

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641931>

Препятствия на пути к разработке генной терапии мышечной дистрофии Дюшенна

Е.В. Куршакова^{1, 2}, О.А. Левченко¹, А.В. Лавров¹¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия;² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Московская область, Долгопрудный, Россия

АННОТАЦИЯ

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — это прогрессирующее нервно-мышечное X-сцепленное рецессивное заболевание, возникающее в результате появления патогенных мутаций в гене *DMD*, кодирующем белок дистрофин. Это важный структурный белок мышечных клеток, который поддерживает целостность поперечнополосатой мускулатуры. МДД приводит к прогрессирующей мышечной слабости и, как результат, сокращению продолжительности жизни из-за дыхательной и/или сердечной недостаточности.

Стандартом лечения МДД считается применение глюкокортикоидов, которые не являются высокоэффективными и могут быть причиной многих побочных эффектов. В течение десятилетий множество исследований было направлено на поиск эффективного метода терапии, однако в настоящее время для пациентов с МДД не существует лекарства, способного полностью устранить причину заболевания. Тем не менее последние исследования демонстрируют, что создание эффективной и перспективной генной терапии МДД возможно в ближайшем будущем. Такие подходы, как заместительная терапия укороченными формами дистрофина и редактирование генома, активно изучаются в настоящее время, но, хотя некоторые из этих подходов показали высокую эффективность на клеточных культурах и модельных животных, существует ряд препятствий для их эффективного использования при лечении миодистрофии Дюшенна у человека. В первую очередь к этим препятствиям относится размер гена (*DMD* является одним из крупнейших), что затрудняет его упаковку в вирусные векторы для доставки. Более 7000 различных мутаций служат причиной МДД, что осложняет создание универсальных препаратов генной терапии, которые могли бы быть применимы к большим группам пациентов. Кроме того, серьёзными проблемами являются низкая эффективность доставки генетических конструкций и иммунные ответы как на трансген, так и на вирусный вектор. А долгосрочные последствия дефицита дистрофина могут сохраняться даже при восстановлении экспрессии белка. Несмотря на перечисленные проблемы, в текущих исследованиях предлагаются различные стратегии для преодоления этих ограничений.

Целью данного обзора является обсуждение существующих проблем, решение которых может стать значительным шагом к разработке генной терапии МДД и многих других наследственных заболеваний.

Ключевые слова: мышечная дистрофия Дюшенна; генная терапия; дистрофин; терапевтические стратегии.

Как цитировать:

Куршакова Е.В., Левченко О.А., Лавров А.В. Препятствия на пути к разработке генной терапии мышечной дистрофии Дюшенна // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 1. С. 18–30. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641931>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641931>

Challenges in developing gene therapy against Duchenne muscular dystrophy

Elizaveta V. Kurshakova^{1, 2}, Olga A. Levchenko¹, Alexander V. Lavrov¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia;

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow region, Russia

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy is a progressive X-linked recessive neuromuscular disorder resulting from pathogenic mutations in the *DMD* gene, which codes dystrophin. It is one of the essential structural proteins of muscle cells that maintains the integrity of cross-striated muscles. Duchenne muscular dystrophy causes progressive muscular weakness and, as a consequence, reduces life expectancy due to respiratory failure and/or heart failure.

Glucocorticoids are considered the standard of care in Duchenne muscular dystrophy, although they are not highly effective and may lead to numerous adverse effects. For decades, many studies have been focused on finding an effective therapy for Duchenne muscular dystrophy; however, no etiology-oriented product is currently available for patients with Duchenne muscular dystrophy. That being said, the latest studies demonstrate that promising effective gene therapy for Duchenne muscular dystrophy is possible in the near future. The ongoing studies include approaches such as replacement therapy with shortened dystrophin forms and genome editing. Despite high efficacy of the approaches *in vitro* and in animal models, there is a number of challenges when it comes to treating human patients with Duchenne muscular dystrophy. The first challenge is the gene size — *DMD* is one of the largest genes, which makes it difficult to load it into viral vectors for delivery. Second, Duchenne muscular dystrophy is caused by over 7000 mutations, so creating universal gene therapies applicable to wide patient populations is problematic. Besides, low efficacy of genetic structure delivery and immune responses — both to the transgene and the viral vector — are a concern. Moreover, long-term sequelae of dystrophin deficiency could persist even if the protein expression is restored. The ongoing studies offer strategies to overcome the limitations above.

This review aims to discuss the current challenges, the solutions to which may become a breakthrough in gene therapy for Duchenne muscular dystrophy and other hereditary diseases.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; gene therapy; dystrophin; treatment strategy.

To cite this article:

Kurshakova EV, Levchenko OA, Lavrov AV. Challenges in developing gene therapy against Duchenne muscular dystrophy. *Genes & cells*. 2025;20(1):18–30. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc641931>

ВВЕДЕНИЕ

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — это тяжёлое, прогрессирующее, нервно-мышечное рецессивное X-сцепленное заболевание, причиной которого служат патогенные варианты нуклеотидной последовательности в гене *DMD*. Данный ген является самым большим в геноме человека, он имеет размер около 2,5 Мб и состоит из 79 экзонов и 78 интронов [1], содержит семь различных промоторов и подвержен альтернативному сплайсингу, ввиду чего множество изоформ дистрофина экспрессируются в различных типах тканей [2, 3]. Кроме скелетной и сердечной мышц экспрессия дистрофина наблюдается в нейронах коры головного мозга и в клетках Пуркинье мозжечка, в сетчатке глаза, нейронах центральной нервной системы, почках и Шванновских клетках [2–5]. С полноразмерного транскрипта мРНК, имеющего размер 14 Кб, происходит синтез белка массой 427 кДа, состоящего из 3685 аминокислот [6]. Белок дистрофин включает четыре домена: N-концевой актин-связывающий, центральный стержневой, цистеин-богатый и C-концевой, а также шарнирные области [7]. Было показано, что дистрофин является частью дистрофин-ассоциированного гликопротеинового комплекса [8]. В его состав также входят дистрогликаны, саркогликаны, синтрофины и дистобревины. Эти белки могут правильно локализоваться только в присутствии дистрофина на мембране клетки. Комплекс дистрофин-ассоциированных гликопротеинов необходим для сокращения мышечного волокна и является важным для стабильности мембраны мышечных клеток [9].

Патогенные варианты в гене *DMD*, являющиеся причиной МДД, зачастую обуславливают сдвиг рамки считывания и образование преждевременного стоп-кодона, что приводит к отсутствию белка дистрофина в клетках. При этом происходит нарушение целостности сарколеммы и повреждение мышечной ткани при сокращении [10]. У людей с МДД наблюдаются прогрессирующая дистрофия скелетных мышц, дыхательная недостаточность и кардиомиопатия, а также различная степень когнитивной дисфункции. При прогрессировании данного заболевания происходит замещение мышечных волокон на фиброзную и жировую ткань [11]. Пациенты теряют способность к самостоятельному передвижению в среднем к 12 годам, а после 20 лет возрастает риск преждевременной смерти из-за сердечной и/или дыхательной недостаточности [12]. Делеции и дупликации, не приводящие к сдвигу рамки считывания, а также некоторые миссенс-замены являются причиной более мягкого и медленно прогрессирующего варианта заболевания — мышечной дистрофии Беккера (МДБ), при котором возможно образование частично функционального белка или более низкого уровня его экспрессии [13, 14].

