βDG — α, β — дистрогликаны; nNOS — синтаза окиси азота нейронального типа; CYS — цистеин богатый домен; COOH — С-концевой домен; NH₂ — N-концевой актин-связывающий домен (по [15] с изм.)

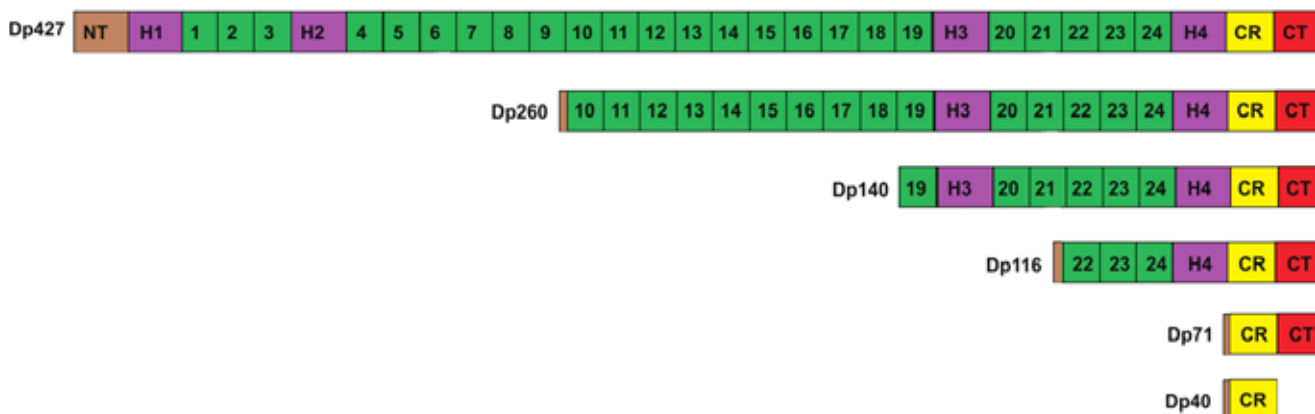


Рис. 2. Доменные структуры различных изоформ дистрифина: CR — цистеин-богатый домен; CT — С-концевой домен; NT — N-концевой домен; H1-H4 — шарнирные участки

нарушения, а во втором — гиповентиляция [9]. В 16–18 лет большинство пациентов часто болеет тяжелыми респираторными инфекциями, нередко с летальным исходом. Средняя продолжительность жизни пациентов составляет примерно 19 лет при отсутствии лечения, однако применение кортикостероидов, искусственная вентиляция легких во время сна, лечебная физкультура могут продлить жизнь до 30 лет [10, 11].

Патогенез МДД и ген дистрифина

Ген дистрифина (*DMD*) расположен на коротком плече хромосомы X и является одним из самых длинных в геноме человека (2,22 млн пар нуклеотидов), насчитывает 79 экзонов, а кодируемый им белок с молекулярным весом 427 кДа содержит около 3700 аминокислотных остатков [12]. Время синтеза мРНК дистрифина составляет около 16 ч. [13].

Дистрифин входит в состав костамера — белкового комплекса, отвечающего за соединение саркомеров,

плазматической мембраны мышечного волокна и белков внеклеточного матрикса [14] (рис. 1), соединяет синтазы окиси азота нейронального типа (nNOS) с сарколеммой через гликопротеиновый комплекс белков, что важно для регуляции притока крови к мышцам. Также члены гликопротеинового комплекса являются основными компонентами различных сигнальных путей [16].

Ген *DMD* имеет три основных промотора (M, B и P), которые инициируют транскрипцию полноразмерного дистрифина Dp427, другие промоторы ответственны за транскрипцию более мелких изоформ белка (рис. 2). С промотора M экспрессируется изоформа Dp427m (muscle), характерная для поперечно-полосатой скелетной и сердечной мускулатуры [17]; с промотора B — изоформа Dp427c (cortex), которая экспрессируется в нейронах коры головного мозга [18]; с промотора P — изоформы Dp427p1 и Dp427p2 (Purkinje), которые экспрессируются в клетках Пуркинью головного



Рис. 4. Доменные структуры дистрофина, мини- и микродистрофина. Дистрофин содержит 4 структурных домена: NT — N-концевой актин-связывающий домен; центральный домен, содержащий 24 спектриноподобных повтора (1–24) и 4 «шарнирных» участка (H1–H4); CR — цистеин-богатый домен, связывающий β -дистрогликан; CT — C-концевой домен, связывающий дистробревины и синтрофины; AB — актин-связывающий домен; nNOS — синтетаза окиси азота нейронального типа; DG — дистрогликан; Dbr — дистробревин; Syn — синтрофин

Знание молекулярно-генетических причин и патогенеза этих двух наследственных форм нарушения дистрофина является основой генной терапии МДД: необязательно исправлять мутацию, приводящую к заболеванию, или добавлять нормальную копию гена *DMD*, достаточно восстановить рамку считывания и даже в случае утраты некоторых экзонов, получить укороченный, но функционирующий дистрофин, что существенно улучшит прогноз у таких пациентов. Есть основания предполагать, что даже низкая экспрессия дистрофина (4–15% от нормы) существенно улучшит состояние пациентов. [39, 40].

Оценки распространенности различных типов мутаций различаются, но последние сообщения показывают, что 69% пациентов с МДД имеют крупные делеции, 11% — крупные дупликации, 10% — нонсенс-мутации, 7% — миссенс-мутации или инделы, а 3% — интронные или другие мутации [41]. Было обнаружено, что чаще всего делеции происходят в локусах, затрагивающих экзоны со 2 по 20 и с 45 по 55 [41].

Генно-терапевтические подходы к лечению МДД

Сверхэкспрессия дистрофина

Применяемое в настоящее время противоречивое лечение кортикостероидами позволяет замедлить развитие болезни, однако не отличается высокой эффективностью и сопряжено с побочными эффектами [42, 43]. Этиотропное лечение всегда является предпочтительным, так как устраняет причину заболевания, в данном случае — мутацию в гене *DMD*. Один из подходов терапии — восстановление экспрессии дистрофина. При помощи классической генной терапии можно восстановить экспрессию дистрофина путем доставки кодирующей последовательности гена *DMD* в мышечные клетки. Чаще всего для этих целей используют вирусные векторы, а ген может быть как полным, так и с уменьшенной кодирующей последовательностью. Благодаря многочисленным работам по оптимизации размеров мини- и микродистрофина стало ясно, что особо важными участками являются актин-связывающий, цистеин-богатый и C-концевой домены [44, 45] (рис. 4).

С целью разработки терапии МДД в мире было проведено много исследований с использованием ленти- [46–48], адено- [49–51], аденоассоциированного (AAB) [52–56] вирусов, а также искусственных хромосомных векторов [57, 58]. Любой из вирусных векторов может вызвать развитие иммунного ответа в организме, проявляющегося повышением уровня печеночных трансаминаз, интерлейкинов, а также гриппоподобными симптомами, особенно в случае повторных

введений [59, 60]. Несмотря на относительно большую емкость ленти- и аденовирусов, эти векторы редко используют в экспериментах из-за описанных выше иммунных реакций, токсичности [61] и инсерционного мутагенеза [62]. Искусственные хромосомы — это сложные и крупные конструкции, являющиеся, по сути, микрохромосомами. Они относительно стабильны, не интегрируются в геном и при этом обладают большой емкостью, однако из-за значительных размеров ими гораздо труднее трансфицировать клетки [63].

AAB — семейство непатогенных однопочечных ДНК-вирусов нескольких серотипов со специфическим клеточным тропизмом, на основе которых с помощью генной инженерии созданы AAB векторы. Например, AAB2 имеет одинаковую умеренную эффективность трансдукции в клетки печени, легких, скелетных мышц и ЦНС, в то время как AAB9 имеет тропность к такому же широкому спектру тканей, однако трансдуцирует клетки с большей эффективностью [64]. Известно, что AAB2, AAB8 и AAB9 являются наиболее эффективными серотипами для трансдукции кардиомиоцитов, гладких миоцитов и клеток скелетной мышечной ткани [64], следовательно, подходят для использования в терапии МДД. AAB векторы отличаются высокой безопасностью по сравнению с адено- и лентивирусами (за счет минимальных иммунных реакций и отсутствия инсерционного мутагенеза) и эффективностью трансдукции поперечно-полосатой мускулатуры [65].

Опубликованные в литературе результаты исследований свидетельствуют о вариабельном иммунном ответе на AAB векторы у разных животных — описаны низкая иммуногенность у мышей и сильные иммунные реакции у собак. Вероятной причиной иммунных реакций может быть высокая экспрессия трансгена, доставляемого AAB2 вектором у собак [53]. Однако в дальнейшем авторы этой работы показали, что иммуногенность зависит также от используемого серотипа вируса и способа введения [54]. Для векторов на основе AAB8 и AAB9 характерна сниженная по сравнению с AAB2 активация Т-лимфоцитов, особенно при их введении новорожденным здоровым щенкам [66]. При внутримышечном и внутривенном введении трансгенного микродистрофина, включенного в эти векторы, продемонстрирована высокая экспрессия в кардиомиоцитах и клетках скелетной мышечной ткани собак с МДД [54].

