

ОБЗОРЫ

ГЕННО–КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

Р.В. Деев^{1,2}, *М.О. Мавликеев*², *И.Я. Бозо*^{1,3}, *А.А. Пулин*⁴, *И.И. Еремин*⁴

¹ *Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия*

² *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

³ *Московский государственный медико–стоматологический университет им. А. И. Евдокимова, Москва, Россия*

⁴ *Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва*

Gene- and cell-based therapy of muscle system hereditary disorders: state-of-art

R.V. Deev^{1,2}, *M.O. Mavlikeev*², *I.Ya. Bozo*^{1,3}, *A.A. Pulin*⁴, *I.I. Eremin*⁴

¹ *Human Stem Cell Institute, Moscow, Russia*

² *Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

³ *A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia*

⁴ *A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia*

Генетические заболевания, приводящие к первичному поражению скелетной мышечной ткани, могут быть обусловлены дисфункцией более чем 30 генов. Сегодня не существует эффективных способов их этиотропного и патогенетического лечения. Исследователи сосредотачивают свои усилия на поиске новых терапевтических средств, относящихся к генным и клеточным технологиям, а также использованию малых молекул. В мире проведен большой пул доклинических исследований, а также выполнены несколько десятков клинических исследований. К сожалению, испытанные технологии пока не привели к существенному прогрессу в лечении пациентов с данными заболеваниями. Вместе с тем, полученные данные позволяют определить наиболее целесообразные направления дальнейших разработок — совмещение методик коррекции генома с клеточной доставкой исправленного генома в скелетную мышечную ткань.

Настоящий обзор призван дать общие представления об этиологии генетических заболеваний мышц скелета, основных направлениях биотехнологических разработок и результатах выполненных клинических исследований.

Ключевые слова: мышечные дистрофии, миодистрофия Дюшенна, клеточная терапия, генная терапия, клинические исследования.

1. Проблема наследственных заболеваний мышечной системы

Как правило, значительный вклад в актуальность той или иной проблемы для медицинской науки приносят ее недостаточная изученность — несовершенство наших исследовательских инструментов для вскрытия генетической и молекулярной сущности этиологии и патоморфогенеза; неспособность современных лечебно-диагностических технологий к своевременному распознаванию, точной идентификации, этиотропному лечению болезней и эффективной профилактики их причины. Все это в полной мере справедливо в отношении наследственных заболеваний мышечной системы — группы болезней, характеризующихся непрерывно-прогредиентным поражением мышечной ткани (скелетной поперечно-полосатой, сердечной и др.).

Наследственные заболевания мышечной системы относятся к миопатиям — сборной когорте болезней, характеризующейся первичным пораже-

e-mail: romdey@gmail.com

Genetic disorders primarily affecting skeletal muscles can be caused by dysfunction of more than 30 genes. To date there is no effective etiotropic and pathogenetic treatment of such disorders. Investigators focus on search for new therapeutic agents based on gene and cell technologies, small molecules as well. There are numerous preclinical and several dozens of clinical studies in the world. Unfortunately tested technologies did not lead to significant advance in treatment of patients with such disorders. At the same time resulting data allow to determine the most feasible directions of future development — combining of genome correction methods with cell delivery of corrected genome to skeletal muscles.

This review is intended to give general information about etiology of skeletal muscles genetic disorders, the main directions of biotechnological development and results of the clinical studies.

Keywords: muscular dystrophy, Duchenne muscular dystrophy, cell therapy, gene therapy, clinical trials.

нием скелетной мышечной ткани [1]. В настоящее время отсутствует общеупотребимая универсальная классификация этих болезней. Условно их подразделяют на врожденные миопатии, миодистрофии — заболевания, сопровождающиеся некрозом мышечной ткани и развивающиеся после рождения, миотоническую дистрофию и др. Одновременное использование нескольких классификационных критериев позволяет выделить: а) по времени дебюта — врожденные болезни и развивающиеся после рождения; б) по типу наследования — для заболеваний с менделевским типом наследования — аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, X-сцепленные; в) по топографии пораженных мышц — пояснично-конечностные, лице-плече-лопаточные, орофарингиальные и др., которые в совокупности составляют группу прогрессирующих мышечных дистрофий [2]. По мере расшифровки молекулярной и генетической природы этих болезней все прочнее в практику входят классификации, базирующиеся на знании генов,

чья функция нарушена в результате спонтанных и унаследованных мутаций. Важно отметить, что в группу врожденных миопатий помимо заболеваний, связанных с нарушением синтеза структурных белков мышечной ткани (миодистрофии) входят некоторые митохондриальные болезни (дефекты в генах митохондриальной ДНК) и «болезни накопления», связанные с нарушением ферментов мышечного волокна (напр. болезнь Помпе).

В зависимости от локализации (по отношению к мышечному волокну) белков, чьи гены подверглись повреждению, целесообразно выделить 7 групп таких заболеваний, связанных с повреждением: 1) белков внеклеточного матрикса (коллаген VI типа, мерозин – α -субъединица ламинина и др.); 2) белков базальной мембраны и сарколеммы (интегрины α 7, α 9); 3) белков сарколеммы (дистрофин, дисферлин, саркогликан и др.); 4) ферментов саркоплазмы (гликозилтрансферазы и др.); 5) эндоплазматической сети мышечного волокна (селенопротеин N1); 6) кариолеммы (ламини A/C,

эмерин и др.); 7) митохондрий (холинкиназа β) [1, 3–6]. Нарушения в структуре этих генов (миссенс-мутации, нонсенс-мутации, триплетные повторы и др.) приводят к нарушению синтеза белков – преждевременной остановке рамки считывания (короткий и нефункциональный белок), изменению нуклеотидной последовательности и др., что в фенотипе пациента проявляется нарушением или полным выпадением функции, выполняемой данной молекулой; наличие некоторых «мышечных» белков не только в мышечной ткани, но и в других часто обуславливает полиморфную клиническую картину с немускульными клиническими проявлениями – кардиомиопатия, энцефалопатия, поражение кожи и др. (рис. 1, табл. 1). Развивающиеся вслед за этим патоморфологические и патофизиологические сдвиги приводят к формированию закономерной гистологической и клинической картины при том или ином заболевании. Иными словами, в основе патоморфогенеза при данных болезнях лежит цепь: «ген-белок-функция-болезнь».

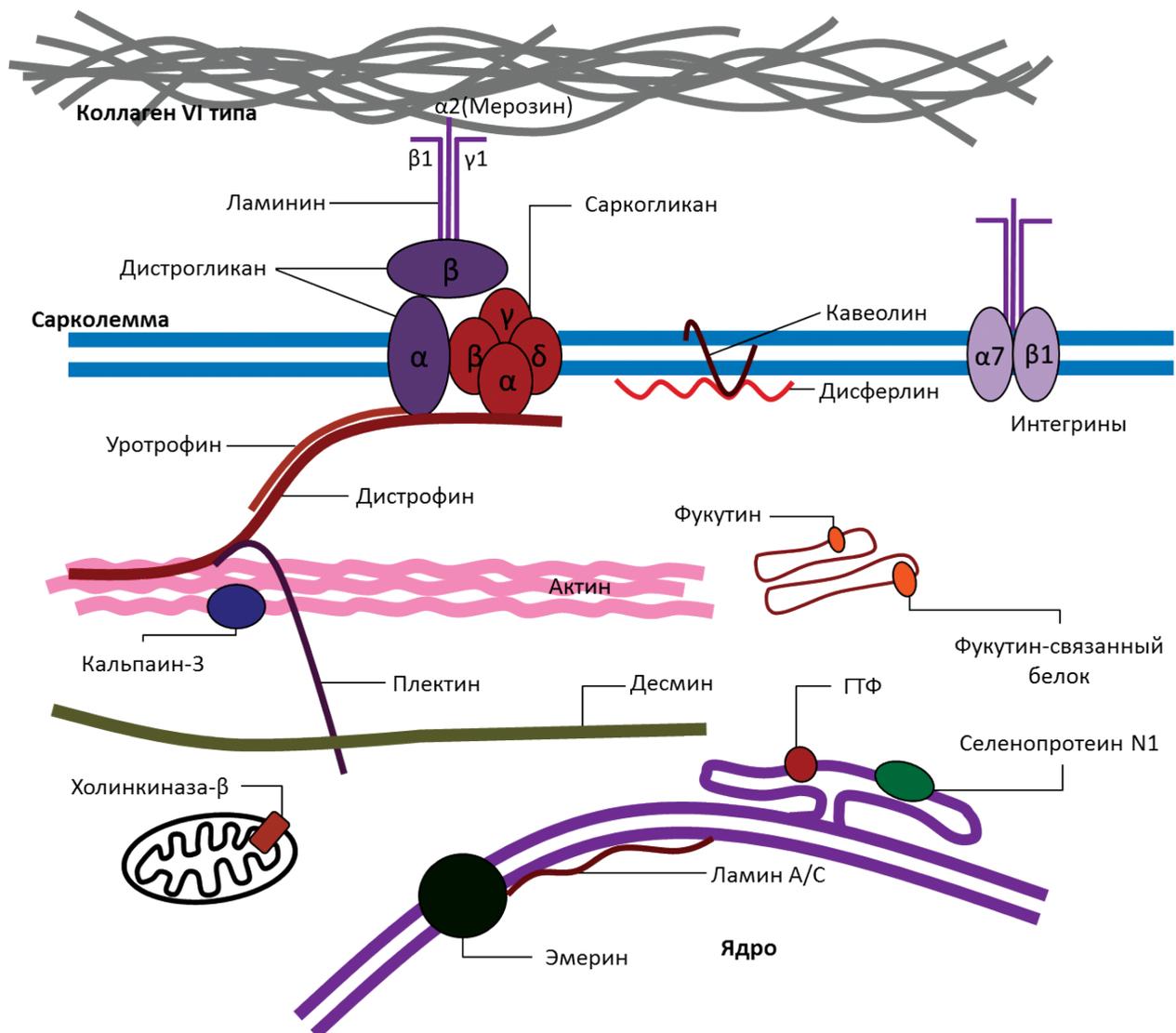


Рис. 1. Некоторые белки мышечного волокна, нарушения функции которых приводят к развитию миодистрофий