По различным данным, МДД страдает 1 из 5000 новорождённых мальчиков, что делает это наследственное

заболевание одним из самых распространённых. Примерно две трети случаев МДД возникают в результате передачи патогенного варианта в гене от матери к сыну, в одной трети случаев заболевание развивается в результате спонтанной мутации (*de novo*) [15].

ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА

На сегодняшний день лекарства, которое бы полностью устраняло причину МДД/МДБ, не существует, поэтому всё доступное лечение направлено на улучшение качества жизни и замедление прогрессирования заболевания. В основном применяется симптоматическая и патогенетическая терапия.

Терапия глюкокортикоидами является золотым стандартом лечения пациентов с МДД. Множество исследований продемонстрировали её способность замедлять прогрессирование заболевания [16, 17]. Такие препараты способны улучшать мышечную силу и уменьшать воспаление [18]. Было показано, что преднизолон и дефлаза-корт способствуют замедлению потери мышечной массы и продлевают способность к самостоятельному передвижению [19]. Однако длительное применение кортикостероидов может приводить ко множеству неблагоприятных побочных эффектов [20]. У некоторых пациентов наблюдаются нарушения роста и созревания, сахарный диабет, надпочечниковая недостаточность. Кроме того, приём кортикостероидов в сочетании с естественным дефицитом витамина D является причиной развития остеопороза [21]. В настоящее время продолжают клинические исследования новых стероидных препаратов, длительное применение которых было бы более безопасным за счёт уменьшения нежелательных побочных эффектов [22].

Одной из самых частых причин МДД являются делеции в области экзонов 45–55 [23], которые приводят к сдвигу рамки считывания. При подобных делециях часто возможен пропуск дополнительного экзона, который потенциально приведёт к восстановлению нарушенной рамки. В качестве патогенетической терапии при делециях применяются лекарственные препараты, которые модифицируют сплайсинг. Данные препараты представляют собой антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), которые по принципу комплементарности способны связываться с премРНК и влиять на процесс сплайсинга, блокируя работу сплайсосомы. В результате экзон в составе прилегающих интронов вырезается из зрелой мРНК [24], восстанавливая экспрессию дистрофина в мышечных клетках. Например, вилтоларсен и голодирсен^{1*} способствуют пропуску экзона 53 [25, 26]. Препараты этаплирсен* и касимерсен* направлены на пропуск экзонов 51 и 45 соответственно

¹ Здесь и далее звёздочкой обозначены препараты, не зарегистрированные в Государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации.

[27, 28]. Данный подход является очень специфичным, поскольку в зависимости от расположения делеции необходим пропуск различных экзонов. Каждый из данных препаратов должен проходить все фазы клинических исследований отдельно. Пропуск экзона 51 может быть применим у 14% пациентов, пропуск экзона 53 — у 8% пациентов, пропуск экзона 45 — у 9% пациентов. Доля пациентов, у которых можно применить другие АСО, значительно меньше: 4% пациентов (пропуск экзона 50), 3% пациентов (пропуск экзона 43) и 2% пациентов (пропуск экзона 8) [23]. На сегодняшний день Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило четыре препарата на основе АСО, упомянутые выше. Было показано, что данные препараты способны обеспечивать синтез дистрофина на уровнях <1% (этаплирсен), 1% (голодирсен и касимерсен) и 5% (вилтоларсен) соответственно [29]. Однако само по себе повышение уровня экспрессии дистрофина не является показателем эффективности терапии, поскольку основной ожидаемый результат — это остановка дегенеративного процесса или улучшение двигательных функций, в то время как препараты АСО показали только незначительное замедление прогрессирования заболевания в результате клинических исследований. При этом такие результаты были получены при совместном приеме данных препаратов с кортикостероидами [27]. Кроме того, в результате терапии возможно возникновение множества побочных эффектов: головная боль, лихорадка, тошнота. Поскольку необходимо еженедельное применение данных препаратов, большинству пациентов нужно устанавливать венозные катетеры, которые могут быть причиной различных осложнений в виде инфекций, тромбоза и септицемии [30, 31]. По совокупности всех сложностей, связанных с пожизненным приемом препаратов, а также учитывая далекую от идеальной комплаентность (приверженность лечению) пациентов, эффективность данной терапии дополнительно снижается.

Ещё одним препаратом, применяемым в России, является аталурен. Его назначают пациентам, имеющим нонсенс-замену в гене *DMD*. Данный препарат воздействует на процесс трансляции белка в рибосомах, позволяя считывать информацию с мРНК даже при наличии преждевременного стоп-кодона, что обеспечивает образование полноразмерного белка [32, 33]. Исследования показали, что применение аталурена способствует увеличению экспрессии полноразмерного дистрофина [34], а также позволяет продлить способность к самостоятельному передвижению [35]. На практике применение аталурена не продемонстрировало достаточно высокую клиническую эффективность, а также являлось причиной побочных эффектов, таких как тошнота и рвота, головная боль, лихорадка и множество других [36]. Данный препарат был условно одобрен к применению в ЕС, а также Бразилии и России, но не был одобрен FDA.

Разработка терапевтических стратегий, основанных на принципах генной терапии, открывает значительные перспективы в клинической практике благодаря ряду преимуществ. Этиопатогенетическое воздействие, направленное на коррекцию первичных молекулярных нарушений, обеспечивает ингибирование дальнейшей прогрессии патологического состояния. Наиболее близким к широкому внедрению в клиническую практику является микродистрофин — укороченная форма белка дистрофина, доставляемая в клетку в виде трансгена в составе аденоассоциированного вирусного вектора (AAV). В 2023 году FDA был одобрен препарат Элевидис (деландистроген моксепарвовек)*, успешно прошедший вторую фазу клинических исследований, однако результаты третьей фазы оказались неоднозначными. Элевидис не привёл к значительному улучшению баллов по шкале оценки амбулаторного состояния «Северная звезда» на 52-й неделе по сравнению с группой плацебо. Некоторые из вторичных показателей эффективности, такие как время подъёма, ходьба/бег на 10/100 м, скорость шага, время подъёма на 4 ступеньки, показали улучшения на протяжении лечения, но без статистической значимости [37].

Таким образом, на сегодняшний день ни один из симптоматических и патогенетических методов лечения не является высокоэффективным и подходящим для всех пациентов с МДД. Некоторые этиологические и патогенетические особенности МДД (рис. 1), рассмотренные в данном обзоре, являются причиной существенных препятствий для развития эффективной генной терапии.

ПРЕПЯТСТВИЯ НА ПУТИ К РАЗРАБОТКЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Размер гена

DMD — один из самых крупных генов человека. Он имеет размер 2,3 Мб и состоит из 79 экзонов. Белок дистрофин массой 427 кДа содержит более 3600 аминокислот. Большой размер гена является причиной довольно частых перестроек, таких как делеции (около 60%), дупликации (около 6%), транслокации и точечные мутации. В настоящее время глобальная база данных TREAT-NMD *DMD* содержит более 7000 описанных мутаций, причем большинство из них расположено в двух горячих точках, охватывающих экзоны 2–20 и 45–55 [23].