Основным недостатком AAB является низкая пакующая емкость вектора, то есть максимальный размер гена, который можно клонировать в вектор, не превышает 4,7 Кб [66], в то время как длина кДНК дистрофина составляет 14 кб. Показано, что для

полноценной работы дистрофина важны N-концевые актин-связывающие и богатые цистеином домены, в то время как домены в центре белка являются необязательными [67]. Данные о роли структурных доменов дистрофина позволили разработать высокофункциональные мини- и микродистрофины, размер которых позволяет клонировать их практически во все известные типы векторов (рис. 4).

Несмотря на то, что размер минидистрофина не позволяет использовать его в составе AAV вектора, в последние годы появились методы, основанные на двойных и тройных системах AAV-доставки, которые в перспективе можно будет применять при разработке терапии МДД [68]. В этом случае в разные AAV клонируют две части гена *DMD* с перекрытием в области центрального домена, и в результате гомологичной рекомбинации, конкатамеризации и т.п. получают ген полного мини-дистрофина. В экспериментах на 12-мес. собаках с МДД показано значительное уменьшение патологических изменений в мышцах и сохранение их мышечной силы после нагрузки при внутримышечном введении этих конструкций [69]. Есть примеры AAV доставки полного гена дистрофина с помощью «тройного» метода [70]. Кроме того, существует метод сборки крупных белков, основанный на использовании интеинов [71], позволяющий разделить большой ген на две части и поместить его в два отдельных вектора с частями интеина. В клетке обе кассеты экспрессируются и интеин собирается из двух доменов, после чего самостоятельно вырезается из белка, что приводит к сборке крупного белка, например, дистрофина [72]. Эффективность транс-сплайсинга с помощью интеинов невысока, однако есть положительные примеры применения такого подхода для CRISPR-опосредованной вставки различных фрагментов ДНК в составе AAV вектора в мозг здоровой мыши [73].

Во время 1/2а фазы клинического исследования микродистрофин в составе вектора AAVrh74 доставляли внутривенно 4 мальчикам с МДД (NCT03375164). Промотор MCK7 в векторе обеспечивал тканеспецифичную (только в поперечно-полосатой скелетной мускулатуре) экспрессию микродистрофина. В промежуточных результатах при биопсии мышц было показано, что синтез микродистрофина до 38–53% от нормы наблюдали в 81,2% мышечных волокон. Было зарегистрировано снижение уровня фермента креатинкиназы в крови более чем на 78% от исходного уровня через 2 мес. лечения. Участники показали улучшение по всем 4 функциональным параметрам, оцениваемым в исследовании: амбулаторная оценка NSAA (17-балльная рейтинговая шкала, которая используется для измерения функциональных двигательных способностей у детей с ДМД), время подъема, тест восхождения на 4 ступеньки и 100-метровый тест на время. Средний показатель NSAA улучшился на 6,5 баллов по сравнению с исходным уровнем в первые 90 сут. [74].

Основываясь на многообещающих результатах экспериментов у собак с мышечной дистрофией (модель GRMD) [75], несколько конструкций находятся на разных фазах клинических исследований (NCT00428935, NCT03362502).

Таким образом, AAV вектор является наиболее подходящим для доставки полноразмерного гена *DMD* или его коротких вариантов в кардиомиоциты, гладкие миоциты и клетки скелетной мышечной ткани, а совершенствующиеся ежегодно подходы по AAV доставке позволяют надеяться на скорую разработку безопасной и эффективной технологии лечения МДД.

Суррогатная генная терапия

Ряд генов могут служить суррогатами (то есть частично заменять) дистрофина, защищая скелетные миофибриллы от повреждения. Одним из таких генов является *UTRN*, который на 80% гомологичен гену *DMD* и кодирует белок утрофин [76, 77]. Утрофин, схожий по структуре и функциям с дистрофином, функционирует только во внутриутробном периоде и к моменту рождения заменяется на дистрофин, в клетках остаётся только небольшая часть белка. Эксперименты на лабораторных мышах *mdx* (мышь с нонсенс-мутацией в экзоне 23 гена *Dmd*) показали, что утрофин может частично функционально заменять дистрофин [78, 79] и увеличение концентрации утрофина во всех тканях мышей *mdx* не является токсичным [80]. Однако утрофин не может обеспечить соединение синтетазы окиси азота нейронального типа (nNOS) с сарколеммой через гликопротеиновый комплекс белков, что важно для регуляции притока крови к мышцам (рис. 1). Также известно, что утрофин, в отличие от дистрофина, не участвует в организации микротрубочек [81].

Были идентифицированы две полноразмерные изоформы утрофина: утрофин А экспрессируется в волокнах скелетных мышц и представляет больший интерес для использования в лечении МДД, чем утрофин В, находящийся в эндотелии сосудов [82]. Уровень утрофина в клетках можно увеличить AAV-опосредованной доставкой гена утрофина, микрорутрофина [83] или активацией транскрипции [84]. Изучение механизма транскрипционного контроля утрофина выявило новые мишени для фармакологического воздействия [85]. В частности, описание промотора утрофина-А инициировало поиск малых молекул, которые могут стимулировать транскрипцию гена. Высокопроизводительный скрининг позволил идентифицировать ряд малых молекул — BMN195, SMT C1100, которые сейчас изучают на ранних стадиях клинических исследований (NCT02383511, NCT02056808, NCT02858362).

В первой фазе клинических исследований (NCT02383511) препарата эзутромид (SMT C1100, Summit PLC, Великобритания), являющегося модулятором утрофина за счет активации промотора гена *UTRN* [83], были продемонстрированы безопасность и хорошая переносимость препарата во всех исследуемых дозах. Было зарегистрировано снижение уровня фермента креатинкиназы в крови, что свидетельствует о повреждении мышц [86]. Однако в 1b фазе плацебо-контролируемого клинического исследования не было обнаружено изменения уровня креатинкиназы по сравнению с группой плацебо [87].

Ген *GALGT2* также является суррогатом дистрофина, кодирует β -1,4-N-ацетилгалактозаминилтрансферазу (GalNAc), сверхэкспрессия которого индуцирует экспрессию утрофина, ламинина, а также вызывает гликозилирование α -дистрогликана, что повышает устойчивость сарколеммы к повреждениям [88]. В эксперименте с трансгенными мышцами сверхэкспрессия *Galgt2* приводила к увеличению синтеза утрофина до 538% от нормы и саркогликана до 660% от нормы [89]. При AAVrh74-опосредованной доставке гена *Galgt2* мышам *mdx* было показано, что чрезмерная экспрессия *Galgt2* обеспечивала значительную устойчивость к травмам мышц [90, 91].

Основной задачей клинического исследования 1/2а фазы (NCT03333590) rAAVrh74.MCK.GALGT2 является оценка безопасности внутриартериального введения вирусного вектора AAVrh74, кодирующего ген *GALGT2* (с ткане-специфическим промотором MCK). Клиническое