Таблица 1. Характеристика наиболее значимых наследственных болезней мышечной системы, связанных с нарушением функции белков мышечного волокна

Группа	Локализация дефектного белка	Ген	Белок	Функция белка	Общеклинические проявления мутации		Примеры болезней	Частота	Медиана выживания	Тип наследования и аббревиатура	Ссылки
					Манифестация, течение	Некоторые клинические проявления					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		LAMA2	Мерозин – $\alpha 2$ цепь ламинина	Осуществляет связь дистрогликанового комплекса с сарколеммой с коллагеном VI типа базальной мембраны мышечного волокна	В зависимости от степени выраженности дефицита – от врожденных тяжелых форм до начинающихся в раннем взрослом периоде. Чаще возраст дебюта – 1 год	Системная гипотония преимущественно в аксиальной и поясной мускулатуре; нарушение сосания, глотания, дыхания	Первичный дефицит мерозина	0,21:100 000	Нет данных	AR, MDC 1A	1, 7
	ВКМ	COL6A1 COL6A2 COL6A3	Коллаген VI типа	Входит в состав базальной мембраны мышечных волокон, является компонентом ВКМ дермы, кровеносных сосудов, сухожилий	Врожденная, раннее детство	Дистальная гиперэластичность, ретракция дистальных и аксиальных суставов; гипотония	Болезнь Ульриха, Болезнь Бетлема	Болезнь Ульриха – 0,13:100 000; Болезнь Бетлема – 0,77:100 000 Общая частота – 0,9:100 000	Нет данных	AR/AD, USMD, VM	1, 8
2	Базальная мембрана	ITGA7 ITGA9	Интегрин $\alpha 7$, - $\alpha 9$	Осуществляет связь сарколеммы с компонентами ВКМ	Врожденная	Гипотония, задержка психомоторного развития, преимущественно проксимальная мышечная атрофия, сколиоз, нарушение дыхания	Врожденная мышечная дистрофия, ассоциированная с первичным дефицитом интегрина- $\alpha 7$; врожденная мышечная дистрофия с гиперэластичностью суставов (дефицит интегрина- $\alpha 9$)	Описано 3 пациента с дефицитом альфа-7-интегрина и 14 с дефицитом альфа-9-интегрина	Нет данных	AR	1, 9, 10

3	DMD	Дистрофин	Стабилизация сарколеммы при осуществлении циклов сокращения/расслабление	Начало в детском возрасте	Прогрессирующая дистрофия проксимальных мышц, псевдогипертрофия голени, вовлечение дыхательных мышц и миокарда, задержка умственного развития в 30% случаев	Миодистрофия Дюшенна	1:3500 мальчиков (1:5000 девочек)	25 лет	X-сцепленное, DMD, BMD	9
	CAV3	Кавеолин 3	Входит в состав дистрофин-гликопротеинового комплекса, стабилизирует сарколемму, предположительно участвует в передаче нервного импульса	Начало в детском возрасте (около 5 лет); течение медленное или подострое	Характерны псевдогипертрофия мышц голени, умеренная слабость проксимальных мышц, крыловидные лопатки	Болезнь мышечных контрактур 2 типа, изолированная гиперКФКемия, дистальная миопатия (тип Татеяма), семейная гипертрофическая кардиомиопатия	1% от всех неуточненных ПКМД	Нет данных	АД, LGMD1C, RMD2, MPD1, SMN1	9, 11-16
	DAG1	α -, β -дистрогликаны	Осуществляют связь между базальной мембраной и белками саркоплазмы, связанными с актином	Начало в раннем детском периоде; течение подострое	Клиника поясно-конечностной мышечной дистрофии, ассоциировано с тяжелой задержкой умственного и физического развития	ПКМД2Р	Описан 1 пациент	?	AP, LGMD2P, MDDGC9	9, 17
	DYSF	Дисферлин	Трансмембранный протеин, принимающий участие в восстановлении целостности мембраны после повреждения-	Начало в раннем взрослом периоде; течение медленное	Атрофия мышц плечевого и тазового пояса, нижние конечности поражаются в большей степени с ранним вовлечением мышц заднего компартмента с атрофией голени, нет вовлечения	Дисферлинопатия, миопатия Миоши	0,5-1:100 000	?	AP, LGMD2B	9
				Подростковый возраст, ранний взрослый период (10-20 лет)	Медленно прогрессирующая дистрофия проксимальных мышц, псевдогипертрофия голени, часто дилатационная кардиомиопатия, задержка умственного развития редка	Миодистрофия Беккера	1:30 000	40 лет		

Сарколемма

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4		РОМТ1, РОМТ2, LARGE, GMPFB, ISPD и др.	Гликозил- трансферазы α -дистро- гликана	Ферменты, катализирующие реакцию переноса остатков моносахаридов от углевода-донора	Врожденные	Широкий спектр: от миопатических проявлений, от бессимптомной гиперКФкемии, поясных дистрофий до интеллектуального дефицита	Мышечные дистрофии- дистрогликанопатии врожденные с аномалиями строения глаз и мозга (тип А), врожденные с задержкой умственного развития (тип В), плече-конечностные (тип С)	15% всех врожденных мышечных заболеваний в Европе	?	AP, MDDGA1, MDDGB1, MDDGC1, MDDGA2, MDDGB2, MDDGC2 и др.	1
		PLEC1	Плектин 1	Входит в состав Z-дисков мышечных волокон, а также цитоскелет эпителиальных клеток	Начало в раннем детском возрасте; течение медленное	Задержка физического развития, слабость мышц плечевого и тазового пояса, люмбаальный лордоз. Описаны фенотипы с преимущественным поражением кожи и слизистых оболочек, а также других органов	ПКМД2Q, мышечная дистрофия с буллезным эпидермолизом, буллезный эпидермолиз с атрезией пилоруса	Описаны единичные случаи	ПКМД2Q – 30–40 лет	AP, LGMD2Q, MDEBS, EBS-PA	9, 20– 22
		CAPN3	Кальгаин 3	Внутриклеточная кальций-зависимая протеаза, модулирующая различные внутриклеточные киназы, фосфатазы, фосфолипазы. Предположительно вовлечена в восстановление сарколеммы после повреждения и перестройку цитоскелета	Начало в подростковом возрасте; течение умеренное или стремительное	Медленно прогрессирующая ПКМД с ранним вовлечением мышц тазового пояса, контрактурами лодыжек, локтевых суставов	ПКМД2A, тазово- бедренная мышечная дистрофия, кальпаинопатия, мышечная дистрофия Лейдена – Мебиуса	0,6:100 000	Нет данных	AP, редко АД, LGMD2A	9, 23

Саркоплазма

FKTN	Фукутин	Информации о функции белка недостаточно. Возможно, участвует в модификации дистрогликана	Начало с рождения или в раннем детском периоде; течение подострое	Генерализованная мышечная слабость, часто с врожденными аномалиями глаз и головного мозга	Врожденная мышечная дистрофия Фукуямы, дилатационная кардиомиопатия IX	Нет точных данных. Вторая по распространенности мышечная дистрофия в Японии, частота гетерозиготных носителей 1:90	Смерть до 20 лет, часто в первый год жизни	AP, FCMD, CMD1X, MDDGA4, MDDGB4, MDDGC4	1, 9, 24–27
DES	Десмин	Промежуточный филамент, контактирующий с Z-дисксом, связывающий контрактильный аппарат с сарколеммой, органеллами и ядром	Начало в раннем взрослом периоде	Прогрессирующая дистрофия дистальных мышц нижних конечностей с постепенным вовлечением других мышц, часто ассоциированная с AV-блокадой, блокадой ножек пучка Гиса, экстрасистолами	ПКМД2R, дилатационная кардиомиопатия 11, миофибрилярная миопатия 1, нейрогенный лопаточно-берцовый синдром типа Кезера	5:10 000	50–60 лет	AP, AD, LGMD2R, CMD11, MFM1, SCPNK	9, 28–32
FKRP	Фукутин-связанный протеин	Предположительная функция – химическая модификация α-дистрогликана, что обеспечивает взаимодействие сарколеммы и ВКМ; кроме мышц экспрессируется в нервной системе, в частности – активен при миграции нейронов	Начало в зависимости от формы или с рождения, или с возраста 1,-4 года до 6–23 лет; течение подострое; в случае синдрома Walker-Warburg, болезни «мышца-глаз-мозг» начало в раннем детском возрасте	Клиническая картина варьирует от тяжелой мышечной дистрофии с аномалиями строения головного мозга и глаз до ПКМД с/без задержки интеллектуального развития	ПКМД21, врожденная мышечная дистрофия, связанная с FKRP, синдром Walker-Warburg, болезнь «мышца-глаз-мозг»	Нет данных	Зависит от варианта, часто смерть в первый год жизни	AP, MDDGA5, MDDGB5, MDDGC5	1, 33–35
SEPN1	Селенопротеин N1	Предполагается участие белка в антиоксидантной системе клетки	Врожденные	Мышечная дистрофия	Мышечная дистрофия, врожденная миопатия, ригидность позвоночника	1:125 000	20 лет	AP, RSM1	9, 36, 37
5	ЭЛЕ								