Было показано, что N-концевой и C-концевой домены являются значимыми для правильной работы белка, поэтому миссенс-варианты, расположенные в экзонах, кодирующих данные домены, часто приводят к тяжёлым формам заболевания [38]. При этом крупные делеции, не приводящие к сдвигу рамки считывания и являющиеся причиной нарушений в структуре центральных доменов, также не приводят к тяжёлым формам миодистрофии.

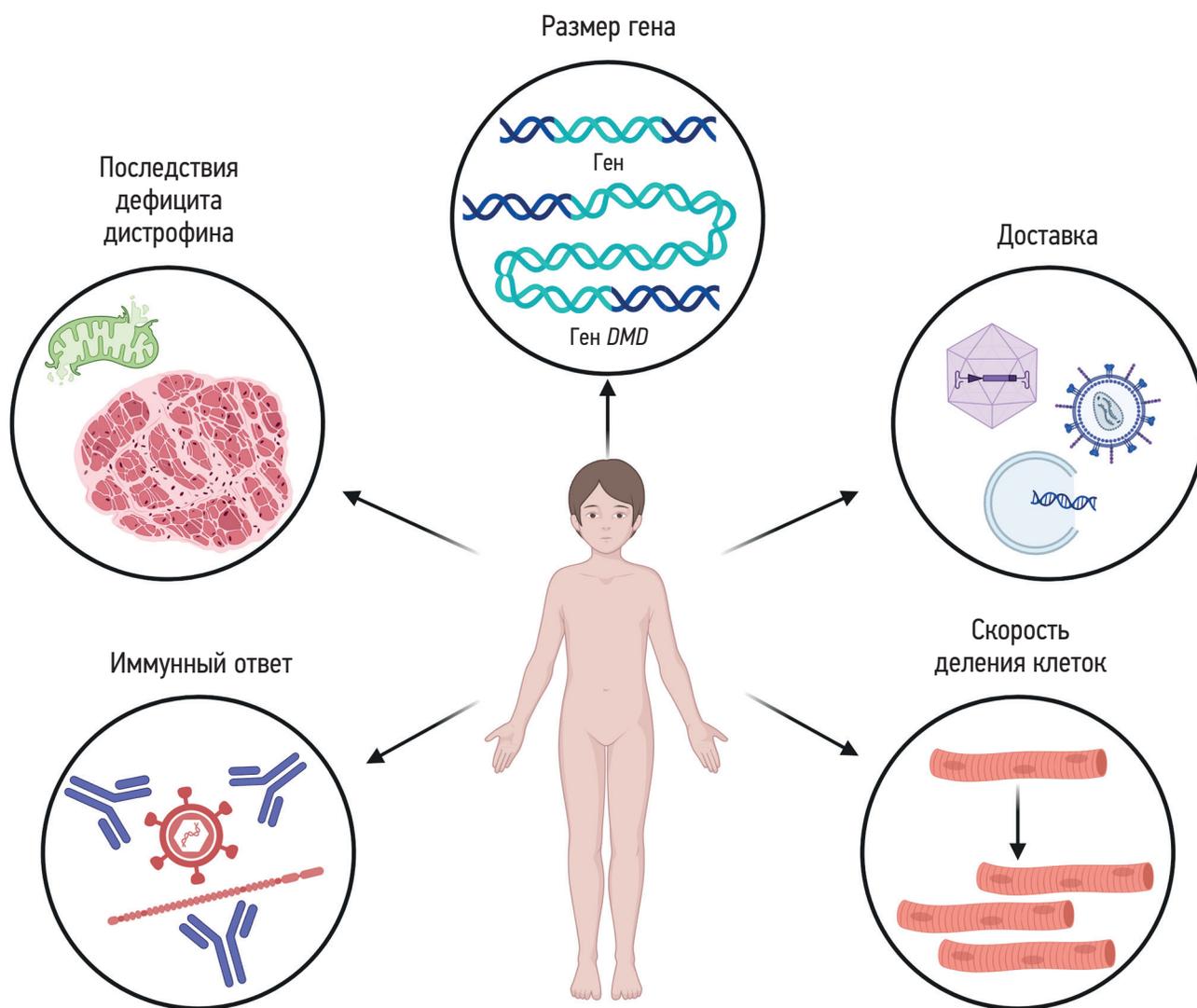


Рис. 1. Препятствия для создания генной терапии.
Fig. 1. Challenges in developing gene therapies.

Был выявлен редкий случай, при котором у пациента происходила делеция центральной части гена, охватывающая 46% кодирующей последовательности, однако наблюдалась лёгкая форма МДБ [39]. При этом достаточно короткие делеции, нарушающие рамку считывания, являются причиной очень тяжёлых форм МДД.

С помощью функционального анализа структурных доменов дистрофина, а также при изучении генотипов пациентов с лёгкими формами МДБ и МДД было показано, что несколько участков белка могут быть удалены в различных комбинациях (рис. 2). Такие усечённые формы дистрофина, как мини- и микродистрофины, являются достаточно функциональными и выполняют большинство функций полноразмерного белка [40]. Кроме того, в отличие от полноразмерного варианта гена, укороченная форма не превышает паковую способность AAV. Чаще всего в исследованиях используют мышиную модель *mdx*, в которой нонсенс-мутация приводит к отсутствию экспрессии белка дистрофина [41]. На такой модели было

продемонстрировано, что экспрессия укороченных форм гена *DMD* может почти полностью предотвратить развитие дистрофических симптомов [42, 43]. Благодаря этим исследованиям разработаны различные варианты микродистрофинов длиной около 3,6–4,9 кб [40, 44, 45].

Несмотря на очевидные преимущества, укороченная форма в отличие от полноразмерной не является полностью функциональной, и для достижения выраженного клинического эффекта необходимо больше микродистрофина. В исследованиях на мышинной модели *mdx* при экспрессии полноразмерного дистрофина на уровне около 20% от нормального наблюдали полное восстановление функционирования диафрагмы, в то время как экспрессия на этом же уровне укороченной формы обеспечивает лишь частичное восстановление функций [42]. Таким образом было показано, что клинический эффект при использовании микродистрофина зависит не только от уровня экспрессии, но и от структуры молекулы. Дальнейшие исследования на мышах продемонстрировали,