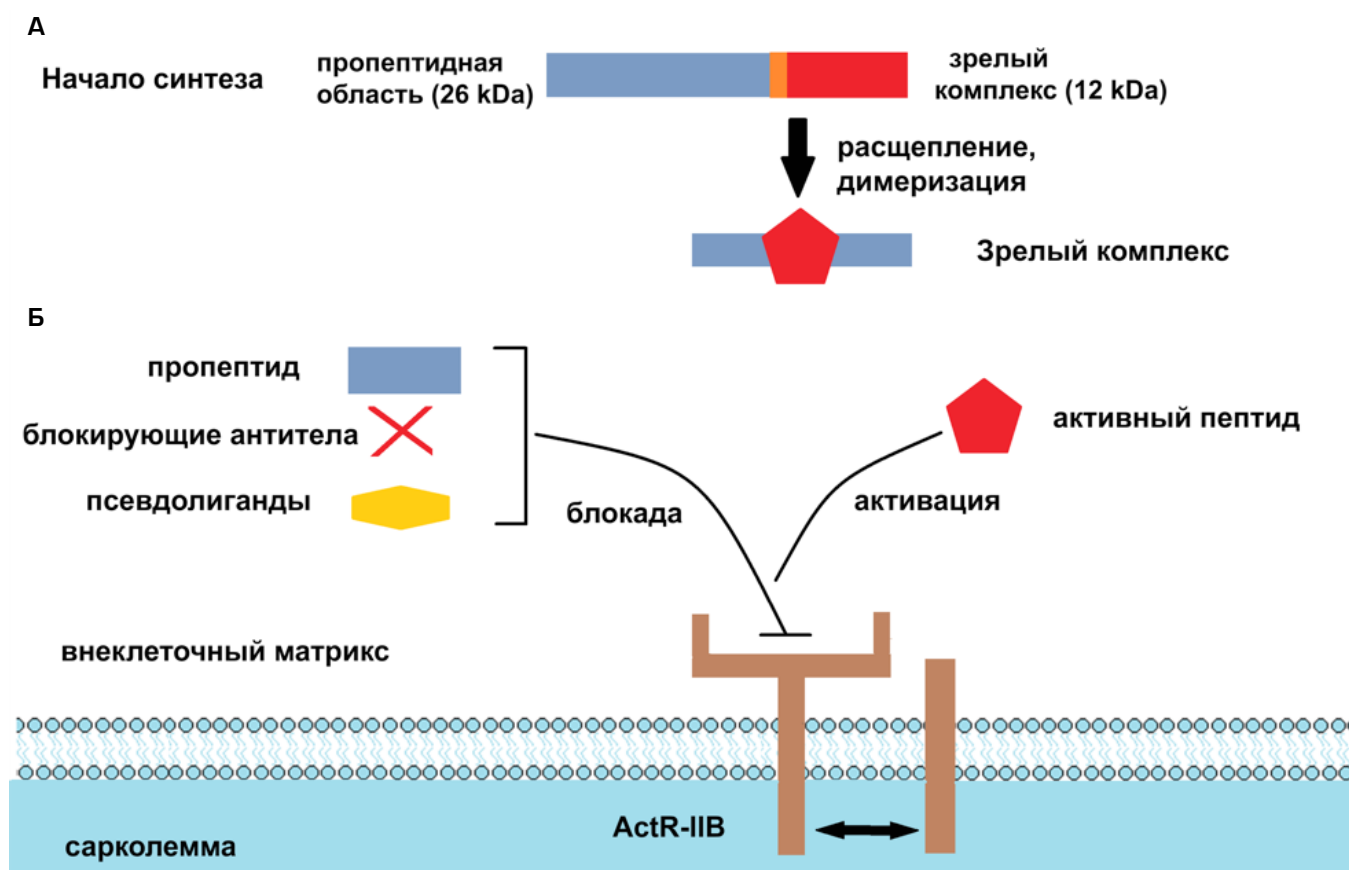


Рис. 5. Миостатин и схема ингибирования миостатина: А — миостатин; Б — схема ингибирования миостатина (по [78] с изм.); ActR-IIIB — рецептор активина типа IIB

исследование аналогичного вектора для внутримышечного введения было отменено (NCT02704325).

Миостатин (надсемейство трансформирующих факторов роста) — белок, подавляющий рабдомиогенез. Известно, что при нокауте гена *MSTN*, кодирующего миостатин, вес животных при рождении несколько меньше среднего, но к моменту полового созревания они вдвое превосходят по массе особей дикого типа, что установлено при изучении лабораторных грызунов, гончих собак, коров и овец [92]. Миостатин состоит из ингибирующей N-концевой пропептидной области, небольшого инвариантного сайта расщепления и области, кодирующей активный (зрелый) пептид. Активная молекула появляется в результате протеолитического расщепления и димеризации, однако миостатин остается неактивным из-за образования комплекса с пропептидом (рис. 5А). В норме после связывания с рецептором происходит диссоциация комплекса и образование активной формы миостатина. Зрелый пептид миостатина активирует рецептор активина типа IIB (ActR-IIIB) и инициирует сигнальный каскад, который в конечном итоге приводит к изменениям в транскрипции специфических для мышц генов, ингибирующих рост миоцитов (рис. 5Б).

Биофармацевтические стратегии использования ингибиторов миостатина связаны с применением нейтрализующих моноклональных антител как к самому миостатину (например, молекула MYO-029/Stamulumab, Wyeth Pharmaceuticals, США), так и к его рецептору (молекула BYM-338/Bimagrumab, Novartis, Швейцария), а также за счет растворимых рецепторов к миостатину (молекула ACE-031, Acceleron Pharma, США). В экспериментах с мышами mdx антитела к миостатину вызвали 30% увеличение мышечной массы за 3 мес. [93], однако

во время двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования молекула MYO-029 была признана безопасной, но не приводила к улучшению сокращения мышц или замедлению прогрессирования болезни [94]. Молекула ACE-031 оказалась эффективным ингибитором миостатина даже у здоровых мышей, при внутримышечном введении ACE-031 мышечная масса увеличивалась до 46%, по сравнению с контрольной группой [95], однако клинические исследования с этим соединением были остановлены из-за побочных эффектов в виде носовых кровотечений и кровоточивости десен, которые, возможно, развиваются в результате связывания ActRIIB с лигандами, участвующими в ангиогенезе, что приводит к ингибированию последнего [96].

Еще одним способом ингибирования активности миостатина является нокаунт гена с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) [97] или малых РНК, образующих шпильки (шпильчатая РНК, shRNA) [98]. Было показано, что при введении *Mst-shRNA* в переднюю большеберцовую мышцу здоровых крыс, экспрессия миостатина снижалась на 27% от исходного значения и мышечная масса увеличивалась на 10% [98]. Однако исследования по нокаунту миостатина на животных с МДД на сегодняшний день еще не проводились.

Чтение через стоп-кодон

Приблизительно 10–15% МДД вызваны точечными мутациями, приводящими к образованию преждевременного стоп-кодона. Стоп-кодоны, в свою очередь, вызывают преждевременную остановку синтеза белка дистрофина и в результате происходит синтез усеченного нефункционального белка [99]. Кроме того, мРНК при таких мутациях претерпевает нонсенс-опосредованный распад. Было показано, что аминокислотидные

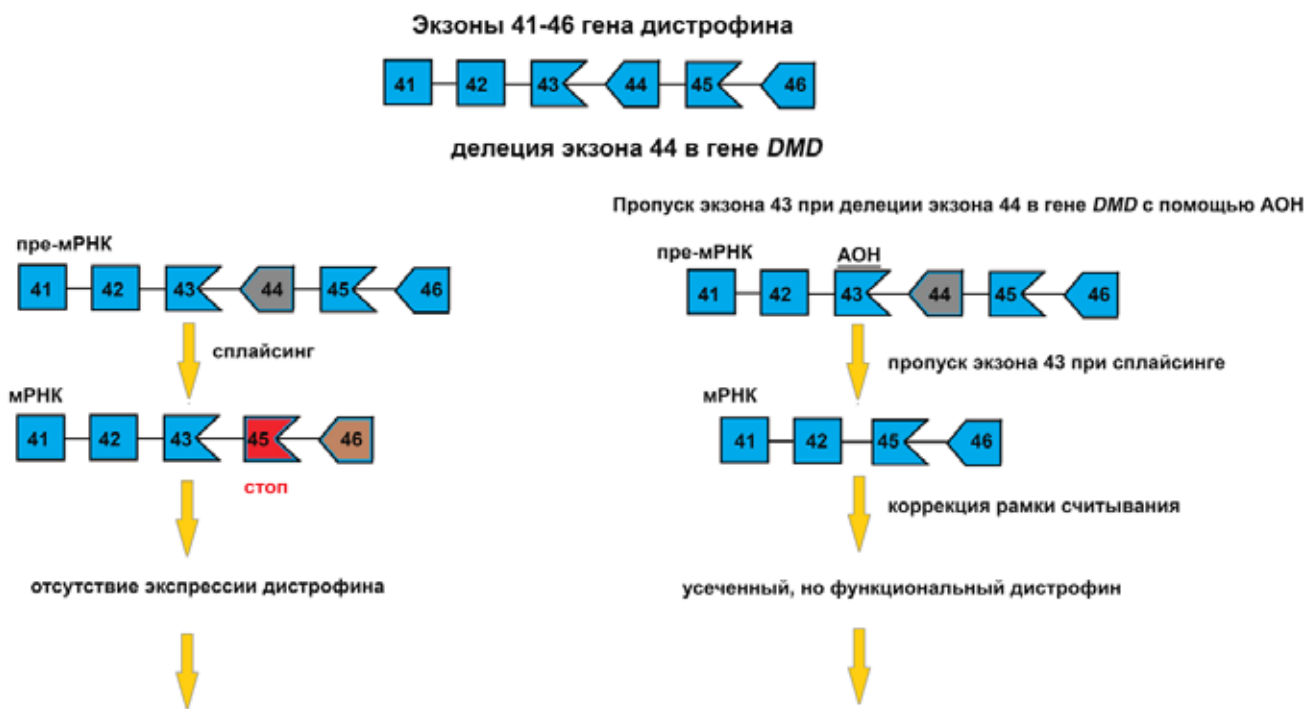


Рис. 6. Схема пропуска экзона 43 с помощью антисмысловых олигонуклеотидов: АОН — антисмысловый олигонуклеотид; изогнутые грани указывают на то, что экзон начинается или заканчивается неполным триплетом и для кодирования полного кодона необходим предшествующий или последующий экзон (пример: экзоны 43–46)

антибиотики могут способствовать чтению через стоп-кодон [100, 101].