Окончание таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6		LMNA	Ламины A/C	Обеспечение стабильности карิโอлеммы, ее разборки и сборки в ходе карิโอкинеза	1) врожденная мышечная дистрофия; 2) пациенты с манифестацией в более позднем или взрослом возрасте (15–30 лет) с быстрым прогрессированием	С преимущественным поражением: 1) попеременно-полосатых мышечных волокон; 2) жировой ткани; 3) периферических нервов; 4) с мультисистемными проявлениями	ПКМД1В, ламинаопатия, дилатационная кардиомиопатия 1А, болезнь Шарко – Мари-Тута тип 2В1, дистрофия Эмери – Дрейфуса 2,3, семейная липодистрофия тип 2, врожденная мышечная дистрофия, прогерия Хатчинсона – Гилфорда	1:100 000	В зависимости от возраста манифестации (много вариантов различных мутаций и проявлений)	АД, AP, CMD1A, SMT2B1, EDMD2, EDMD3, HGPS, FPLD2, LGMD1B, L-CMD	9, 38
	Карิโอлема	EMD/STA	Эмерин	Химически связан с другими белками карิโอлеммы	Начало в раннем детском или подростковом возрасте (10-20 лет); течение медленное	Характерны ранние контрактуры локтевых суставов, ахиллова сухожилия, мышц шеи и пояснички, ригидный позвоночник, медленно прогрессирующая слабость мышц плеча и голени, блокады проводящей системы сердца	Миопатия Эмери – Дрейфуса X-сцепленная	Нет данных	30 лет	X-сцепленное, EMD1	9, 39, 40
7		СНКВ	Холинкиназа β	Фермент, катализирующий реакцию биосинтеза фосфатидилхолина	Начало с рождения или в раннем детстве, медленно прогрессирующее течение	Нарушение психомоторного развития, кардиомиопатия, судороги, микроцефалия	Митохондриальная врожденная мышечная дистрофия	Описан 21 пациент	20 лет	AP, MDCMC,	41, 42

Примечания: AP – аутосомно-рецессивный тип наследования; АД – аутосомно-доминантный тип наследования; ВКМ – внеклеточный матрикс; ПКМД – плече-конечностная мышечная дистрофия; КФК – креатинфосфокиназа.

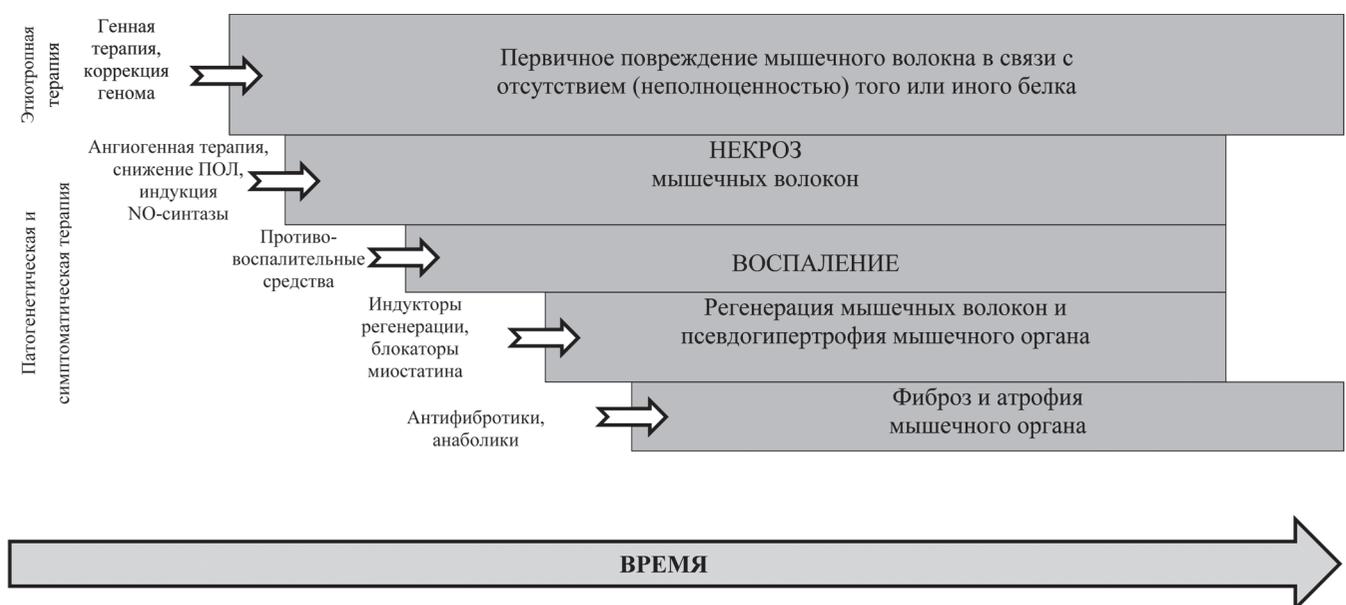
По данным 2014 г. описано не менее 31 гена, мутации в которых приводят к развитию миодистрофий, 8 из них наследуются по аутосомно-доминантному принципу и 23 — по аутосомно-рецессивному [3–5]. Эти заболевания характеризуются чрезвычайно пестрой клинической картиной, разными сроками клинической манифестации, различной степенью тяжести, зачастую нестандартными полиорганными проявлениями, которые не пока еще далеко не изучены с точки зрения надежных корреляций не только между геном/белком и проявлением в фенотипе, но и, что оказалось важным, между экзоном, в котором произошла та или иная мутация, и типом мутации. Вышеперечисленные причины, наряду с низкой информированностью об этих болезнях медицинских работников, приводят к поздней диагностике, сложностям в проведении дифференциально-диагностических мероприятий, а, следовательно, несвоевременному и низкому качеству оказания лечебной и профилактической помощи семьям с такими заболеваниями. Одной из граней этой проблемы является и малое количество современных биотехнологических разработок, в том числе предполагающих таргетное использование генных и (или) клеточных технологий для коррекции состояния мышечной ткани у пациентов.

Безусловным «флагманским направлением» в изучении и поиске средств решения проблемы остается X-сцепленная прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна (МДД), что объясняется высокой частотой заболевания — 1:3500–5000 мальчиков, драматическим течением — редкое дожитие до 25 лет. Так, по данным базы PubMed.com из 22 840 статей по запросу «muscular dystrophies» треть (7196) посвящены МДД. Похожая ситуация в мире и с клиническими исследованиями. Из 275 зарегистрированных клинических протоколов (включающих не только исследования безопасности и эффективности новых средств лечения, но и методы диагностики, наблюдательные программы, статистические и популяционные исследования с вовлечением пациентов и др.) 159 выполняется с участием пациентов, страдающих миодистрофией Дюшенна. Важно от-

метить, что протоколов, призванных изучить биотехнологические подходы к лечению наследственных заболеваний мышечной системы — генные и клеточные технологии, применение малых молекул — всего около трех десятков вне зависимости от нозологии. Таким образом, проблема своевременной диагностики и поисков эффективных средств борьбы с генетически обусловленными поражениями мышечной системы остается высокоактуальной и, безусловно, нерешенной.

2. Основные биофармацевтические подходы к коррекции наследственных заболеваний мышечной системы

Основные биофармацевтические подходы к лечению данной группы пациентов связаны с попыткой остановить развитие основных этапов патоморфогенеза заболевания. В общей и очень приблизительной схеме структурные и функциональные нарушения в мышцах включают несколько этапов: гибель дискретных мышечных волокон (некротическая стадия), что связывают с повреждением мембраны волокна, и выходом протеолитических ферментов (например, кальпаина) [43]; воспаление — как ответ организма на некроз; реактивная репаративная регенерация — постнатальный рабдомиогистогенез; замещение погибших объемов мышечного органа соединительной и жировой тканями, что в некоторых случаях приводит к визуальному увеличению мышц — ложной или истинной гипертрофии, а позднее — к их атрофии и субтотальной утрате функций [8, 44]; вовлечение в этот процесс дыхательной и глоточной мускулатуры, а также миокарда является предиктором фатального исхода болезни. Клиническую, лучевую и патоморфологическую диагностику существенно усложняет то, что данные процессы после определенного возрастного рубежа, характерного для каждого заболевания, являются не просто стадиями развития болезни, но параллельно происходящими в тканях явлениями, часто наслаивающимися друг на друга (рис. 2).



Примечание: ПОЛ — перекисное окисление липидов.

Рис. 2. Основные патоморфологические процессы (и одновременно — мишени для биофармтерапии), происходящие в мышцах при развитии миодистрофий (ПОЛ — перекисное окисление липидов)

Знания об основных этапах патоморфогенеза необходимы исследователям и разработчикам лекарственных или иных средств лечения для определения потенциально эффективных мишеней — звеньев и этапов патоморфогенеза для коррекции конкретного заболевания.

Примером рационального поиска молекулярных и клеточных таргетов для современных биотехнологических разработок может являться схема, предложенная Jain Foundation Inc. для изучения терапевтических эффектов различных агентов при коррекции поясно-конечностной мышечной дистрофии, связанной с мутацией в гене белка дисферлина (рис. 3).