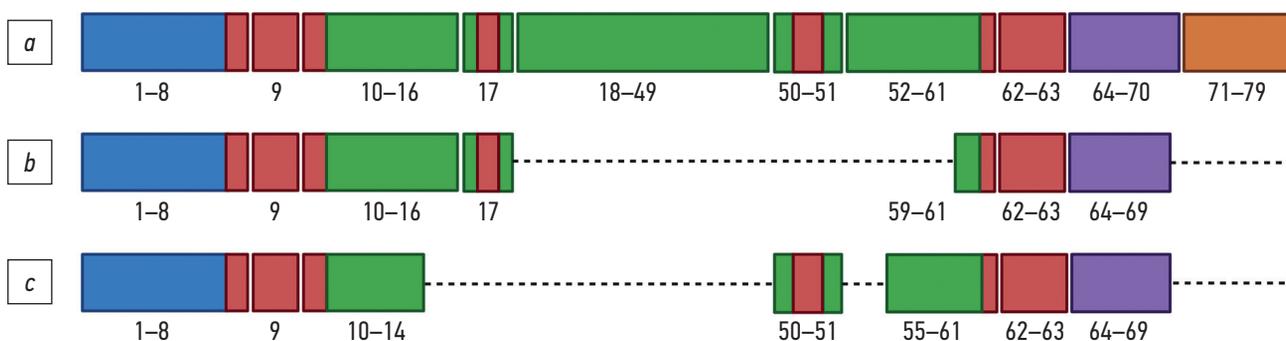


Рис. 2. Схематическое изображение: *a* — полноразмерного гена *DMD*; *b* — укороченной формы гена *DMD*, используемой в клинических исследованиях компанией Sarepta-Roche; *c* — укороченной формы гена *DMD*, используемой в клинических исследованиях компанией Pfizer. Цвет каждого экзона соответствует белковому домену, который он кодирует: актин-связывающий домен выделен синим цветом; шарнирные области — красным; центральный стержневой домен — зелёным; область, богатая цистеином — фиолетовым; а С-концевой домен — оранжевым.

Fig. 2. Illustration: *a*, full-size *DMD*; *b*, shortened *DMD* form evaluated in clinical studies by Sarepta-Roche; *c*, shortened *DMD* form evaluated in clinical studies by Pfizer. Every exon is colored to match the protein domain it encodes: blue for actin-binding domain; red for hinge regions; green for central rod domain; purple for cysteine-rich region; orange for C-terminal domain.

что различные укороченные формы дистрофина могут улучшить функциональные показатели. На основе результатов данных работ проводятся многие современные клинические исследования различных препаратов микродистрофина (см. рис. 2) [46].

Изучение различных вариантов микродистрофина с использованием векторов на основе различных серотипов AAV продолжается и в настоящее время [47]. Для достижения высокой эффективности такой терапии, как было описано выше, необходимо использовать достаточно высокую дозу препарата, что обеспечивается высокой дозой вирусных векторов. Это связано с тем, что количество вирусных векторов рассчитывается исходя из массы тела, а средний возраст пациента с МДД, получающего лечение, составляет 4–5 лет. В России средний возраст постановки диагноза — 6,5 года [48], соответственно для более взрослых пациентов будет необходим ещё больший объём вируса, который с большей вероятностью может спровоцировать нежелательную иммунную реакцию (подробнее об этом рассмотрено далее). По результатам первой фазы клинических исследований микродистрофина (деландистроген моксепарвовек*) в большинстве мышечных волокон наблюдалась его устойчивая экспрессия [45]. Но результаты третьей фазы показали отсутствие статистически значимых различий между группами пациентов, принимающих препарат или плацебо. Ввиду вышесказанного можно предположить, что даже значимого повышения экспрессии укороченной формы дистрофина недостаточно для компенсации функции полноразмерного белка [37]. Однако для подобных выводов необходимо дождаться клинических исследований других препаратов на основе микродистрофина, и, возможно, более длительное наблюдение за пациентами позволит достигнуть статистической значимости результатов. Кроме того, в последнее время активно разрабатываются альтернативные

способы доставки, такие как нановезикулы. Они имеют высокую биосовместимость и способны преодолевать различные тканевые барьеры. Кроме того, нановезикулы обладают высокой пакующей способностью, благодаря чему могут потенциально применяться для доставки кДНК полноразмерного дистрофина [49].

Скорость деления клеток

Возможность поддерживать экспрессию дистрофина после терапии на необходимом уровне в течение длительного времени остаётся неизвестной. Кардиомиоциты считаются долгоживущими клетками и имеют низкую скорость обновления, поэтому в данном типе мышечной ткани коррекция дистрофина будет длительной. Однако в скелетных мышцах взрослого человека достаточно сложно оценить скорость обновления клеток, особенно при МДД. Регенерация мышечного волокна происходит благодаря слиянию миосателлитов с повреждёнными миофибриллами [50], а образование нового мышечного волокна — путём размножения миосателлитных клеток, эффективное редактирование которых может быть затруднено [51]. Вследствие этого возникает опасение, что при каждом цикле регенерации клеток отредактированные миобласты будут разбавляться неотредактированными, образовавшимися из миосателлитов, и это будет приводить к потере ДНК AAV, кодирующей трансген микродистрофина; к постепенному снижению экспрессии белка и прогрессированию заболевания. Однако в недавних исследованиях было продемонстрировано, что AAV может эффективно трансдуцировать сателлитные мышечные клетки, а с помощью системы CRISPR/Cas происходит редактирование патогенного варианта нуклеотидной последовательности гена *DMD* [52, 53]. При этом показано восстановление экспрессии дистрофина и частичное восстановление функций

дистрофических мышц [54]. Так, редактирование миосателлитных клеток позволит избежать иммунных осложнений, связанных с повторным введением препарата, подробности которых раскрыты ниже.

Доставка

Поперечнополосатая мышечная ткань, которая поражается при МДД, составляет почти 40% массы тела человека [55]. И в скелетную, и в сердечную мышцы достаточно трудно доставлять генетические конструкции как из-за их физического разделения фасциями, так и из-за высокого уровня организации мембраны сарколеммы, которая имеет большое число инвагинаций, называемых Т-трубочками. Поэтому эффективная доставка компонентов генной терапии к поражённым мышечным тканям является нерешённой проблемой [56].

В настоящее время в терапии МДД применяют вирусные и невирусные методы доставки. Используют такие вирусные векторы, как аденовирусные, AAV и лентивирусные. Аденовирусные векторы обладают наибольшей пакующей способностью (до 34 Кб) и не интегрируют в геном, но характеризуются высокой цитотоксичностью и иммуногенностью [57]. Лентивирусные векторы интегрируют в геном, обладают средней пакующей способностью (до 8 Кб), хотя по сравнению с аденовирусами требуют меньшего вирусного титра для эффективной доставки [58]. На сегодняшний день наиболее изученными и часто применяемыми векторами являются AAV [59]. Они могут эффективно трансдуцировать постмитотические ткани, обладают естественным тропизмом к мышечной ткани, способны долговременно экспрессировать целевой трансген и являются более безопасными по сравнению с аденовирусами или лентивирусами благодаря более низкой иммуногенности и почти полному отсутствию способности к интеграции в геном [60]. Данный метод применяется для доставки не только усечённых форм дистрофина, но и компонентов системы редактирования генома, таких как CRISPR/Cas9. Важно отметить, что при использовании данного метода доставки возможно добиться селективной экспрессии нуклеазы Cas9 только в мышечных клетках благодаря использованию специфических промоторов. В сочетании с избирательным тропизмом некоторых серотипов вируса к мышечной ткани достигается достаточно высокий уровень клеточной специфичности [61]. Недостатком подхода является то, что AAV имеет небольшую пакующую способность по сравнению с другими вирусными векторами. Открытая рамка считывания белка SpCas9 составляет около 4,2 кб, что практически соответствует максимальной пакующей ёмкости AAV (оптимально — от 4,1 до 4,9 кб) [62]. Поэтому для такого типа белка Cas9 необходимо использовать дополнительный вектор, отдельно несущий малую направляющую РНК для таргетирования нуклеазы [63]. Возможно также применять другой тип белка Cas9, имеющий меньший размер, что позволит использовать только один вектор.