По результатам исследований *in vitro* и на мышах *mdx in vivo* с нонсенс-мутацией в экзоне 23 обнаружили, что введение гентамицина восстанавливает экспрессию дистрофина до 20% от нормы в скелетных мышцах [102]. Однако в клинических исследованиях, кроме повышения уровня экспрессии дистрофина у пациентов [103], был выявлен побочный эффектом гентамицина — его нефро- и ототоксичность [104].

Аталурен (Translarna, PTC Therapeutics, США) — препарат, разработанный для пропуска преждевременных стоп-кодонов, имеет меньшую токсичность, чем гентамицин. Аталурен связывается с рибосомной РНК и ухудшает распознавание преждевременного стоп-кодона, что позволяет восстановить трансляцию и синтез модифицированного дистрофина. Во время фазы 2А клинического исследования (NCT00264888) было показано, что препарат безопасен и хорошо переносится [105]. Во время рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования в фазе 3 (NCT01826487) [106] было выявлено, что препарат не улучшает физические показатели пациентов по сравнению с группой плацебо, однако способствует замедлению развития болезни, в результате чего аталурен получил условное одобрение Европейского агентства по лекарственным средствам с августа 2014 г. В то же время, FDA (Food and Drug Administration) пока не одобрил аталурен для лечения МДД в силу отсутствия доказанной эффективности препарата. Компании рекомендовано провести дополнительные проспективные исследования аталурена для доказательства эффективности препарата у больных МДД [107]. В настоящее время аталурен доступен в Европе для лечения пациентов в возрасте от 2 лет с нонсенс-мутациями в гене *DMD*, тогда как в США аталурен все еще находится на стадии клинических исследований в фазах 2 и 3. Антибиотик сульфат арбекацина (NPC-14) имеет такой же механизм

действия, как и аталурен, и сейчас находится на стадии клинических исследований в фазе 2 (NCT01918384) в Японии [108].

Пропуск экзонов

Так как большинство случаев МДД связаны с делециями и дупликациями, нарушающими рамку считывания, то основной разрабатываемой стратегией терапии является пропуск экзона, содержащего мутацию, или соседних экзонов, что приводит к восстановлению рамки считывания и возобновлению экспрессии укороченного дистрофина. При наличии сдвигающей рамку считывания делеции или нонсенс-мутации с помощью исключения одного или нескольких экзонов можно добиться того, чтобы вся последующая часть гена транслировалась в правильной рамке [109]. Трансляция неполного, но сохраняющего хотя бы частичную функциональность белка, может значительно улучшить состояние пациентов с МДД, особенно если лечение было начато в раннем возрасте [110]. Восстановление экспрессии частично функционального дистрофина может преобразовать МДД с тяжелым фенотипическим проявлением в МДБ. Таким образом, стратегии пропуска экзона давно привлекли внимание в качестве потенциальной терапии при МДД [111–113]. Данный метод лечения может помочь большинству пациентов с МДД. Исключения будут составлять делеции, разрушающие актин-связывающие домены в N-концевой области или затрагивающие первый или последний экзоны и крупные хромосомные перестройки. Однако вышеперечисленные мутации достаточно редки и вместе составляют менее 10% от всех описанных мутаций в гене *DMD*. Таким образом, экспрессию функционального или частично функционального белка можно восстановить при помощи пропуска экзонов теоретически примерно у 90% пациентов с МДД [114, 115].

В настоящее время проводятся исследования по пропуску экзона с помощью антисмысловых

олигонуклеотидов (АОН) и системы редактирования CRISPR/Cas9 [116, 117].

АОН являются химически синтезированными короткими (~20–30 оснований) нуклеиновыми кислотами, которые предназначены для связывания с комплементарными последовательностями пре-мРНК [118]. С помощью АОН можно исключить некоторые экзоны из зрелой мРНК в ходе сплайсинга за счет стерических помех в работе сплайсеосомы (рис. 6). 2'-О-метил измененные олигомеры на фосфоротиоатной основе (2'-OMeAO) и фосфородиамидат морфолино олигомеры (ФМО) чаще всего используют в связи с их безопасностью и эффективностью относительно других соединений-аналогов [119, 120].

Доклинические исследования с АОН проводили на мышах *mdx* [121], *mdx52* (мыши с делецией экзона 52 в гене *Dmd*) [122] и собаках [123]. Было показано, что пропуск экзона с помощью АОН восстанавливает экспрессию дистрофина до 26% от нормы в клетках скелетных мышц всего тела и улучшает сократимость мышц [122, 123]. Однако восстановление экспрессии дистрофина в кардиомиоцитах не было выявлено [114] или было обнаружено лишь в единичных клетках [123]. Для повышения эффективности АОН в кардиомиоцитах тестируют новые виды ФМО [124].

На сегодняшний день были изучены несколько конструкций АОН в клинических исследованиях [125, 126], однако было показано, что исследуемые препараты в дозировке 2–30 мкг/кг в неделю неэффективны [125], поэтому начали проводить клинические исследования с этими же АОН, используя более высокие дозы препарата: 30–80 мкг/кг в неделю. Стратегия пропуска экзона 51 подходит для лечения 13% больных МДД. АОН, подобранный к экзону 51 — этеплирсен (Exondys 51, Sarepta Therapeutics, США) — может увеличить синтез дистрофина до 0,22–0,32% от нормы через 1 год лечения [127–129]. Препарат был одобрен FDA в 2016 г. в рамках ускоренной процедуры [130].

Следует отметить, что одобрение FDA пока предварительное и на сегодняшний день все еще проводятся клинические исследования, чтобы дополнительно подтвердить эффективность и безопасность препарата при лечении больных детей в возрасте 6–48 недель с дозировкой больше 30 мкг/кг в неделю. Основными недостатками данного подхода являются временный характер изменений, что требует еженедельного внутривенного введения препарата, а также его стоимость — в среднем 892 000 американских долларов в год на 1 пациента [131]. Компания Sarepta Therapeutics (США) также разработала препарат голодирсен (SRP-4053), подобранный к экзону 53, однако в августе 2019 г. FDA не одобрило голодирсен из-за опасений нефротоксичности и риска инфицирования инфузионных портов. Нефротоксичность голодирсена была выявлена лишь во время доклинических исследований и в настоящее время компания Sarepta Therapeutics рекомендовано провести дополнительные исследования для доказательства безопасности препарата.

В экспериментах на моделях мышей и собак с МДД положительный эффект от пропуска экзона с помощью АОН длится 2–3 мес., что требует повторного введения препарата. В разных мышечных тканях наблюдается разная эффективность: в поперечно-полосатой сердечной мышечной ткани экспрессия дистрофина гораздо ниже, чем в скелетной, однако у мышей *mdx* даже низкая экспрессия дистрофина в кардиомиоцитах (3–5% от нормы) может задерживать развитие сердечной недостаточности [132, 133].

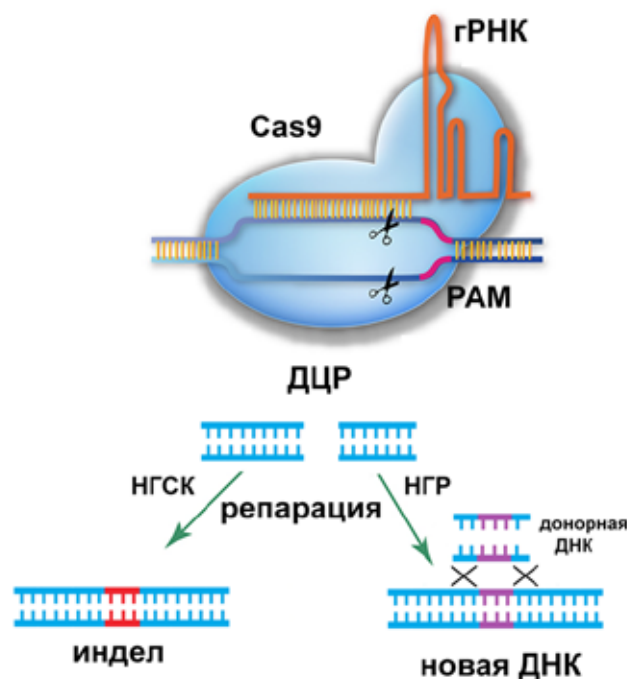


Рис. 7. Система CRISPR/Cas9: гРНК — гидовая РНК; ДЦР — двуцепочечный разрыв; НГСК — негомологичное соединение концов; НГР — направленная гомологичная репарация; PAM — нуклеотидный мотив перед протоспейсером (по [134] с изм.)

Пропуск экзона также можно осуществить при помощи системы CRISPR/Cas9. Эта методика геномного редактирования состоит из двух основных компонентов: гидовой РНК (гРНК), необходимой для распознавания и связывания с целевой последовательностью ДНК, и белка Cas9, который обладает нуклеазной активностью и способен создать двуцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК в месте связывания гРНК с ДНК. При наличии донорной ДНК репарация ДЦР осуществляется с помощью направленной гомологичной репарации (НГР) или негомологичного соединения концов (НГСК), при отсутствии — только с помощью НГСК (рис. 7, [134] с изм.) [135].