Данная схема предполагает разработку лечебных средств как в зависимости от типа мутации (миссенс-мутации — посттрансляционная коррекция дефектного белка белками-шаперонами; заместительная клеточная терапия для выработки полноценного белка и др.; при нонсенс-мутациях — пропуск экзона и др.). В случаях, когда мутацию нельзя скорректировать на

этапах молекулярной реализации программы гена и деградация мышечных волокон уже проявляется в фенотипе, то для замедления этого процесса, а также воспаления и последующего фиброза могут быть применены способы их замедления, например, гормонотерапия, а также способы умеренной индукции репаративного рабдомиогенеза. В последние несколько лет существенное развитие получили экспериментальные способы коррекции генома, которые, несомненно, являются наиболее приближенными в настоящем контексте к понятию «этиотропного» лечения.

Таким образом, все методы могут быть разделены на три группы: предотвращающие синтез дефектного белка и деградацию мышечного волокна; стимулирующие репаративную регенерацию мышечной ткани; и — воздействующие на сопутствующие процессы — воспаление, фиброз и проч. Две последние группы могут быть объединены под общим заголовком «средства, снижающие проявления миодистрофического фенотипа».

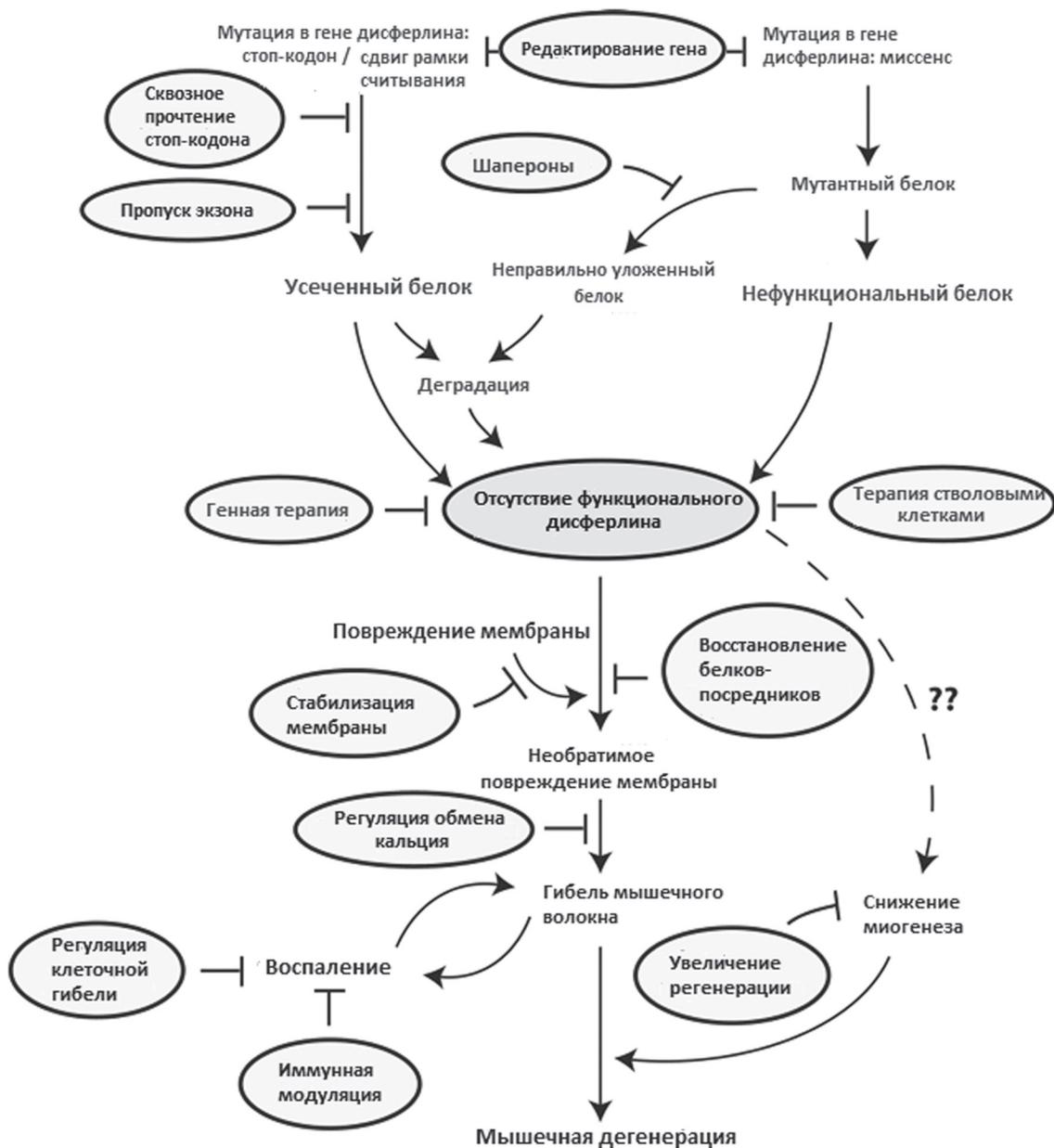


Рис. 3. Потенциально возможные терапевтические стратегии для коллекции поясно-конечностной мышечной дистрофии 2B [45]

2.1. Биофармацевтические технологии, предотвращающие синтез дефектного белка и деградацию мышечного волокна

В качестве терапевтических агентов могут быть использованы рекомбинантные протеины, терапевтические гены, доставленные вирусными и невирусными векторами, средства коррекции генома, антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК (siRNA) и др. Кроме этого, ранее в качестве перспективных терапевтических агентов рассматривались и различные виды клеток, некоторые авторы до сих пор склонны расценивать их как самостоятельные терапевтические агенты [46, 47]. Однако, накопленная информация позволяет расценивать различные популяции эукариотических клеток лишь как средства доставки исправленного генетического материала в мышечную ткань и непосредственно в мышечные волокна. Потенциально возможным исключением в этом смысле может являться трансплантация *in utero* [48, 49]. Скелетная мышечная ткань является одной из наиболее сложных мишеней для клеточной и генной терапии. Исследователи отмечают, что 640 мышц человеческого организма составляют около 40% массы взрослого человека. В этой связи доставка биофармацевтического средства в каждое пораженное волокно становится едва ли не самой сложной задачей этиотропного лечения наследственных поражений мышечной системы [50, 51], особенно, если учесть, что по оценкам специалистов ожидание успешного терапевтического эффекта возможно при трансфекции (для генной терапии) не менее 20–40% всех мышечных волокон [46]. Таким образом, биофармацевтические агенты нуждаются в эффективной доставке, для которой безопасно могут быть использованы, например, клетки, обладающие тропностью к мышечной ткани.

2.1.1. Рекомбинантные протеины и индукторы их выработки

Ввиду того, что большая часть белков мышечного волокна имеет сложную пространственную конформацию и несколько функциональных доменов, рекомбинантные протеины, как правило, оказываются неэффективны с точки зрения замещения функции поврежденных молекул. Вместе с тем, имеются примеры потенциально возможного дублирования структуры и функции неполноценного продукта. В частности, небесперспективным для пациентов с МДД является увеличение уровня ортолога дистрофина *утрофина* (*utrophin*¹) в мышечных волокнах больных пациентов, чтобы компенсировать отсутствие дистрофина [52, 53]. Данный белок выполняет функции дистрофина в пренатальном развитии, а после рождения замещается им, хотя в некоторых количествах остается в области моторных бляшек и мышечно-сухожильных переходов и у взрослых. Механизмы переключения с фетального белка на дефинитивный не известны в полной мере, вместе с тем этот процесс сам по себе является важной мишенью для коррекции многих наследственных болезней. У *mdx*-мышей (модель МДД) показано, что повышение уровня утрофина в дистрофичных мышечных волокнах может восстановить присутствие на сарколемме

участников дистрофин-ассоциированного белкового комплекса и снизить фенотипическое выражение миодистрофии [54, 55]. Исследователи оценили в эксперименте эффективность внутривенного введения рекомбинантных молекул утрофина и мини-утрофина [56].

Изучение механизма транскрипционного контроля утрофина позволило выявить новые мишени для фармакологического воздействия [57]. В частности, выявление промотора утрофина-А инициировало поиск малых молекул, которые могут стимулировать транскрипцию гена утрофина. Высокопроизводительный скрининг позволил идентифицировать ряд таких малых молекул – BMN195, SMT C1100 и др., которые сейчас исследуются на ранних фазах в клинике.

Некоторые авторы сообщают об иных подходах для увеличения уровня утрофина, основанных на применении RhoA, херегулина и L-аргинина и ингибирование кальпаина [57, 58], хотя не один из этих способов и не привел в эксперименте к существенному увеличению уровня утрофина.

Были изучены и другие соединения, относящиеся к категории малых молекул, однако их потенциальная эффективность для коррекции дефицита определенных белков остается дискуссионной [59].

2.1.2. Генная терапия

Генная терапия остается одним из немногих способов потенциально возможной коррекции состояния больных. В узком смысле она подразумевает использование вирусного и невирусного трансфера полноразмерных или мини-генов белков мышечной ткани, который приведет к выработке полноценного в структурно-функциональном смысле трансгена, способного компенсировать утраченную функцию мышечного органа. В широком смысле, к этиотропным способам коррекции также следует отнести методы пропуска экзонов (экзон-скиппинг), способы коррекции генома.