С помощью белка SaCas9, имеющего размер около 3,2 кб, и только одного вектора для доставки было осуществлено редактирование в мышечных моделях *mdx* [54]. Однако SaCas9 обладает значительно меньшей эффективностью редактирования по сравнению с SpCas9 [64].

Компоненты генной терапии также могут быть доставлены с помощью невирусных методов. Электропорация позволяет доставлять генетические конструкции путём создания нанометровых пор в клеточной мембране с помощью электрического тока высокого напряжения. Такой метод был использован для доставки системы CRISPR/Cas9 непосредственно в скелетные мышцы мышей *mdx*. При этом было показано функциональное восстановление экспрессии дистрофина [54]. Главным недостатком метода является высокая смертность клеток, вызванная импульсами электрического тока, что вносит ограничения при его использовании *in vivo*. Ещё одним невирусным способом доставки может быть липофекция — метод, при котором эффекторные молекулы упаковывают в липидную везикулу, способную проникать через клеточную мембрану [65]. Трансфицирующие агенты в этом случае не обладают иммуногенностью и менее цитотоксичны по сравнению с электропорацией, но не способны к целевой доставке в нужную ткань или орган. Исследуют также подходы, основанные на временной доставке компонентов редактирования генома в виде мРНК и рибонуклеопротеинов, применение которых позволит снизить цитотоксичность и нецелевые эффекты [66]. В настоящее время активно разрабатывают новые, более эффективные способы доставки, включая наноразмерные внеклеточные везикулы, обладающие значительным терапевтическим потенциалом. Однако производство данных везикул является дорогостоящим, а также характеризуется многими технологическими ограничениями, что существенно затрудняет внедрение данного метода в клиническую практику [67].

Иммунный ответ

При МДД полноразмерный дистрофин отсутствует с рождения и является по сути чужеродным антигеном в случае его появления в организме, в том числе в виде микродистрофина. Так, при изучении внутривенного введения AAV, содержащего трансген микродистрофина, у некоторых пациентов наблюдали побочные реакции в виде слабости проксимальных и дистальных мышц конечностей, дыхательных мышц. Наблюдали также признаки миозита, миокардита, отёка мышц с инфильтрацией Т-клеток при биопсии. Продолжительность побочных реакций соответствовала продолжительности экспрессии трансгена, что позволило сделать предположение о иммунном ответе против дистрофина. По результатам иммуноферментного тестирования и картирования эпитопов антител была показана иммунологическая реактивность к области пептида, кодируемой экзонами 8–11, у пациентов с делециями в области от экзона 8 до экзона 21 [68].

Похожие результаты были обнаружены при исследовании пациента с делецией экзона с 3 по 17 [69].

Во время клинических исследований генотерапевтического препарата Элевидис (деландистроген моксипаровек*) были выявлены иммуноопосредованные реакции у пациентов с делециями в экзонах 8–9. Наблюдался симптомы иммуноопосредованного миозита, такие как мышечная слабость, дисфагия, нарушение дыхания (кашель, одышка), лихорадка, утомляемость и снижение массы тела. Данная иммунная реакция у детей имеет особо острое начало. Поэтому для пациентов с делециями в экзонах 8–9 такая терапия противопоказана. Кроме того, имеются ограничения для применения препарата у пациентов с делециями в экзонах с 1 по 17 и/или с 59 по 71, поскольку в этих случаях также есть риск развития тяжёлой иммуноопосредованной реакции миозита².

Стоит отметить, что примерно у половины пациентов с МДД обнаруживаются дистрофин-положительные ревертантные (здоровые) волокна, которые могут составлять до 7% от общего числа волокон [70]. Механизм данного феномена изучен недостаточно, но наиболее вероятной причиной являются соматический мозаицизм или появление дополнительной мутации, восстанавливающей рамку считывания [71]. Соответственно для таких пациентов дистрофин не должен распознаваться как чужеродный белок. Однако при крупных делециях восстановление рамки считывания не приведёт к появлению ранее утраченных эпитопов, на которые всё-таки будет реагировать иммунная система в случае их введения в организм в составе генной терапии [70].

Поскольку некоторые пациенты имеют Т-клетки, специфичные к дистрофину, и являются предварительно иммунизированными против различных эпитопов дистрофина [72], в настоящее время множество исследований посвящено поиску генов-паралогов дистрофина, кодирующих функционально похожие белки. Так, одним из альтернативных подходов к лечению может стать повышение экспрессии близкородственного белка утrophина. Данный белок является структурным и функциональным аутосомным паралогом дистрофина, кодируемым геном *UTRN* [73]. В фетальных мышечных клетках он может собираться в большой трансмембранный гликопротеиновый комплекс и связывать актиновые филаменты [74], а к взрослому возрасту обычно заменяется на дистрофин [75]. Повышение уровня утrophина может обеспечить целостность мышечных клеток, а также облегчить некоторые дистрофические симптомы. Так как данный белок является эндогенным, было исследовано несколько подходов для повышения его экспрессии, включая доставку трансгена и косвенные способы стимуляции активности промотора гена [76]. В исследовании

утrophина на мышечной модели *mdx*, имеющей дефицит дистрофина, продемонстрировано, что высокая экспрессия трансгена укороченной формы утrophина в скелетных и диафрагмальных мышцах может заметно снижать патологические симптомы [77]. Кроме того, для увеличения уровня экспрессии утrophина может быть использована система CRISPR/Cas9: белок Cas9, лишённый эндонуклеазной активности, обеспечивает таргетную доставку активатора транскрипции к промотору гена *UTRN* [78]. Продемонстрировано, что использование такой системы в миоцитах привело к увеличению экспрессии утrophина в 1,7–6,9 раза [79]. Ещё одним способом повысить экспрессию утrophина является введение малых молекул, активирующих транскрипцию гена *UTRN*. В 2017 году были проведены исследования препарата эзутромид*, которые, к сожалению, не показали эффективных результатов у пациентов с МДД. Исследования были приостановлены после второй фазы³.

Помимо дистрофина, антигеном для иммунной системы также может быть AAV, который широко распространён в популяциях людей [80]. Вследствие этого у человека в течение жизни вырабатывается и гуморальный, и клеточный иммунитет к данному вирусу. Уже имеющиеся в организме человека антитела могут блокировать трансдукцию вектором, снижая эффективность терапии, а вводимый AAV может приводить к гиперстимуляции иммунной системы [81]. В связи с этим перед введением препаратов на основе AAV важно убедиться в отсутствии антител к определённым серотипам вируса. После применения генной терапии необходимо наблюдать за ожидаемыми проявлениями побочных эффектов. Векторы AAV способны накапливаться в печени, тем самым создавая риск дозозависимой токсичности [82]. Кроме того, введение AAV индуцирует возникновение новых антител, что исключает возможность повторного введения вирусного препарата [83]. Возможными способами преодоления проблемы иммунного ответа против AAV являются плазмаферез, назначение иммуномодулирующих препаратов или подбор альтернативного серотипа вируса. Эффективность этих способов активно изучается [82].