С помощью системы CRISPR/Cas9 и НГСК можно восстановить рамку считывания тремя способами (рис. 8).

После отработки условий пропуска экзона системой CRISPR/Cas9 *in vitro*, исследования *in vivo* продолжали, в основном, на мышах *mdx*. Для доставки компонентов системы обычно использовали векторы AAV8 или AAV9. В экспериментах пропуск экзона 23 при эффективности редактирования ~2% приводил к восстановлению синтеза дистрофина до 8% от нормы [136] или в зависимости от метода доставки: до 23,7±11,6% (внутрибрюшинно), 27,7±6,6% (ретроорбитально), 53,2±18,5% (внутримышечно) в миоцитах и до 52,4±14,3% (внутрибрюшинно), 71,1±21,0% (ретроорбитально), 69,7±19,8% (внутримышечно) в кардиомиоцитах [137]. Делеция экзона 44, которая встречается у 12% пациентов с МДД, вызывает сплайсинг экзонов 43 и 45 и приводит к образованию преждевременного стоп-кодона. При удалении экзона 43 или 45 открытая рамка считывания восстанавливается. При проведении эксперимента у мышей с делецией экзона 44 и в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) от пациентов с МДД удалось повысить синтез дистрофина примерно в 10 раз — до 94% от нормального уровня [138]. Эксперименты по пропуску сразу нескольких экзонов, а именно 45–55 [139], 21–23 [140], 52–53 [141]

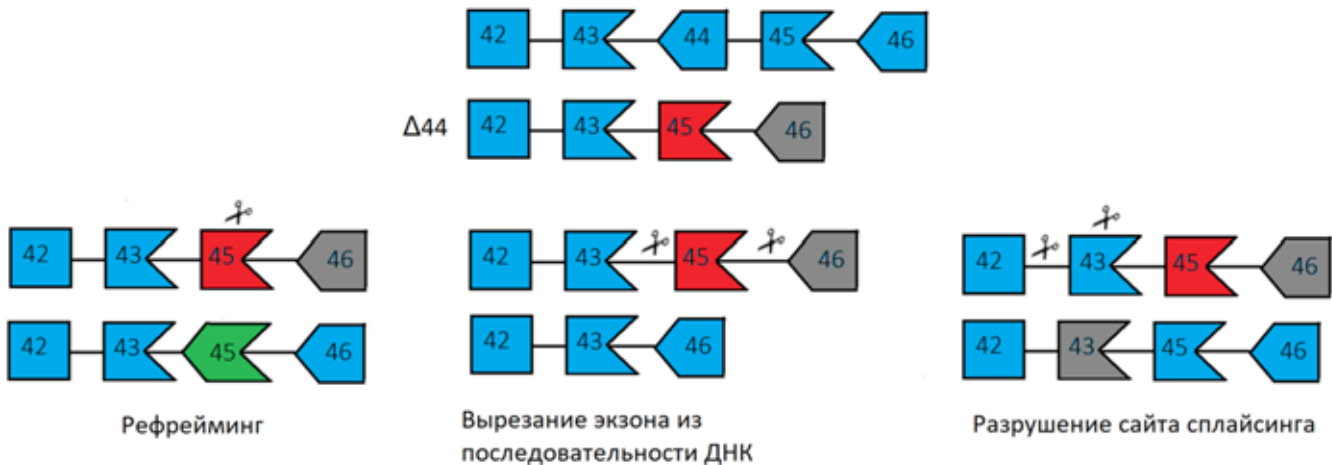


Рис. 8. Механизмы восстановления рамки считывания с помощью системы CRISPR/Cas9: делеция экзона 44 приводит к преждевременному стоп-кодону; редактирование системой CRISPR/Cas9 может привести к рефреймингу (случайный индел в месте стоп-кодона), вырезанию экзона из последовательности ДНК или разрушению сайта сплайсинга, в зависимости от сайта мишени для гРНК (ножницы) и количества гРНК, используемых в лечении

у мышей с МДД, также были успешными. Например, при пропуске экзонов 21–23 у мышей *mdx* при помощи аденовирусной доставки системы CRISPR/Cas9 было выявлено восстановление экспрессии дистрофина до 50% от нормы [140].

Редактирование системой CRISPR/Cas9 проводили и у собак CKCS-MD (Кавалер Кинг Чарльз спаниели с миссенс-мутацией в интроне 50 гена дистрофина) [142]. Векторы AAV9, кодирующие Cas9 и гРНК, вводили внутримышечно 1-недельным собакам CKCS-MD, что приводило к пропуску или рефреймингу экзона 51 и восстановлению синтеза дистрофина от 3 до 90% от нормы в зависимости от типа мышц.

Во всех описанных экспериментах не было обнаружено неспецифической активности Cas9 в предсказанных сайтах и иммунологического ответа.

Для развития подходов к терапии системой CRISPR/Cas9 также были использованы ИПСК, полученные от больных МДД [143, 144]. В одном из последних исследований редактировали ИПСК с делецией экзонов 48–50, с дублированными экзонами 55–59 и с мутацией в интроне 47, которая вызывала образование псевдоэкзона [145]. Разрушение акцепторного сайта сплайсинга в экзоне 51, что в свою очередь приводит к пропуску экзона 51, позволило соединить экзоны 47 и 52 и восстановить открытую рамку считывания в случае делеций экзонов 48–50. Данная терапия теоретически может исправить мутации примерно у 13% пациентов с МДД. При помощи двух направляющих РНК удалось пропустить псевдоэкзон и исключить преждевременный стоп-кодон. Использование гРНК к специфической последовательности между интроном 54 и экзонам 55 также позволило осуществить пропуск дублированных экзонов 55–59. Разнообразие описанных подходов поможет разработать эффективный метод лечения, подходящий большинству больных МДД.

Редактирование системой CRISPR/Cas9 в целом дает те же результаты, что и пропуск экзонов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов. Главное преимущество CRISPR/Cas9 состоит в отсутствии необходимости повторного введения, в отличие от АОН, так как последовательность ДНК необратимо меняется. Тем не менее, необходимо установить возможные нецелевые эффекты и долговременную

эффективность в доклинических исследованиях до начала клинических исследований у пациентов.

Проблема доставки генно-инженерных конструкций

Внутримышечное введение генно-инженерных конструкций в составе вирусных векторов для сверхэкспрессии дистрофина или редактирования гена *Dmd* у мышей [137, 141] и собак [142, 146] вызывает значимое (до 53% от нормы [137]) и длительное (в случае с CRISPR/Cas9 до 18 мес. [147]) повышение экспрессии экзогенного микродистрофина или его усеченной эндогенной формы. Есть основания полагать, что даже низкая экспрессия дистрофина (4–15% от нормы) существенно улучшает сокращение поперечно-полосатой скелетной мускулатуры [132, 148]. В одной из работ по пропуску экзона 23 у мышей *mdx* с помощью CRISPR/Cas9 дистрофин экспрессировался в 25% миофибрилл через 6 недель после внутримышечной инъекции AAV9-вектора, при этом уровень белка составлял до 53% от нормы [137].

Однако для МДД характерно поражение всех клеток мышечной ткани, включая гладкомышечные клетки и кардиомиоциты, что требует системного введения генно-инженерных конструкций. В процитированных выше работах [66, 142] внутривенное введение AAV разных серотипов с микродистрофином приводило к системным изменениям в мышечной ткани: экзогенный микродистрофин у животных с МДД был обнаружен до 3–90% от нормы в зависимости от типа мышцы. При внутривенной AAV доставке компонентов CRISPR/Cas9 также наблюдали повышение экспрессии усеченной эндогенной формы дистрофина в миофибриллах (70% от нормы) [141, 147]. При внутриартериальном введении микродистрофина в составе AAV8-вектора здоровым макакам-резус экспрессию микродистрофина обнаруживали через 3 мес. в 35–89% миофибрилл [149].

В случае использования микро- и минидистрофина с целью их сверхэкспрессии в мышечных клетках исследователи сталкиваются с ограниченной персистенцией применяемых генно-инженерных конструкций и временным характером сверхэкспрессии [149], что требует повторных введений. Показано, что даже самый безопасный с этой точки зрения AAV вектор обладает иммуногенностью, частота иммунных реакций повышается при повторных введениях в связи

с появлением антител к капсиду ААВ [150, 151]. В ряде экспериментов продемонстрирована высокая токсичность ААВ9 при внутривенном введении минидистрофина собакам, проявляющаяся массивной воспалительной миопатией, контрактурами и замедлением роста животного [152], а также при использовании другого трансгена у обезьян [153]. Повышенный риск развития иммунных и воспалительных реакций требует дополнительного назначения иммуносупрессивной терапии [154], а также сопряжен со снижением качества жизни во время такого лечения.