Невирусный генный трансфер (плазмидный вектор) несмотря на известную низкую эффективность, при внутривенном введении приводил к 10% увеличению синтеза дистрофина у *mdx*-мышей, с продолжительностью эффекта не менее 6 мес. [60]. В клинике проведено исследование по программе 1 фазы с включением 9 человек. Терапевтическую плазмиду вводили в *m. radialis* (принцип «лечение одной мышцы») в дозе от 200 до 600 мкг, однократно или двукратно с двухнедельным перерывом. Результат оценивали через 3 нед. Установлено, что местное введение плазмиды безопасно. Кроме того, показана трансфекция и синтез дистрофина частью мышечных волокон – 6% волокон имели восстановленный дистрофин в сарколемме, 26% волокон продемонстрировали частичное восстановление [61].

Вирусный генный трансфер, особенно с применением интегрирующихся в геном векторов, приводит к длительной или постоянной экспрессии трансгена, что наиболее предпочтительно в ситуации с наследственными заболеваниями [62]. Однако эта группа способов сопряжена с известными рисками, включая инсерционный мутагенез – например, в случае применения лентивирусных конструкций. Кроме этого,

¹ В некоторых источниках описывается как *атрофин*.

системная доставка подобных генотерапевтических конструкций с учетом объема мышечной ткани в организме ассоциирована с недопустимой вирусной нагрузкой, которую пришлось бы достичь при реализации этого подхода.

Имеются многочисленные сведения об успешной коррекции нарушений функции дистрофина у модельных животных при использовании генотерапевтических конструкций, изготовленных на платформе аденовирусов, аденоассоциированных вирусов (ААВ) [2, 6, 63, 64]. Последние характеризуются недостаточной для больших генов (дистрофин, дисферлин) емкостью капсида, что вынуждает исследователей оптимизировать технологию изготовления генотерапевтического препарата. Так, для коррекции миопатии Дюшенна в эксперименте применён оптимизированный ген дистрофина — «мини-дистрофин» («микро-дистрофин») [65–67]. Авторы получили устойчивую экспрессию белка у модельных животных в длительные сроки. В частности у приматов — от 5 мес. до 7 лет, причем при таргетном эндovasкулярном введении на ранних этапах дистрофин экспрессировали более 80% волокон [67–69]. У животных не было отмечено иммунных реакций ни на вирусную нагрузку, ни на трансген. Полученные результаты позволили перейти к клиническим исследованиям данной технологии.

В 2010 г. научная группа Изабель Ришар применила другой подход. В результате естественной способности ААВ векторов к конкатемеризации происходит объединение двух частей кДНК и экспрессия полноразмерного белка дисферлина [70]. Внутримышечная инъекция двух рекомбинантных ААВ в мышцу модельным мышам линии A/J привела к экспрессии полноразмерного дисферлина, продолжающейся, по крайней мере, в течение одного года. Важно, что системная инъекция в хвостовую вену мышей этих двух векторов привела к системной, хотя и слабой, экспрессии белка. Оптимизировав данную технологию, авторы считают ее готовой для апробации в клинических исследованиях [71]. Показана краткосрочная и долгосрочная безопасность системного введения ААВ, а также определенная тропность некоторых их серотипов к мышечной и другим тканям [72, 73]. Продемонстрировано, что доставка ААВ активатора промотора атрофина (artificial zinc finger transcription factor «Jazz») способствует компенсации состояния мышечной ткани в эксперименте [74].

2.1.3. Малые интерферирующие РНК

Применение малых интерферирующих РНК для предотвращения синтеза дефектных белков считается целесообразным у пациентов с доминантными формами миопатий [75]. Эту технологию начали активно разрабатывать в последние 5 лет. В ее основе лежит возможность создавать олигонуклеотидные последовательности РНК, которые связываются с комплементарными участками мутантного гена и предотвращают считывание патологической информации. Одним из ее очевидных преимуществ является возможность системного введения и одновременная коррекция состояния всех мышц, без превышения допустимой вирусной нагрузки. В случае доминантных заболеваний siRNA потребуют постоянного применения, т.к. весьма неустойчивы внутри клетки и оказывают лишь временный эффект.

2.1.4. Экзон-скиппинг

Метод пропуска поврежденных экзонов (exon skipping) предполагает «достройку» обходного параллельного пути для рамки считывания, минуя поврежденный экзон, что приводит к синтезу укороченного белка, который тем не менее может сохранить свою функциональность [76, 77]. Разработана технология создания и введения антисмысловых нуклеотидов, комплементарных пре-мРНК [77, 78]. Технически это достигается созданием: а) альтернативного экзона из антисмысловых олигонуклеотидов; б) псевдоэкзона и др. (рис. 4). Некоторые конструкции для экзон-скиппинга нуждаются в вирусной доставке; однако продвинутых фаз клинических исследований достигли безвирусные конструкции, чью химическую устойчивость в крови и связь с альбуминами обеспечивают при помощи связывания терапевтических олигонуклеотидов с морфолинами или другими агентами.

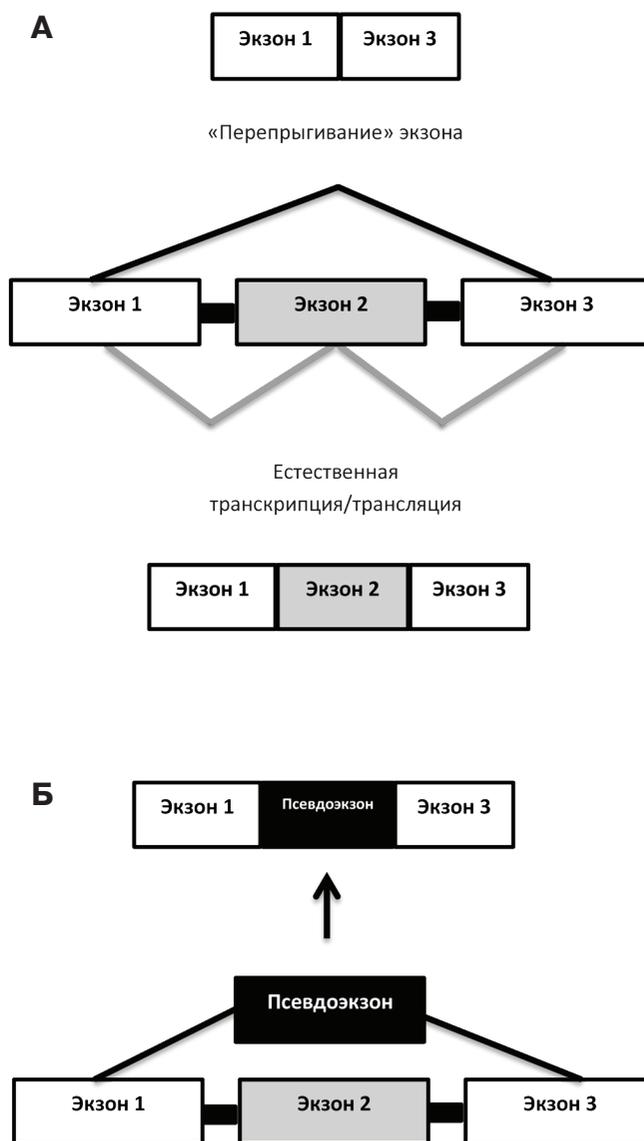


Рис. 4. Схема вариантов экзон-скиппинга: А — пропуск экзона с образованием укороченной мРНК или полипептидной цепи; Б — вставка псевдоэкзона. По [77] с изм.

Подход к лечению с помощью экзон-скиппинга можно назвать полуперсонифицированным, ведь созданная молекула обеспечит пропуск целого экзона вне зависимости от нуклеотида в его составе, в котором произошла мутация, а значит будет подходить большему числу пациентов, чье заболевание вызвано мутацией в конкретном экзоне.

В экспериментах с животными была показана потенциальная эффективность такого подхода для коррекции мутаций в гене дистрофина. Так, у *mdx*-мышей, золотистых ретриверов и спаниелей с миопатией Дюшенна/Беккера была продемонстрирована эффективность экзон-скиппинга при прямом внутривенном введении терапевтической конструкции [79-82]. Для предотвращения быстрого выведения из кровотока, конструкции наделяют способностью образовывать комплексы с альбуминами плазмы крови [83]. Полученные данные стали обоснованием проведения 1 фазы клинических исследований с конструкцией, имеющей название *Drisapersen* (PRO051, GSK2402968), разрабатываемый компанией *Prosensa/BioMarin/GlaxoSmithKline*, который в настоящее время находится на III фазе клинических исследований и *Eteplirsen* (AVI-4658) компании *AVI BioPharma/Sarepta Therapeutics* (II и III фазы клинических исследований). Оба препарата обеспечивают пропуск 51-го экзона гена дистрофина, обуславливающего заболевание у 13% больных. Несмотря на схожесть механизма действия, судя по всему *Drisapersen* не подтвердил высоких ожиданий в клинических исследованиях [84].

Интересной находкой стало то, что антибиотики группы аминогликозидов, в частности — гентамицин, показали в экспериментах на *mdx*-мышцах свойство снижать проявления миодистрофического фенотипа. Было показано, что он обладает способностью парировать преждевременную остановку трансляции в случаях нонсенс-мутаций (досрочный стоп-кодон). Потенциально этот эффект может оказаться полезным около 15% пациентов с миопатией Дюшенна, у которых заболевание связано именно с таким типом повреждения гена. На основе этого эффекта был создан прототип препарата *PTC124* (химически отличный от аминогликозидов), позже получивший название *Аталурен*. Несмотря на доказанную в экспериментах эффективность, в ходе клинических исследований результаты оказались неубедительными, хотя положительный эффект и был показан у 1/3 пациентов [84–86].