Составляющие систем редактирования генома также являются чужеродными для организма. Среди инфекционных заболеваний человека существуют и те, что вызваны бактериями, обладающими нуклеазами семейства CRISPR/Cas9. Это приводит к выработке иммунитета к белку Cas9. С помощью иммуноферментного анализа было обнаружено наличие антител против SaCas9 и SpCas9 у 78 и 58% доноров соответственно. Показано, что у людей существует гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет к белкам Cas9, и это обязательно

² Elevidys. Режим доступа: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevidys> Дата обращения: 13.11.2024.

³ Phaseout DMD: a phase 2 clinical study to assess the activity and safety of utrophin modulation with ezutromid in ambulatory paediatric male subjects with duchenne muscular dystrophy (SMT C11005): clinical trial registration NCT02858362. 2019. Режим доступа: https://cdn.clinicaltrials.gov/large-docs/62/NCT02858362/Prot_000.pdf Дата обращения: 13.11.2024.

необходимо учитывать при разработке генной терапии [84]. Данная проблема может быть решена путём использования модифицированных белков Cas9, в которых для снижения распознавания иммунной системой модифицированы определённые иммунодоминантные эпитопы. При этом функции и специфичность белка полностью сохраняются [85].

Применение кортикостероидов, рутинно используемых у больных МДД, в целом снижает риск развития иммунного ответа за счёт воздействия на Т-клетки [72]. Однако большое разнообразие возможных антигенов при генной терапии накладывает существенные ограничения на перспективы её применения.

Последствия дефицита дистрофина

Ещё одним препятствием для применения генной терапии МДД являются необратимые патологические изменения, которые успели произойти в организме пациента до начала лечения. В настоящее время активно разрабатываются подходы, нацеленные на смягчение вторичных патологических механизмов, связанных с дефицитом дистрофина. Отсутствие данного белка приводит к разрушению дистрофин-ассоциированного комплекса, что повышает восприимчивость сарколеммы к повреждениям, возникающим при сокращении мышечного волокна. Происходит также нарушение регуляции кальция, что приводит к хроническому воспалению и фиброзу [11]. Повышенная концентрация кальция стимулирует выработку активных форм кислорода, что в свою очередь приводит к повышенному окислительному стрессу, который усугубляет дисрегуляцию кальция, вызывает дисфункцию митохондрий и воспаление [86]. Это является причиной нарушения выработки аденозинтрифосфата и метаболической дисфункции. Многие препараты, направленные на устранение данных последствий дефицита дистрофина, проходят клинические испытания [87]. Так, в случаях поздней установки диагноза сочетание генной терапии с препаратами, направленными на устранение последствий отсутствия дистрофина, может улучшить эффективность лечения. Не стоит также забывать о развитии возможностей более ранней клинической и молекулярно-генетической диагностики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генная терапия является перспективным и многообещающим подходом к лечению МДД. Однако, несмотря на значительные успехи, применение этой технологии сопряжено с рядом существенных ограничений. Часть из них связана с особенностями патогенеза МДД, структуры гена, вовлечением в процесс не только мышечной ткани, но и других систем организма. Часть ассоциирована с нежелательными побочными реакциями на компоненты генотерапевтических препаратов. Важно также отметить,

что несвоевременная диагностика и поздно начатое лечение создают ограничения для устранения накопленных изменений. С другой стороны, недостатки доступных методов лечения заставляют, несмотря на препятствия, активно работать над совершенствованием генной терапии МДД. Более глубокое понимание проблем поможет скорее привести к их решению.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Е.В. Куршакова — сбор и анализ литературных источников, подготовка и написание текста статьи; О.А. Левченко — сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи; А.В. Лавров — написание текста и редактирование статьи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Неприменимо.

Источники финансирования. Научное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00482).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные) без ссылок на источник.

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе не применима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contributions. E.V. Kurshakova — collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the text of the article; O.A. Levchenko — collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the text of the article, writing the text and editing the article; A.V. Lavrov — writing the text and editing the article. All authors approved the manuscript (version for publication) and agreed to take responsibility for all aspects of the work, ensuring the proper consideration and resolution of any issues related to the accuracy and integrity of any part of the study.

Ethics approval. Not applicable.

Funding sources. This work was supported by the grant of Russian Foundation for Basic Research (23-15-00482).

Disclosure of interests. The authors declare no relationships, activities, or interests over the past three years involving third parties (commercial or non-commercial) whose interests could be affected by the content of this article.

Statement of originality. The authors did not use any previously published material (text, illustrations, or data) in the preparation of this work.

Data availability statement. The editorial policy on data sharing does not apply to this paper, no new data has been collected or created.