На этом фоне применение метода CRISPR/Cas9 представляется наиболее перспективным, так как для его работы не требуется длительного присутствия в клетке — для внесения двуцепочечного разрыва в целевой локус достаточно 48–72 ч. [155]. Все изменения, произошедшие в результате работы CRISPR/Cas9, являются необратимыми и наследуются дочерними клетками при делении, что позволяет избегать повторных введений и обусловленных ими побочных реакций. Вопрос эффективной доставки компонентов CRISPR/Cas9 остается пока открытым, однако имеющиеся результаты исследований *in vivo* указывают на то, что оптимальным и эффективным способом доставки, скорее всего, будут ААВ векторы с тропностью к мышечной ткани (ААВ2, ААВ8, ААВ9), либо в сочетании с SaCas9 (имеющей наименьший среди нуклеаз размер [145]), либо в составе двойных ААВ систем с клонированными SpCas9 и гРНК в разных векторах [137, 142].

Заключение

Еще недавно лечение наследственных заболеваний, вызванных мутациями в тех или иных генах, заключалось лишь в облегчении симптомов. Сейчас геномная медицина быстро развивается, и возникают все новые и новые терапевтические стратегии для лечения. В настоящее время разрабатываются способы лечения МДД, основанные на классической генной терапии

(сверхэкспрессия дистрофина), изменении экспрессии ряда генов, чтении через стоп-кодон, пропуске экзона.

Принимая во внимание доминирующий тип мутаций при МДД, самым многообещающим подходом для терапии представляется пропуск экзона, который подойдет 90% больных. Начиная с 1998 г. исследователи из разных стран разрабатывают метод пропуска экзона с помощью антисмысловых нуклеотидов. Основными недостатками данного подхода являются временный характер изменений, что требует еженедельного внутривенного введения препарата.

Эффективность CRISPR/Cas9-опосредованного пропуска экзона сопоставима с таковой при использовании АОН. Важные преимущества данного метода — быстрота и необратимость действия, поэтому для его доставки в клетки подходит любой метод транзитной доставки, а результат уже может появиться через 48–72 ч. Нет необходимости в повторных введениях, из-за чего стоимость такого лечения и частота побочных эффектов будут ниже.

Таким образом, анализ литературы показывает, что в мире проводятся многочисленные исследования по созданию новых генно-терапевтических препаратов для лечения МДД, часть из которых продемонстрировала высокую эффективность на доклиническом уровне и вышла на уровень клинических исследований. Наиболее перспективным подходом, на наш взгляд, является CRISPR/Cas9-опосредованный пропуск экзона.

Благодарности

Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066): разделы «Введение», «Генно-терапевтические подходы к лечению МДД» и «Заключение». В рамках государственного задания Минобрнауки России: «Проблема доставки генно-инженерных конструкций»; работа поддержана Программой Президиума РАН № 18 «Биомедицинские технологии: инновационные разработки»: раздел «Патогенез МДД и ген дистрофина».

ЛИТЕРАТУРА:

- McCaffrey T., Guglieri M., Murphy A.P. et al. Cardiac involvement in female carriers of duchenne or becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2017; 55(6): 810–8.
- Ishizaki M., Kobayashi M., Adachi K. et al. Female dystrophinopathy: Review of current literature. *Neuromuscul. Disord.* 2018; 28(7): 572–81.
- Verma S., Goyal P., Beam C. et al. Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2017; 56(2): E12–5.
- Николенко Н.Ю., Гончарова О.В., Артемьева С.Б. и др. Реабилитация детей с прогрессирующей мышечной дистрофией Дюшенна. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2014; 4: 28–31. (Nikolenko N.Yu., Goncharova O.V., Artemyeva S.B. et al. Rehabilitation of children with progressive muscular dystrophy Duchenne. *Russian bulletin of perinatology and pediatrics* 2014; 4: 28–31).
- Никишина О.А., Соколова М.Г., Лобзин С.В. и др. Данные нейропсихологического исследования больных мышечной дистрофией Дюшенна. Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения 2016; 2: 629–31. (Nikishina O.A., Sokolova M.G., Lobzin S.V. et al. Results of the neuropsychological assessment of patients with duchenne muscular dystrophy. *Health is the Basis of Human Potential: Problems and Ways of their Solution* 2016; 2: 629–31).
- Жданова Е.Б., Харламов Д.А., Белоусова Е.Д. Соматические нарушения при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2011; 5: 46–50. (Zhdanova E.B., Kharmalov D.A., Belousova E.D. Somatic disorders in Duchenne muscular dystrophy. *Russian bulletin of perinatology and pediatrics* 2011; 5: 46–50).
- Simonds A.K., Muntoni F., Heather S. et al. Impact of nasal ventilation on survival in hypercapnic Duchenne muscular dystrophy. *Thorax* 1998; 53(11): 949–52.
- Lo Mauro A., Aliverti A. Physiology of respiratory disturbances in muscular dystrophies. *Breathe (Sheff)* 2016; 12(4): 318–27.
- Suresh S., Wales P., Dakin C. et al. Sleep-related breathing disorder in Duchenne muscular dystrophy: disease spectrum in the paediatric population. *J. Paediatr. Child. Health* 2005; 41: 500–3.
- Eagle M., Bourke J., Bullock R. et al. Managing Duchenne muscular dystrophy — the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord.* 2007; 17(6): 470–5.
- Passamano L., Taglia A., Palladino A. et al. Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol.* 2012; 31(2): 121–5.
- Koenig M., Monaco A.P., Kunkel L.M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53(2): 219–28.
- Tennyson C.N., Klamut H.J., Worton R.G. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat. Genet.* 1995; 9(2): 184–90.
- Peter A.K., Cheng H., Ross R.S. et al. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog. Pediatr. Cardiol.* 2011; 31(2): 83–8.
- Fairclough R.J., Wood M.J., Davies K.E. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat. Rev. Genet.* 2013; 14(6): 373–8.
- Nichols B., Takeda S., Yokota T. Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains. *Brain Sci.* 2015; 5(3): 275–98.
- Howard P.L., Dally G.Y., Ditta S.D. et al. Dystrophin isoforms DP71 and DP427 have distinct roles in myogenic cells. *Muscle Nerve* 1999; 22: 16–27.
- Nudel U., Zuk D., Einat P. et al. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 1989; 337: 76–8.
- Gorecki D.C., Monaco A.P., Derry J.M. et al. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1: 505–10.
- D'Souza V.N., Nguyen T.M., Morris G.E. et al. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4: 837–42.
- Chamova T., Guerguelcheva V., Raycheva M. et al. Association between loss of dp140 and cognitive impairment in duchenne and becker dystrophies. *Balkan J. Med. Genet. BJMG* 2013; 16: 21–30.