2.1.5. Коррекция генома

Известно несколько технологий коррекции генома, которые имеют потенциальные медицинские приложения [87]. Так, в 1996 г. была предложен способ точечного разрыва связей в ДНК (*in vitro*) при помощи т.н. Zn-фингерных эндонуклеаз (Zn-finger nuclease, ZFN), представляющих собой химерные белки, состоящие из двух частей — сайт-специфичной нуклеазы и «цинковых пальцев», узнающих один конкретный триплет нуклеотидов. Помимо значительного вклада в биоинженерию бактерий, растений и др. организмов, конструкции были испытаны в клинических исследованиях у пациентов с ВИЧ, являющихся гетерозиготами по мутации $\Delta 32$ в гене белка-рецептора *CCR5* [88, 89]. Опубликованные результаты свидетельствуют о безопасности методики и потенциальной пользе, приносимой

пациентам [90]. В настоящее время исследования продолжаются уже по программе I / II фазы [91–93]. Созданы конструкции, обеспечивающие синтез функционального дистрофина в клетках, полученных от пациентов с мутацией в 51 экзоне [94]; в доклинической стадии исследования установлена их безопасность и потенциальная эффективность.

Технология TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) имеющая ряд преимуществ перед ZFN [87], в частности — TALENs показывают меньшую неспецифичность к последовательностям ДНК и цитотоксичность по сравнению с ZFNs [95]. Разработана конструкция для таргетной коррекции у пациентов с мутацией в 51 экзоне [96], однако о дальнейших исследованиях с ней пока не сообщается.

Более эффективная техника прицельного двуцепочечного разрыва ДНК и сшивки их со свободными фрагментами при помощи CRISPR/Cas9 (узнавание системой CRISPR/Cas осуществляется за счет комплементарного взаимодействия между некодирующей РНК и ДНК целевых сайтов; данный молекулярный инструмент состоит из некодирующей РНК и белка Cas, обладающего нуклеазной активностью) позволило начать широко обрабатывать в доклинических исследованиях возможности коррекции болезней, в первую очередь предполагающих клеточную форму доставки исправленного генома путем трансплантации при гематологических (включая онкогематологические осложнения при HIV-инфекции) и метаболических заболеваниях [97–100]. Применение данной технологии в доклинических моделях для коррекции мышечных заболеваний пока еще не стало очевидным трендом, в значительной степени из-за того, что не решены технологические проблемы доставки исправленного генома в мышечную ткань реципиента. Коррекция мутации на уровне зиготы приводила к рождению различных по степени экспрессии дистрофина *mdx*-мышей — от 2 до 100% мышечных волокон экспрессировали белок [101, 102]. Перспективными для одновременной коррекции и доставки исследователи считают клетки с индуцированной плюрипотентностью (индуцированные плюрипотентные клетки, *Induced pluripotent stem cells*, *iPS*) [103].

2.1.6. Искусственные хромосомы

Создание искусственных хромосом человека (*Human Artificial Chromosome*, *HAC*) по методике «Top-down» [104] или «Bottom-up» [105] стало существенной вехой в разработке способов коррекции генома. В данном случае в лабораторных условиях изготавливается носитель генетической информации, обладающий всеми необходимыми свойствами хромосомы живой клетки — центромерой и теломерами, но несущей информационную кассету, содержащую терапевтические гены и гены, необходимые для регулирования *HAC*. При попадании в клетку она способна к репликации и передаче в дочерние клетки в случае деления [106].

M. Oshimura и *G. Cossu* (2009–2012) адаптировали данную технологию для коррекции патологии у *mdx*-мышей и др. моделей [107–109]. Авторы показали реализуемость коррекции *ex vivo* мышечных «миобластов» с дефицитом дистрофина и удовлетворительную эффективность при обратной транс-

плантации исправленных клеток в мышцы [108]. Также установлено, что аналогичным методом удается скорректировать клетки, полученные от пациентов с саркогликанопатией, а после индукции в них фенотипа iPSC и трансплантации иммунодефицитным мышам они способны к нормальному рабдомиогистогенезу с полноценной экспрессией саркогликана [109].

По методике V. Larionov [101] был создан прототип НАС, несущей ген дисферлина [110, 111]. После перенесения генной конструкции в клетки китайского хомячка был констатирован синтез целевого белка. Дальнейшее развитие этого направления должно показать возможность коррекции патологического мышечного фенотипа *in vitro* и *in vivo*.

Одним из наиболее труднореализуемых этапов данной технологии является эффективная доставка сконструированной хромосомы с терапевтической кассетой в необходимый тип клеток [106]. Для этого используется метод создания микровезикул (микроклеток) — *microcell-mediated chromosome transfer*. Однако, после генной коррекции *in vitro* исправленная популяция клеток должна обладать как свойством клоногенности — для эффективной экспансии *ex vivo*, таргетингом к скелетным мышцам, так и способностью к дифференцировке в миогенном направлении и (или) высокоактивным слиянием (*fusion*) со скелетными мышечными волокнами.

Таким образом, разнообразные методы лечебных манипуляций с геномом обладают потенциально различной реализуемостью и, что особенно важно, различными показаниями к применению того или иного метода. Так методы экзон-скиппинга могут быть реализованы только у тех пациентов, у которых мутации произошли в экзонах, для которых созданы или создаются корректирующие конструкции. По-видимому, для пациентов с редкими мутациями могут быть применимы остальные виды генной терапии. У пациентов с нонсенс-мутациями, средства переноса через стоп-кодон.

2.2. Коррекция миодистрофического фенотипа ткани (патогенетическая терапия; средства, оптимизирующие процесс регенерации)

2.2.1. Клеточная терапия

Несмотря на выдающиеся успехи тканевой инженерии в отношении мышц, в настоящее время клеточная терапия рассматривается не как самостоятельный способ лечения, способный существенно корректировать заболевание остановкой процесса деструкций мышечной ткани, а скорее как неспецифический индуктор регенерации [2], или как способ введения (вектор) для генетических конструкций, а также средство доставки исправленного генома в мышечные волокна, после генной модификации *ex vivo*.

Спектр клеток в тканевой нише поперечно-полосатого мышечного волокна весьма широк, особенно когда ткань находится в состоянии реактивных изменений — после начала процесса дегенерации или после травмы [112, 113]. Среди клеточных элементов в этом тканевом регионе могут быть обнаружены: одноядерные клетки рабдомиогенной линии —

гетерогенная линия миосателлитоцитов; клетки, мигрирующие с током крови; циркулирующие стволовые клетки — производные стромы костного мозга; интерстициальные клетки-предшественницы скелетной мышечной ткани; клетки-предшественницы, ассоциированные с сосудистой стенкой — «миогенные эндотелиальные клетки» — SK-34, пероциты и др. [64, 113–115].

Опыт применения клеточной трансплантации как в доклинических, так и в клинических исследованиях, включал в себя эмпирические попытки стабилизировать процесс миодегенерации без надлежащего теоретического обоснования — с использованием клеток немиеогенной линии; клеток миогенной линии — аллогенных и аутогенных одноядерных предшественников мышечных волокон («миобластов» — в терминологии зарубежных исследователей), гетерогенного фетального клеточного материала [116].

Следовательно, клетки, применяемые для коррекции системного поражения мышечной ткани, должны обладать рядом свойств, включающих потенциальную возможность мигрировать через сосудистую стенку после системного введения; способность к рабдомиогенной дифференцировке или, как минимум к феномену слияния (*fusion*) с существующими мышечными волокнами. После генерации новых мышечных волокон последние должны вступать в закономерные взаимодействия с двигательными нервными окончаниями и формированием нервно-мышечных соединений с функциональными ацетилхолиновыми рецепторами [117].

А) Немиеогенные клетки

Гемопозитические клетки (гемопозитические стволовые клетки, ГСК). Несмотря на то, что убедительных данных в пользу участия гемопозитических клеток в эмбриональном и постнатальном рабдомиогистогенезе нет, часть исследований была выполнена с этим клеточным материалом, полученным как из костного мозга, так и из пуповинной крови.

А.П. Киясов и соавт. в 1990 г., трансплантировав летально облученным мышам клеточную взвесь, полученную из скелетной мышечной ткани, установил феномен восстановления кровотока у экспериментальных животных [118]. Эта находка позволила предположить, что среди одноядерных клеток мышечной тканевой ниши имеются клетки, обладающие или гемопозитическими дифференцировочными потенциальными или бипотентные клетки-спутники, способные при определенных условиях к кровотоку, что в дальнейшем было подтверждено экспериментами с радиационными химерами [120, 121], и к рабдомиогистогенезу².

В период 1998–1999 гг несколько научных групп показали, что местное введение неадгезивной фракции клеток костного мозга мышам доноров приводит к тому, что часть из них участвует в рабдомиогистогенезе [122, 123]. Однако это явление регистрируется с очень низкой частотой — до 1%. Аналогичная тенденция подтверждается и клинической практикой — при выполнении аллогенной трансплантации ребенку с сочетанным X-сцепленным иммунодефицитом и миопатией Дюшенна через

² В литературе часть из этих клеток получила название *side population* — SP-клетки мышечной ткани, обладающие способностью вытеснять из своей цитоплазмы красители родамин 123 и Hoechst 33342, благодаря активности мембранного переносчика ABCG2, большинство из этих клеток не несут молекулы CD34, CD45, и c-kit [46, 122]; также описаны SP-клетки костного мозга.

13 лет среди ядер мышечных волокон обнаружены донорские в количестве 0,5–0,9% [123]. Анализ экспрессии дистрофина через 2,5 года после аллогенной трансплантации ГСК пуповинной крови показал, что без дополнительных лечебных мероприятий, обеспечивающих репопуляцию мышечной тканевой ниши или слияние с мышечными волокнами, данная методика неэффективна [124].