Generative AI. No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Provenance and peer-review. This work was submitted to the journal on the authors' initiative and underwent the standard review process. The manuscript was reviewed by two external reviewers, one member of the editorial board and the journal's scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 2000;23(10):1456–1471. doi: 10.1002/1097-4598(200010)23:10<1456::aid-mus2>3.0.co;2-t
- Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, et al. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature*. 1990;344(6261):64–65. doi: 10.1038/344064a0
- Górecki DC, Monaco AP, Derry JM, et al. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet*. 1992;1(7):505–510. doi: 10.1093/hmg/1.7.505 EDN: IPBULT
- D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, et al. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet*. 1995;4(5):837–842. doi: 10.1093/hmg/4.5.837
- Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet*. 1993;4(1):77–81. doi: 10.1038/ng0593-77
- Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet*. 2002;359(9307):687–695. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7 EDN: DRTGLN
- Gao QQ, McNally EM. The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1223–1239. doi: 10.1002/cphy.c140048
- Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*. 1993;122(4):809–823. doi: 10.1083/jcb.122.4.809
- Omairi S, Hau KL, Collins-Hooper H, et al. Regulation of the dystrophin-associated glycoprotein complex composition by the metabolic properties of muscle fibres. *Sci Rep*. 2019;9(1):2770. doi: 10.1038/s41598-019-39532-4 EDN: FHHGIH
- Meyers TA, Townsend D. Cardiac pathophysiology and the future of cardiac therapies in duchenne muscular dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17):4098. doi: 10.3390/ijms20174098 EDN: VPMTFR
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 2002;82(2):291–329. doi: 10.1152/physrev.00028.2001
- Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM. *Duchenne muscular dystrophy*. Fourth edition. Oxford, New York: Oxford University Press; 2015. 320 p. doi: 10.1093/med/9780199681488.003.0007
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 1989;45(4):498–506.
- Le Rumeur E. Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015;15(3):14–20. doi: 10.17305/bjbm.2015.636
- Pikó H, Vancsó V, Nagy B, et al. Dystrophin gene analysis in Hungarian Duchenne/Becker muscular dystrophy families — detection of carrier status in symptomatic and asymptomatic female relatives. *Neuromuscul Disord*. 2009;19(2):108–112. doi: 10.1016/j.nmd.2008.10.011
- McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, et al. Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet*. 2018;391(10119):451–461. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32160-8
- Balaban B, Matthews DJ, Clayton GH, Carry T. Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect. *Am J Phys Med Rehabil*. 2005;84(11):843–850. doi: 10.1097/01.phm.0000184156.98671.d0
- McDonald CM, Sajeev G, Yao Z, et al. Deflazacort vs prednisone treatment for Duchenne muscular dystrophy: A meta-analysis of disease progression rates in recent multicenter clinical trials. *Muscle Nerve*. 2020;61(1):26–35. doi: 10.1002/mus.26736 EDN: MRXTVB
- Griggs RC, Miller JP, Greenberg CR, et al. Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2016;87(20):2123–2131. doi: 10.1212/WNL.0000000000003217
- Ward LM, Hadjiyannakis S, McMillan HJ, et al. Bone health and osteoporosis management of the patient with duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2018;142(Suppl. 2):S34–S42. doi: 10.1542/peds.2018-0333E
- Hoffman EP, Schwartz BD, Mengle-Gaw LJ, et al. Vamorolone trial in Duchenne muscular dystrophy shows dose-related improvement of muscle function. *Neurology*. 2019;93(13):e1312–e1323. doi: 10.1212/WNL.0000000000008168
- Keam SJ. Vamorolone: first approval. *Drugs*. 2024;84(1):111–117. doi: 10.1007/s40265-023-01986-2 EDN: MRCROY
- Bladen CL, 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. doi: 10.1002/humu.22758 EDN: UFQPHB
- Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age. *Annu Rev Med*. 2019;70:307–321. doi: 10.1146/annurev-med-041217-010829
- Komaki H, Takeshima Y, Matsumura T, et al. Viltolarsen in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients: A phase 1/2 study. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(12):2393–2408. doi: 10.1002/acn3.51235 EDN: RHXIMB
- Heo YA. Golodirsen: first approval. *Drugs*. 2020;80(3):329–333. doi: 10.1007/s40265-020-01267-2 EDN: IHMPCR

27. Lim KR, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:533–545. doi: 10.2147/DDDT.S97635 EDN: YXQCCH
28. Shirley M. Casimersen: first approval. *Drugs.* 2021;81(7):875–879. doi: 10.1007/s40265-021-01512-2 EDN: TOCOFI
29. Aartsma-Rus A, De Waele L, Houwen-Opstal S, et al. The dilemma of choice for duchenne patients eligible for exon 51 skipping the European experience. *J Neuromuscul Dis.* 2023;10(3):315–325. doi: 10.3233/JND-221648 EDN: RIGSIJ
30. *Eteplirsen. LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury.* Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555333/>
31. *Viltolarsen. LiverTox: Clinical and research information on drug-induced liver injury.* Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK588132/>
32. Peltz SW, Morsy M, Welch EM, Jacobson A. Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression. *Annu Rev Med.* 2013;64:407–425. doi: 10.1146/annurev-med-120611-144851 EDN: RLANYJ
33. Roy B, Friesen WJ, Tomizawa Y, et al. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(44):12508–12513. doi: 10.1073/pnas.1605336113
34. Finkel RS, Flanigan KM, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0081302
35. Mercuri E, Muntoni F, Osorio AN, et al. Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD Natural History Study. *J Comp Eff Res.* 2020;9(5):341–360. doi: 10.2217/ce-2019-0171 EDN: CZHIPM
36. McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, 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):1489–1498. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31611-2
37. Mendell JR, Muntoni F, McDonald CM, et al. AAV gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: the EMBARK phase 3 randomized trial. *Nat Med.* 2025;31(1):332–341. doi: 10.1038/s41591-024-03304-z EDN: XMKPEH
38. Sweeney HL, Barton ER. The dystrophin-associated glycoprotein complex: what parts can you do without? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13464–13466. doi: 10.1073/pnas.011510597
39. England SB, Nicholson LV, Johnson MA, et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature.* 1990;343(6254):180–182. doi: 10.1038/343180a0
40. Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med.* 2002;8(3):253–261. doi: 10.1038/nm0302-253
41. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 1989;244(4912):1578–1580. doi: 10.1126/science.2662404 EDN: IEADHH
42. Phelps SF, Hauser MA, Cole NM, et al. Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice. *Hum Mol Genet.* 1995;4(8):1251–1258. doi: 10.1093/hmg/4.8.1251 EDN: IPCGZN
43. Wells DJ, Wells KE, Asante EA, et al. Expression of human full-length and minidystrophin in transgenic mdx mice: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1995;4(8):1245–1250. doi: 10.1093/hmg/4.8.1245 EDN: IPCGZD
44. Hoy SM. Delandistrogene moxeparvovec: first approval. *Drugs.* 2023;83(14):1323–1329. doi: 10.1007/s40265-023-01929-x EDN: VMKDOA
45. Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, et al. Assessment of systemic delivery of raa-vrh74.mhck7.micro-dystrophin in children with duchenne muscular dystrophy: a nonrandomized controlled trial. *JAMA Neurol.* 2020;77(9):1122–1131. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1484 EDN: ONUKNY
46. Boehler JF, Brown KJ, Beatka M, et al. Clinical potential of microdystrophin as a surrogate endpoint. *Neuromuscul Disord.* 2023;33(1):40–49. doi: 10.1016/j.nmd.2022.12.007 EDN: FTFEFG
47. Duan D. Micro-dystrophin gene therapy goes systemic in duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Gene Ther.* 2018;29(7):733–736. doi: 10.1089/hum.2018.012
48. Gremyakova TA, Artemyeva SB, Baybarina EN, et al. Consensus concept of modern effective therapy for duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Diseases.* 2023;13(2):10–19. doi: 10.17650/2222-8721-2023-13-2-10-19 EDN: RLIIPT
49. Oh SW, Han J, Park SS. Non-viral gene therapy for neuromuscular diseases including Duchenne muscular dystrophy using nanovesicles derived from human cells. *rdadj. OAE Publishing Inc.* 2024;3(4):N/A–N/A. doi: 10.20517/rdadj.2024.16 EDN: HHVWVJ
50. Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR correction of duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Med.* 2019;70:239–255. doi: 10.1146/annurev-med-081117-010451 EDN: YTCVAS
51. Arnett AL, Konieczny P, Ramos JN, et al. Adeno-associated viral (AAV) vectors do not efficiently target muscle satellite cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014;1:14038. doi: 10.1038/mtm.2014.38
52. Kwon JB, ETTYREDDY AR, Vankara A, et al. In vivo gene editing of muscle stem cells with adeno-associated viral vectors in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;19:320–329. doi: 10.1016/j.omtm.2020.09.016 EDN: CQVRHJ
53. Nance ME, Shi R, Hakim CH, et al. AAV9 edits muscle stem cells in normal and dystrophic adult mice. *Mol Ther.* 2019;27(9):1568–1585. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.06.012 EDN: JGZKVM
54. Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science.* 2016;351(6271):407–411. doi: 10.1126/science.aad5177
55. Collins CA, Partridge TA. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle.* 2005;4(10):1338–1341. doi: 10.4161/cc.4.10.2114
56. Padmaswari MH, Agrawal S, Jia MS, et al. Delivery challenges for CRISPR-Cas9 genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Biophys Rev (Melville).* 2023;4(1):011307. doi: 10.1063/5.0131452 EDN: IKCXGB
57. Matsunaga W, Gotoh A. Adenovirus as a vector and oncolytic virus. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(6):4826–4840. doi: 10.3390/cimb45060307 EDN: DUIQQN
58. Li X, Le Y, Zhang Z, et al. Viral vector-based gene therapy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7736. doi: 10.3390/ijms24097736