22. Doorenweerd N., Straathof C.S., Dumas E.M. et al. Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2014; 76: 403–11.
23. Rapaport D., Fuchs O., Nudel U. et al. Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 21289–92.
24. Sarig R., Mezger-Lallemand V., Gitelman I. et al. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: Differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8: 1–10.
25. El Mathari B., Sene A., Charles-Messance H. et al. Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24: 3939–47.
26. Vaillend C., Ungerer A. Behavioral characterization of mdx3cv mice deficient in C-terminal dystrophins. *Neuromuscul. Disord.* 1999; 9: 296–304.
27. Lidov H.G. Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol.* 1996; 6: 63–77.
28. Byers T.J., Lidov H.G., Kunkel L.M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* 1993; 4: 77–81.
29. Tozawa T., Itoh K., Yaoi T. et al. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol. Neurobiol.* 2012; 45: 287–97.
30. Fujimoto T., Itoh K., Yaoi T. et al. Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 452: 79–84.
31. Allen D.G., Whitehead N.P. Duchenne muscular dystrophy — what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011; 43(3): 290–4.
32. Spencer M.J., Tidball J.G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul. Disord.* 2001; 11(6–7): 556–64.
33. Sussman M. Duchenne muscular dystrophy. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2002; 10(2): 138–51.
34. Kim J.H., Kwak H.B., Thompson L.V. et al. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013; 34(1): 1–13.
35. Зотова Е.Д., Решетов Д.А., Жерновков В.Е. и др. Анализ фенотипических проявлений делеций в гене дистрофина в контексте эффективности пропуска экзонов как метода терапии наследственных дистрофинопатий. *Вестник РГМУ* 2016; 3: 23–9. (Zotova E.D., Reshetov D.A., Zhernovkov V.E. et al. Analysis of phenotype expressions of deletions in the dystrophin gene in terms of efficiency of exon skipping as a method for treatment of hereditary dystrophinopathies. *Bulletin of RSMU* 2016; 3: 23–9).
36. Monaco A.P., Bertelson C.J., Liechti-Gallati S. et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2(1): 90–5.
37. Aartsma-Rus A., Van Deutekom J.C., Fokkema I.F. et al. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006; 34(2): 135–44.
38. Campbell K.P. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; 80(5): 675–9.
39. van Putten M., Hulsker M., Young C. et al. Low dystrophin levels increase survival and improve muscle pathology and function in dystrophin/utrophin double-knockout mice. *FASEB J.* 2013; 27: 2484–95.
40. Li D., Yue Y., Duan D. Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PLoS One* 2010; 5: e15286.
41. Bladen C.L., Salgado D., Monges S. et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 2015; 36(4): 395–402.
42. Reinig A.M., Mirzaei S., Berlau D.J. Advances in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: New and Emerging Pharmacotherapies. *Pharmacotherapy* 2017; 37(4): 492–9.
43. Rice M.L., Wong B., Horn P.S. et al. Cataract development associated with long-term glucocorticoid therapy in Duchenne muscular dystrophy patients. *J. AAPOS* 2018; 22(3): 192–6.
44. Rafael J.A., Cox G.A., Corrado K. et al. Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations. *J. Cell Biol.* 1996; 134(1): 93–102.
45. Harper S.Q., Hauser M.A., DelloRusso C. et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 2002; 8(3): 253–61.
46. MacKenzie T.C., Kobinger G.P., Louboutin J.P. et al. Transduction of satellite cells after prenatal intramuscular administration of lentiviral vectors. *J. Gene Med.* 2005; 7(1): 50–8.
47. Kafri T., Blömer U., Peterson D.A. et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet.* 1997; 17(3): 314–7.
48. Li S., Kimura E., Fall B.M. et al. Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther.* 2005; 12(14): 1099–108.
49. Ragot T., Vincent N., Chafey P. et al. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 1993; 361(6413): 647–50.
50. Jani A., Lochmüller H., Acsadi G. et al. Generation, validation, and large scale production of adenoviral recombinants with large size inserts such as a 6.3 kb human dystrophin cDNA. *J. Virol. Methods* 1997; 64(2): 111–24.
51. Deconinck N., Ragot T., Maréchal G. et al. Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *PNAS USA* 1996; 93(8): 3570–4.
52. Yoshimura M., Sakamoto M., Ikemoto M. et al. AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol. Ther.* 2004; 10(5): 821–8.
53. Yuasa K., Yoshimura M., Urasawa N. et al. Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther.* 2007; 14(17): 1249–60.
54. Ohshima S., Shin J.H., Yuasa K. et al. Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol. Ther.* 2009; 17(1): 73–80.
55. Bostick B., Yue Y., Lai Y. et al. Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* 2008; 19(8): 851–6.
56. Shin J.H., Nitahara-Kasahara Y., Hayashita-Kinoh H. et al. Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther.* 2011; 18(9): 910–9.
57. Hoshiya H., Kazuki Y., Abe S. et al. A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. *Mol. Ther.* 2009; 17(2): 309–17.
58. Benedetti S., Uno N., Hoshiya H. et al. Reversible immortalisation enables genetic correction of human muscle progenitors and engineering of next-generation human artificial chromosomes for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.* 2018; 10(2): 254–75.
59. Sakurai H., Kawabata K., Sakurai F. et al. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int. J. Pharm.* 2008; 354(1–2): 9–15.
60. Zaldumbide A., Hoeben R.C. How not to be seen: immune-evasion strategies in gene therapy. *Gene Ther.* 2008; 15(4): 239–46.
61. Chuah M.K., Collen D., Vanden Driessche T. Biosafety of adenoviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 2003; 3(6): 527–43.
62. Rothe M., Modlich U., Schambach A. Biosafety challenges for use of lentiviral vectors in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 2013; 13(6): 453–68.
63. Лисковых М., Куприна Н., Ларионов В. и др. Искусственные хромосомы для генотерапии и тканезамещения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; 7(4): 8–20. (Likovych M., Kuprina N., Lariонов V. et al. Artificial chromosomes for gene therapy and tissue replacement. *Cellular transplantation and tissue engineering* 2012; 7(4): 8–20).
64. Wu Z., Asokan A., Samulski R.J. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol. Ther.* 2006; 14(3): 316–27.
65. Okada T., Takeda S. Current challenges and future directions in recombinant AAV-mediated gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Pharmaceuticals* 2013; 6(7): 813–36.
66. Yue Y., Ghosh A., Long C. et al. A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. *Mol. Ther.* 2008; 16(12): 1944–52.
67. Ramos J.N., Hollinger K., Bengtsson N.E. et al. Development of Novel Micro-dystrophins with Enhanced Functionality. *Mol. Ther.* 2019; 27(3): 623–35.
68. Patel A., Zhao J., Duan D. et al. Design of AAV Vectors for Delivery of Large or Multiple Transgenes. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1950: 19–33.
69. Kodippili K., Hakim C.H., Pan X. et al. Dual AAV Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy with a 7-kb Mini-Dystrophin Gene in the Canine Model. *Hum. Gene Ther.* 2018; 29(3): 299–311.
70. Koo T., Popplewell L., Athanasopoulos T. et al. Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice. *Hum. Gene Ther.* 2014; 25(2): 98–108.
71. Stevens A.J., Sekar G., Shah N.H. et al. A promiscuous split intein with expanded protein engineering applications. *PNAS USA* 2017; 114(32): 8538–43.
72. Li J., Sun W., Wang B. et al. Protein trans-splicing as a means for viral vector-mediated in vivo gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2008; 19(9): 958–64.
73. Gao Y., Hisey E., Bradshaw T.W.A. et al. Plug-and-Play Protein Modification Using Homology-Independent Universal Genome Engineering. *Neuron* 2019; 103(4): 583–597.e8.
74. Inacio P. Sarepta's Gene Therapy Improves Muscle Function in 4 Boys with DMD, Phase 1/2 Trial Shows, <https://muscular dystrophy news.com/2018/10/12/sarepta-dmd-gene-therapy-improves-muscle-function-4-boys-trial/>
75. Shin J.H., Pan X., Hakim C.H. et al. Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 2013; 21(4): 750–7.
76. Tinsley J.M., Blake D.J., Roche A. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 1992; 360(6404): 591–3.
77. Schofield J., Houzelstein D., Davies K. et al. Expression of the dystrophin-related protein (utrophin) gene during mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* 1993; 198(4): 254–64.
78. Khurana T.S., Davies K.E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003; 2(5): 379–90.
79. Miura P., Jasmin B.J. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol. Med.* 2006; 12(3): 122–9.
80. Fisher R., Tinsley J.M., Phelps S.R. et al. Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* 2001; 11(8): 713–21.