Исследование на большой группе пациентов с миодистрофией Дюшенна доказало, что у них среди циркулирующих клеток крови существенно повышен уровень CD133⁺CXCR4⁺CD34⁻, причем наблюдалась обратная корреляция с возрастом больного, а значит и степенью тяжести заболевания (декомпенсация) [125, 126]. Эта находка позволила предположить существенный вклад CD133⁺ популяции клеток, являющихся, как известно, чрезвычайно близкими к гемопоэтическим предшественникам, в тканевый гомеостаз мышцы и предложить проверить их эффективность в клинических исследованиях [127].

Б) «Условномиогенные» клетки

Одним из самых активно исследуемых направлений остается применение *мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток* (ММСК; стромальные клетки) для коррекции различных заболеваний, включая поражения скелетных мышц [114, 128]. Имеются данные экспериментов *in vitro* о возможностях их дифференцировки в миогенном направлении [129].

Мезоангиобласты — относительно недавно описанный вид клеток мезодермального происхождения, который впервые был выделен как особая субпопуляция в парааортальных тканях у мышей [130]. Установлено, что они не только обладают рабдомиогенным дифференцировочным потенциалом, но и характеризуются свойством самоподдержания и клоногенности в культуре, экспрессируют Sca-1, Flk-1, CD34, Mif-5, M-кадгерин [131, 132]. Последнее обстоятельство сделало их одним из основных кандидатов для трансплантационного лечения миопатий. В экспериментах у животных показано, что после системных и местных трансплантаций они сливаются с мышечными волокнами, причем это явление описано даже для аллогенных генномодифицированных мезоангиобластов. Привнесение таким образом в мышечные волокна генетического материала дало возможность корригировать клинические проявления миодистрофии как у мелких лабораторных животных, так и у собак [133, 134]. Важно, что эти клетки могут быть выделены не только из тканей здоровых животных, но и из образцов с генетическими моделями миопатий, что делает возможным их использование для генетической коррекции с целью последующей трансплантации [134]. На мышах с моделью саркогликанопатии показано, что модифицированные лентивирусом мезоангиобласты, будучи введенными интраартериально, обладают хомингом в мышечную ткань в состоянии деструкции и воспаления, способны интегрироваться в нее и после дифференцировки продуцировать полноценный саркогликан. Регулярные введения таких мезоангиобластов привело через 4 мес. к образованию до 50% положительных на саркогликан мышечных волокон [133]. Полученные результаты стали обоснованием

начала соответствующего клинического исследования [136].

Небезосновательной представляется точка зрения о том, что мезоангиобласты на самом деле, по крайней мере у человека, тождественны *перицитам*³ [137]. Последние, как показано, склонны к рабдомиогенной дифференцировке *in vivo* в реактивно измененном микроокружении [137–139].

В) Миогенные клетки

В зарубежной научной литературе под термином «*миобласты*» подразумевают малодифференцированные коммитированные в рабдомиогенном направлении клетки-предшественницы, являющиеся в нативной ткани следующей ступенью дифференцировки после миосателлитоцитов. Впервые наличие последних могло быть предположено после знаменитых опытов А.Н. Студицкого (1953) по ортотопической пересадке гомогенизированных аутоэксплантатов скелетной мышечной ткани у птиц [140]. Дальнейшие исследования привели к формированию современных представлений о существовании в поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани камбиального резерва, тесно ассоциированного с дефинитивными мышечными волокнами. Считается, что приоритет в описании миосателлитоцитов принадлежит А. Мауро (1961), который впервые описал эти клетки после электронномикроскопического изучения у амфибий между сарколеммой и базальной мембраной мышечного волокна; в дальнейшем эти клетки были подробно охарактеризованы как *in vivo*, так *in vitro* [113, 141, 142]. Поскольку давно показано их участие в репаративном процессе, были разработаны протоколы их выделения из мышечной ткани, в том числе с использованием селективных маркеров — Pax7 (помимо M-кадгерина, CD34, α 7 β 1-интегрина, CXCR4, синдекана-3, -4), а также протоколы экспансии *in vitro* и обратной трансплантации [143, 144]. Следует отметить, что маркеры этих клеток у лабораторных животных и человека различаются, так для человеческих «миобластов» характерна экспрессия N-CAM [145–147]. Установлено, что после возвращения в тканевую нишу, они способны как включаться в рабдомиогенез, так и самоподдерживать свою популяцию [148, 149]. В экспериментах «миобласты» трансплантировали животным с генетическими моделями различных миопатий: МДД [150–152], дисферлинопатией [153] саркогликанопатией [154] др. На сегодняшний день не вызывает сомнений низкая эффективность трансплантационного лечения аллогенными или ауто-«миобластами» без генетической модификации последних. Так, до 90% клеток при внутримышечном введении mdx-мышам погибает в первые 24 ч., около 5% остаются в покоящемся состоянии, и только оставшиеся 5% сливаются с мышечными волокнами, что может приводить к экспрессии дистрофина [155, 156]. Несмотря на весьма скромные результаты таких манипуляций в эксперименте, полученные результаты о потенциальной возможности хоминга и ортодоксальной дифференцировки стали обоснованием начала клинических исследований по применению этих клеток у пациентов с миодистрофиями. Однако и они в полной мере доказали, что свойства данного вида клеток, а именно их неспособность

³ В данном контексте подразумевается классическая трактовка понятия «перицит» — клетки, находящейся тотчас под базальной мембраной эндотелиоцитов сосудов мелкого калибра.

преодолевать сосудистую стенку при системном введении, низкая миграционная способность при внутримышечном введении, иммуногенность при аллогенном введении ограничивает их применение.

«Стволовые клетки, полученные из мышц» (*Muscle-Derived Stem Cells, MDSCs, интерстициальные стволовые клетки мышц*) считаются менее дифференцированными клетками чем миосателлиты; они локализованы в межмышечной соединительной ткани – эндомизии [112, 114, 157, 158]. Впервые были описаны у мышей, показано, что они могут быть поддержаны *in vitro* с сохранением миогенного дифференцировочного потенциала не менее 30 пассажей. Указывается, что они выживают после местной и внутриартериальной трансплантации, причем во втором случае способны мигрировать через сосудистую стенку в поврежденные мышцы, что в итоге приводит к экспрессии дистрофина в 12% волокон у mdx-мышей [159, 160]. В научной литературе имеются сведения об экспрессии ими недостаточного специфических молекул-маркеров – CD34, Sca-1, что не позволяет достоверно убедиться в самом факте существования данной группы клеток. Часть специалистов закономерно относятся к ее существованию весьма скептически, указывая, что протоколы их выделения не обеспечивают должную чистоту эксперимента и не исключают попадания в культуру миосателлитов, а, следовательно, и надежных данных об их потенциальной клинической пригодности нет [160, 161].

Миогенные клетки слизистой оболочки десны. Мультипотентные клетки стромального ряда из тканей десны были выделены относительно недавно – в 2010 г. [162–165]. Вскоре был показан их миогенный дифференцировочный потенциал. Так, В.Л. Зорин и соавт. (2014) продемонстрировали на клеточном материале от доноров-добровольцев, что данная субпопуляция дифференцируется с образованием мышечных трубочек при культивировании в монослое с высокой плотностью в среде DMEM/F12 с 20% FBS после смены ее на DMEM с низким содержанием глюкозы и 2% лошадиной сыворотки [165]. Авторы установили, что такая индукция миогенной дифференцировки результативна не только на первом, но и пятом или десятом пассажах. Причем, эффективность дифференцировки при пассировании сохранялась – площадь занимаемая миотубами всегда составляла около 20%, причем мышечные трубочки экспрессировали MyoD1, скелетный миозин, скелетный актин. В последнем случае визуализировалась даже поперечная исчерченность. Дальнейшие исследования должны позволить точнее охарактеризовать иммунофенотипический профиль миогенных предшественников в десне, изучить их отличия от других популяций клеток-предшественниц, склонных к рабдомиогенной дифференцировке – в частности, перицитов, мезангиобластов и др., а также их потенциальную пригодность для целей клеточной или генно-клеточной терапии заболеваний мышечной системы.

Г) Клетки с индуцированной плюрипотентностью

Получение из плюрипотентных клеток, в частности, эмбриональных стволовых клеток, миогенных предшественников долгое время оставалось нерешенной задачей. Недавно показана такая возможность, причем полученные *in vitro* Pax7⁺-

миосателлитоподобные клетки были способны выживать после пересадки в мышцах mdx-мышей и участвовать в гистогенетических процессах [166]. Однако этические проблемы, неизбежно возникающие при трансляции этой методики в клинику, и иммунологический барьер обусловили бурное развитие другой технологии – использования индуцированных плюрипотентных клеток.

Как известно, технология получения клеток с индуцированной плюрипотентностью была разработана Синья Яманака (2006–2008) и обеспечила получение клонированных клеток с дифференцировочным потенциалом, близким к таковому у эмбриональных стволовых клеток, что позволило при создании новых лечебных стратегий, основанных на клеточной трансплантации, переориентироваться с использования эмбриональных стволовых клеток на iPS. Именно iPS стали рассматриваться как наиболее удобный кандидат для получения пациентспецифичных линий клеток.