- 59.** Yuasa K, Miyagoe Y, Yamamoto K, et al. Effective restoration of dystrophin-associated proteins in vivo by adenovirus-mediated transfer of truncated dystrophin cDNAs. *FEBS Lett.* 1998;425(2):329–336. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00251-8 EDN: AAYNBB
- 60.** Costa Verdera H, Kuranda K, Mingozi F. AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer. *Mol Ther.* 2020;28(3):723–746. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.12.010 EDN: WPXEZQ
- 61.** 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):eaan8081. doi: 10.1126/scitranslmed.aan8081 EDN: YFAEJV Erratum in: *Sci Transl Med.* 2018;10(425):eaat0240. doi: 10.1126/scitranslmed.aat0240
- 62.** Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther.* 1996;7(17):2101–2112. doi: 10.1089/hum.1996.7.17-2101
- 63.** Grounds MD. Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(11):1621–1625. doi: 10.1007/s00018-008-7574-8 EDN: PXALUH
- 64.** Li F, Wing K, Wang JH, et al. Comparison of CRISPR/Cas endonucleases for in vivo retinal gene editing. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:570917. doi: 10.3389/fncel.2020.570917 EDN: PYSccb
- 65.** Xu L, Park KH, Zhao L, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in *mdx* mice. *Mol Ther.* 2016;24(3):564–569. doi: 10.1038/mt.2015.192 EDN: WTYTIR
- 66.** Tsuchida CA, Wasko KM, Hamilton JR, Doudna JA. Targeted nonviral delivery of genome editors *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(11):e2307796121. doi: 10.1073/pnas.2307796121 EDN: VSVpYS
- 67.** Miller JB, Zhang S, Kos P, et al. Non-viral CRISPR/Cas gene editing in vitro and in vivo enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017;56(4):1059–1063. doi: 10.1002/anie.201610209 EDN: YWRCTZ
- 68.** Bönemann CG, Belluscio BA, Braun S, et al. Dystrophin immunity after gene therapy for Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2023;388(24):2294–2296. doi: 10.1056/NEJM202212912 EDN: VMQIQD
- 69.** Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1429–1437. doi: 10.1056/NEJMoa1000228
- 70.** Fanin M, Danieli GA, Cadaldini M, et al. Dystrophin-positive fibers in Duchenne dystrophy: origin and correlation to clinical course. *Muscle Nerve.* 1995;18(10):1115–1120. doi: 10.1002/mus.880181007
- 71.** Klein CJ, Covert DD, Bulman DE, et al. Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am J Hum Genet.* 1992;50(5):950–959.
- 72.** Flanigan KM, Campbell K, Viollet L, et al. Anti-dystrophin T cell responses in Duchenne muscular dystrophy: prevalence and a glucocorticoid treatment effect. *Hum Gene Ther.* 2013;24(9):797–806. doi: 10.1089/hum.2013.092
- 73.** Love DR, Hill DF, Dickson G, et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature.* 1989;339(6219):55–58. doi: 10.1038/339055a0
- 74.** Rosenberg RN, Pascual JM. *Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease.* Elsevier; 2020. P. 1–806.
- 75.** Clerk A, Morris GE, Dubowitz V, et al. Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochem J.* 1993;25(8):554–561. doi: 10.1007/BF02388063
- 76.** Soblechero-Martín P, López-Martínez A, de la Puente-Ovejero L, et al. Utrophin modulator drugs as potential therapies for Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021;47(6):711–723. doi: 10.1111/nan.12735 EDN: UDHHGO
- 77.** Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, et al. Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature.* 1996;384(6607):349–353. doi: 10.1038/384349a0
- 78.** Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 2013;152(5):1173–1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022 EDN: YAEWRE
- 79.** Wojtal D, Kemaladewi DU, Malam Z, et al. Spell checking nature: versatility of CRISPR/Cas9 for developing treatments for inherited disorders. *Am J Hum Genet.* 2016;98(1):90–101. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.012 EDN: WTLFVL
- 80.** Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* 2004;78(12):6381–6388. doi: 10.1128/JVI.78.12.6381-6388.2004
- 81.** Yang Y, Haecker SE, Su Q, Wilson JM. Immunology of gene therapy with adenoviral vectors in mouse skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 1996;5(11):1703–1712. doi: 10.1093/hmg/5.11.1703 EDN: IPBAHX
- 82.** Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on microdystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther.* 2014;22(2):338–347. doi: 10.1038/mt.2013.244
- 83.** Halbert CL, Rutledge EA, Allen JM, et al. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol.* 2000;74(3):1524–1532. doi: 10.1128/jvi.74.3.1524-1532.2000
- 84.** Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med.* 2019;25(2):249–254. doi: 10.1038/s41591-018-0326-x EDN: WYXYJ
- 85.** Ferdosi SR, Ewaisha R, Moghadam F, et al. Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes. *Nat Commun.* 2019;10(1):1842. doi: 10.1038/s41467-019-09693-x EDN: SAABLB
- 86.** Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC. Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca²⁺, reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. *Physiol Rev.* 2016;96(1):253–305. doi: 10.1152/physrev.00007.2015 EDN: WPABZB
- 87.** Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Current Opinion in Pharmacology.* Elsevier. 2017;34:36–48.

ОБ АВТОРАХ

*** Куршакова Елизавета Владимировна;**

адрес: 115522, Россия, Москва, ул. Москворечье, д. 1;
ORCID: 0009-0007-2296-2031;
e-mail: kurshakovalv@mail.ru

Левченко Ольга Александровна, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0001-9465-4213;
eLibrary SPIN: 3625-4111;
e-mail: olevchenko@med-gen.ru

Лавров Александр Вячеславович, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0003-4962-6947;
eLibrary SPIN: 4926-8347;
e-mail: alexandervlavrov@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

*** Elizaveta V. Kurshakova;**

address: 1 Moskvorechie st, Moscow, Russia, 115478;
ORCID: 0009-0007-2296-2031;
e-mail: kurshakovalv@mail.ru

Olga A. Levchenko, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0001-9465-4213;
eLibrary SPIN: 3625-4111;
e-mail: olevchenko@med-gen.ru

Alexander V. Lavrov, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0003-4962-6947;
eLibrary SPIN: 4926-8347;
e-mail: alexandervlavrov@gmail.com