81. Belanto J.J., Mader T.L., Eckhoff M.D. et al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *PNAS USA* 2014; 111(15): 5723–8.
82. Weir A.P., Burton E.A., Harrod G. et al. A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx muscle. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(47): 45285–90.
83. Kennedy T.L., Guiraud S., Edwards B. Micro-utrophin Improves Cardiac and Skeletal Muscle Function of Severely Affected D2/mdx Mice. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2018; 11: 92–105.
84. Tinsley J.M., Fairclough R.J., Storer R. et al. Daily treatment with SMT C1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One* 2011; 6(5): e19189.
85. Courdier-Fruh I., Briguet A. Utrophin is a calpain substrate in muscle cells. *Muscle Nerve* 2006; 33: 753–9.
86. Ricotti V., Spinty S., Roper H. et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-Arylbenzoxazole Utrophin Modulator, following Single- and Multiple-Dose Administration to Pediatric Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 2016; 11(4): e0152840.
87. Muntoni F., Tejura B., Spinty S. et al. A Phase 1b Trial to Assess the Pharmacokinetics of Ezutromid in Pediatric Duchenne Muscular Dystrophy Patients on a Balanced Diet. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 2019; 8(7): 922–33.
88. Xia B., Hoyte K., Kammesheidt A. et al. Overexpression of the CT GalNAc transferase in skeletal muscle alters myofiber growth, neuromuscular structure, and laminin expression. *Dev. Biol.* 2002; 242(1): 58–73.
89. Yoon J.H., Johnson E., Xu R. et al. Comparative proteomic profiling of dystroglycan-associated proteins in wild type, mdx, and Galgt2 transgenic mouse skeletal muscle. *J. Proteome Res.* 2012; 11(9): 4413–24.
90. Martin P.T., Xu R., Rodino-Klapac L.R. et al. Overexpression of Galgt2 in skeletal muscle prevents injury resulting from eccentric contractions in both mdx and wild-type mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009; 296(3): 476–88.
91. Xu R., Jia Y., Zygmunt D.A. et al. rAAVrh74.MCK.GALGT2 Protects against Loss of Hemodynamic Function in the Aging mdx Mouse Heart. *Mol. Ther.* 2019; 27(3): 636–49.
92. White T.A., LeBrasseur N.K. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges — a mini-review. *Gerontol.* 2014; 60(4): 289–93.
93. Bogdanovich S., Krag T.O., Barton E.R. et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002; 420(6914): 418–21.
94. Wagner K.R., Fleckenstein J.L., Amato A.A. et al. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2008; 63(5): 561–71.
95. Cadena S.M., Tomkinson K.N., Monnell T.E. et al. Administration of a soluble activin type IIb receptor promotes skeletal muscle growth independent of fiber type. *J. Appl. Physiol.* 2010; 109(3): 635–42.
96. Campbell C., McMillan H.J., Mah J.K. et al. Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve* 2017; 55(4): 458–64.
97. Roberts T.C., Andaloussi S.E., Morris K.V. et al. Small RNA-Mediated Epigenetic Myostatin Silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2012; 1: e23.
98. Renz M., Otten C., Faurobert E. et al. Regulation of β 1 integrin-Klf2-mediated angiogenesis by CCM proteins. *Dev. Cell* 2015; 32(2): 181–90.
99. McDonald C.M., Campbell C., Torricelli R.E. et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390(10101): 1489–98.
100. Davies J., Gorini L., Davis B.D. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.* 1965; 1(1): 93–106.
101. Palmer E., Wilhelm J.M., Sherman F. Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 1979; 277(5692): 148–50.
102. Barton-Davis E.R., Cordier L., Shoturma D.I. et al. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* 1999; 104(4): 375–81.
103. Malik V., Rodino-Klapac L.R., Viollet L. et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2010; 67(6): 771–80.
104. Shimizu-Motohashi Y., Miyatake S., Komaki H. et al. Recent advances in innovative therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy: From discovery to clinical trials. *Am. J. Transl. Res.* 2016; 8(6): 2471–89.
105. Finkel R.S., Flanigan K.M., Wong B. et al. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2013; 8(12): e81302.
106. McDonald C.M., Campbell C., Torricelli R.E. et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390(10101): 1489–98.
107. Peripheral and Central Nervous System Drugs Advisory Committee Meeting. FDA Briefing Document. NDA 200896, Ataluren, Sep 28, 2017, <https://www.fda.gov/media/107625/download>.
108. Phase II Study of NPC-14 (Arbekacin Sulfate) to Explore Safety, Tolerability, and Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophy (NORTH POLE DMD). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01918384?term=NPC-14&rank=1>
109. Kole R., Leppert B.J. Targeting mRNA splicing as a potential treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Discov. Med.* 2012; 14(74): 59–69.
110. van Deutekom J.C., van Ommen G.J. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2003; 4(10): 774–83.
111. Crawford G.E., Lu Q.L., Partridge T.A. et al. Suppression of revertant fibers in mdx mice by expression of a functional dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10(24): 2745–50.
112. Lu Q.L., Morris G.E., Wilton S.D. et al. Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J. Cell Biol.* 2000; 148(5): 985–96.
113. Yokota T., Lu Q.L., Morgan J.E. et al. Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration. *J. Cell Sci.* 2006; 119(13): 2679–87.
114. Alter J., Lou F., Rabinowitz A. et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat. Med.* 2006; 12(2): 175–7.
115. Aartsma-Rus A., Janson A.A., Kaman W.E. et al. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 74(1): 83–92.
116. Watanabe N., Nagata Y., Satou Y. et al. NS-065/NCNP-01: An Antisense Oligonucleotide for Potential Treatment of Exon 53 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2018; 13: 442–9.
117. Amoasii L., Long C., Li H. et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(418): pii: eaa8081.
118. Melis M.A., Cau M., Muntoni F. et al. Elevation of serum creatine kinase as the only manifestation of an intragenic deletion of the dystrophin gene in three unrelated families. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 1998; 2(5): 255–61.
119. Nakamura A., Takeda S. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology* 2009; 29(4): 494–501.
120. Echigoya Y., Mouly V., Garcia L. et al. In silico screening based on predictive algorithms as a design tool for exon skipping of oligonucleotides in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120058.
121. Fletcher S., Honeyman K., Fall A.M. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J. Gene Med.* 2006; 8(2): 207–16.
122. Aoki Y., Yokota T., Nagata T. et al. Bodywide skipping of exons 45–55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *PNAS USA* 2012; 109(34): 13763–8.
123. Yokota T., Lu Q.L., Partridge T. et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* 2009; 65(6): 667–76.
124. Echigoya Y., Nakamura A., Nagata T. et al. Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy. *PNAS USA* 2017; 114(16): 4213–8.
125. Shimizu-Motohashi Y., Komaki H., Motohashi N. et al. Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status of Therapeutic Approaches. *J. Pers. Med.* 2019; 9(1): pii: E1.
126. Lim K.R.Q., Maruyama R., Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des. Devel. Ther.* 2017; 11: 533–45.
127. Stein C.A. Eteplirsen Approved for Duchenne Muscular Dystrophy: The FDA Faces a Difficult Choice. *Mol. Ther.* 2016; 24(11): 1884–5.
128. Dowling J.J. Eteplirsen therapy for Duchennemuscular dystrophy: skipping to the front of the line. *Nat. Rev. Neurol.* 2016; 12(12): 675–6.
129. Mendell J.R., Goemans N., Lowes L.P. et al. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2016; 79(2): 257–71.
130. Aartsma-Rus A., Krieg A.M. FDA Approves Eteplirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: The Next Chapter in the Eteplirsen Saga. *Nucleic Acid Ther.* 2017; 27(1): 1–3.
131. Draft Evidence Report. Deflazacort, Eteplirsen, and Golodirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: Effectiveness and Value. May 22, 2019, https://icer-review.org/wp-content/uploads/2018/12/ICER_DMD_Draft_Evidence_Report_0522019.pdf.
132. van Putten M., van der Pijl E.M., Hulsker M. et al. Low dystrophin levels in heart can delay heart failure in mdx mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014; 69: 17–23.
133. Wasala N.B., Yue Y., Vance J. et al. Uniform low-level dystrophin expression in the heart partially preserved cardiac function in an aged mouse model of Duchenne cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2017; 102: 45–52.
134. Biolinfo. CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR/Cas9 tool for genome editing in plants. <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>.
135. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8(11): 2281–308.
136. Nelson C.E., Hakim C.H., Ousterout D.G. et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Science* 2016; 351(6271): 403–7.
137. Long C., Amoasii L., Mireault A.A. et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* 2016; 351(6271): 400–3.
138. Min Y.L., Li H., Rodriguez-Caycedo C. et al. CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci. Adv.* 2019; 5(3): eaav4324.

139. Ousterout D.G., Kabadi A.M., Thakore P.I. et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6244.
140. Xu L., Park K.H., Zhao L. et al. Crispr-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in MDX mice. *Mol. Ther.* 2016; 24(3): 564–9.
141. Bengtsson N.E., Hall J.K., Odom G.L. et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14454.
142. Amoasii L., Hildyard J.C.W., Li H. et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of duchenne muscular dystrophy. *Science* 2018; 362(6410): 86–91.
143. Young C.S., Hicks M.R., Ermolova N.V. et al. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell* 2016; 18(4): 533–40.
144. Kyrychenko V., Kyrychenko S., Tiburcy M. et al. Functional correction of dystrophin actin binding domain mutations by genome editing. *JCI Insight* 2017; 2(18): pii: 95918.
145. Long C., Li H., Tiburcy M. et al. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Sci. Adv.* 2018; 4(1): eaap9004.
146. Koo T., Okada T., Athanasopoulos T. et al. Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J. Gene Med.* 2011; 13(9): 497–506.
147. Hakim C.H., Wasala N.B., Nelson C.E. et al. AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice. *JCI Insight* 2018; 3(23): pii: 124297.
148. Godfrey C., Muses S., McClorey G. et al. How much dystrophin is enough: the physiological consequences of different levels of dystrophin in the mdx mouse. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24(15): 4225–37.
149. Rodino-Klapac L.R., Montgomery C.L., Bremer W.G. et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol. Ther.* 2010; 18(1): 109–17.
150. Mingozzi F., High K.A. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr. Gene Ther.* 2011; 11(4): 321–30.
151. Corti M., Cleaver B., Clément N. et al. Evaluation of Readministration of a Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Expressing Acid Alpha-Glucosidase in Pompe Disease: Preclinical to Clinical Planning. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2015; 26(3): 185–93.
152. Kornegay J.N., Li J., Bogan J.R. et al. Wide spread muscle expression of an AAV9 human mini-dystrophin vector after intravenous injection in neonatal dystrophin-deficient dogs. *Mol. Ther.* 2010; 18: 1501–8.
153. Hinderer C., Katz N., Buza E.L. et al. Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum. Gene Ther.* 2018; 29(3): 285–98.
154. Yue Y., Pan X., Hakim C.H. et al. Safe and bodywide muscle transduction in young adult Duchenne muscular dystrophy dogs with adeno-associated virus. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24(20): 5880–90.
155. Смирнихина С.А., Анучина А.А., Кочергин-Никитский К.С. и др. Экспериментальные подходы к таргетному редактированию гена CFTR с помощью CRISPR-Cas9. *Вестник РГМУ* 2018; 2: 15–21. (Smirnikhina S.A., Anuchina A.A., Kochergin-Nikitsky K.S. et al. Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9. *Bulletin of RSMU* 2018; 2: 15–21).

Поступила: 02.09.2019