В отношении лечения генетических заболеваний мышечной системы они также чрезвычайно привлекательны в связи с тем, что могут быть подвергнуты генетической коррекции *ex vivo* и после этого пересажены пациенту-донору без опасности развития иммунных осложнений. Кроме того, имея широкий дифференцировочный потенциал, они могут быть после исправления мутации искусственно коммитированы по рабдомиогенному пути дифференцировки, в частности через индукцию Pax7 [167]. Более того, после трансплантации иммунодефицитным животным с моделью миопатии Дюшенна они интегрировались с мышечными волокнами, что приводило к частичной остановке процесса деградации волокон и функциональному восстановлению мышц [168]. Другим примером экспериментальной отработки данной технологии стала коррекция дефекта в гене дистрофина при помощи двойного нокаута и трансфекции iPS геном утродина [169]. Сходный опыт был выполнен научной группой F.S. Tedesco (2012) получившей клетки подобные мезангиобластам из iPS у пациентов с саркогликанопатией. Пересадка клеток в мышечную ткань соответствующих нокаутных мышей привела к рабдомиогенной дифференцировке трансплантированных клеток и выработке необходимого белка [170].

Кроме описанных популяций клеток, имеющих по мнению исследователей потенциал участия в рабдомиогенезе, выделяют также несколько вторичных клеточных групп: Sk-34 «миоэндотелиальные прогениторные клетки», миогенные эндотелиальные клетки (MECs), адвентициальные клетки (ACs) и др. [112, 114].

Таким образом, к сегодняшнему дню накоплены данные, позволяющие заключить, что трансплантация аллогенных и, вероятно, аутогенных «миобластов» после генетической коррекции вне организма является неэффективной процедурой для пациентов с системным поражением мышечной системы. Судя по всему наиболее «удобными» клетками для системного введения, в том числе после генетической коррекции *ex vivo*, являются мезангиобласты, либо иные виды клеток, у которых удастся подтвердить свойства дифференцировки по рабдомиогенному пути, способность преодолевать сосудистую стенку и возможность слияния с существующими мышечными волокнами.

Таблица 2. Сравнительная характеристика клеток, рассматриваемых в качестве самостоятельных терапевтических агентов или для целей генно-клеточной терапии

Клеточная популяция	Способность к рабдомиогенной дифференцировке	Способность к слиянию с мышечными волокнами	Способность к миграции через сосудистую стенку	Возможность селективного выделения из тканей и экспансии in vitro	Маркеры [105, 106, 160]		
					+	-	
Гемопоэтические клетки-предшественницы (гемопоэтические стволовые клетки), включая CD133+	-	+/-	+/-	+/-	Гемопоэтические стволовые клетки		
					CD34		
					CD 133 (AC133)		
					CD133, CD34, CD90, CD45	?	
Мезоангиобласты/ перициты	+	+	+	+/-	E-селектин, интегрин-β7, CD44, FGFR1, CXCR4, TNF-R, II10R, II4R, TLR4, CD13	CD34, CD45, CD117, CD31	
Миосателлитоциты/ «миобласты»	+	+	-	+	Миогенин, Pax3, Pax7, α-актин, CCR5, CD56, PECAM1, Sca-1, десмин, Mif-5, TLR4, нестин	CCR2	
Стволовые клетки, полученные из мышц, MDSCs	+	+	+	+		c-kit, CD43, CD45, CD34	
Миогенные клетки слизистой оболочки десны	+	?	?	+	MyoD1, миозин, α-актин	?	
Клетки с индуцированной плюрипотентностью	В зависимости от индуцированного фенотипа						

2.2.2. Ингибиторы миостатина, гормоны, цитокины

Миостатин (семейство костных морфогенетических белков, надсемейство трансформирующих факторов роста) – белок, подавляющий рабдомиогенез; вырабатывается непосредственно мышечной тканью, а опосредует свое действие через связывание с мембранным рецептором ACVR2B (activin type II receptor). Мутации в гене *MSTN*, кодирующем миостатин, приводят к развитию миопатии с гипертрофией и гиперплазией скелетной мышечной ткани [171]; мальчик-гомозигота с такой патологией описан в 2004 г. в Германии [172]. Также врачи не исключают возможности мутации в гене рецептора к миостатину, имеющей похожие фенотипические проявления.

Известно, что при нокауте гена *MSTN* животные развиваются нормально, их вес при рождении несколько меньше среднего, но к моменту полового созревания они вдвое превосходят по массе особи дикого типа, что установлено при изучении лабораторных грызунов, гончих собак, коров и овец [173]. Помимо изменений мышечной массы и структуры скелетных мышц (превалируют быстрые волокна, медленных почти нет) у нокаутных по миостатину животных повышается содержание инсулиноподобного гормона роста (IGF-1). Физиологическая функ-

ция самого IGF-1 заключается в дополнительном анаболическом эффекте.

Биофармацевтические стратегии использования эффектов ингибирования миостатина востребованы не только для поддержания регенерации мышечной ткани у больных с миодистрофиями, но прежде всего для коррекции раковой кэхекии, саркопении и др. Эти технологии связаны с воспроизводством нейтрализующих моноклональных антител как к самому миостатину (молекула MYO-029), так и к его рецептору (молекула BYM338), а также создание растворимых рецепторов к миостатину (молекула ACE-031). В экспериментах с mdx-мышьями антитела к миостатину приводили к 30% увеличению мышечной массы за 3 мес. [174]. Сопоставимую эффективность в эксперименте показал и ACE-031 даже у здоровых животных [175]. Полученные данные позволили перевести исследования в клинику, где, однако не была подтверждена эффективность данного метода у больных с миодистрофией Дюшенна [176]. Применение аденоассоциированного вируса для трансфера гена, ингибирующего миостатин пропелтида у мышей с моделью саркогликанопатии и кальпаинопатии, показало неэффективность методики в первом случае и увеличение мышечной массы, силы мышц и улучшение гистологического строения мышц во втором [177].

Использование естественного антагониста мио- статина — фоллистатина показало хороший эффект в эксперименте (молекула SF-344). Так, гипер- экспрессия фоллистатина, обеспеченная нокаутом гена мио-статина, плазмидным генным трансфером с электропорацией, или трансфекцией при помощи ААВ приводила к увеличению мышечной массы, активации репаративного рабдомиогенеза, а также выживанию трансплантированных миобластов у mdx-мышей [178–181]. Эффективность одно- кратного курса при использовании местного генно- го трансфера с помощью ААВ сохранялась до 2 лет [182]. Двойной генный трансфер с введением генов минидистрофина и фоллистатина за счет воздей- ствия на разные звенья патоморфогенеза болезни позволяет добиться более выраженных результатов [183]. Вместе с тем, высказывается суждение об опасности такой терапии в связи с преждевремен- ным истощением пула миогенных клеток-предше- ственниц и лавинообразным течением болезни по- сле периода некоторого благополучия.

Кроме перечисленных способов коррекции мио- дистрофического фенотипа скелетной мышечной ткани, исследователи разрабатывают и ряд других, которые представляются на сегодняшний день менее перспективными и имеют скорее вспомогательное значение [2]: применение инсулиноподобного фак- тора роста; средств снижающих фиброз — TGF β ; ин- гибиторов активных форм кислорода и перекисного окисления липидов — ингибиторов NF- κ B; средств, улучшающих кровоснабжение мышц, включая индук- торы NO и NOS, VEGF (Vascular endothelial growth factor, эндотелиального сосудистого фактора роста) и др. [176, 184].

3. Клинические исследования

Количество потенциальных лечебных агентов ген- ной и клеточной терапии, покинувших стены лабора- тории и перешедших на этап клинических исследова- ний, весьма невелико. Такое положение дел связано с несколькими причинами. С одной стороны значимые успехи экспериментальной генной терапии и коррек- ции генома — достояние последнего десятилетия, их отличает технологическая сложность, особенно с уче- том особенностей мышечной ткани. С другой — ге- нетические заболевания мышечной системы относятся к категории орфанных, разработка способов лечения которых, как правило, без серьезной поддержки го- сударства невозможна ввиду узости в понимании фармкомпаниями потенциального рынка.

Объем зарегистрированных клинических иссле- дований генной и клеточной терапии исчисляется не более чем тремя десятками; причем 2/3 из них уже прекращены. Наиболее значимые из них приведены в табл. 3. Все исследования относятся к 1 и, в са- мом оптимистическом случае — к 2 фазе исследова- ний (без учета исследования малых молекул и анти- смысловых олигонуклеотидов для экзон-скиппинга). Исходя из этого, врачи в качестве ожидаемых резуль- татов применения данных лечебных средств испыты- вают пока весьма скромные ожидания и определяют мягкие критерии эффективности. В исследованиях оцениваются: выживание пересаженных популяцией клеток, гистологические изменения обработанной мышечной ткани, сила сокращения отдельных еди- ничных мышц, результаты адаптированного теста 6-минутный ходьбы и т.п. Иными словами, даже при

экспериментальном лечении такого грозного забо- левания как МДД, жесткие критерии эффективности в виде увеличения продолжительности жизни и т.п. пока не выдвигаются; статус создаваемых техноло- гий пока не предполагает даже формулировать за- дачу на излечение от данных болезней.

Анализ результатов применения клеточной тера- пии во всех ее вариантах показывает незначи- тельную эффективность вне зависимости от типа ис- пользованных клеток и пути их введения. Считается, что пионером клеточной терапии мышечных дистро- фий был Питер Лоу (Peter Low), который в 1990 г. осуществил трансплантацию миосателлитоцитов 9-летнему мальчику с миодистрофией Дюшенна, до- казав тем самым безопасность и техническую вы- полнимость методики [185]. Это послужило толч- ком к началу нескольких клинических исследований по программе I фазы, в которых предусматривалось местное введение миосателлитоцитов («миобла- стов») в режиме «лечение 1 мышцы» пациентам с миодистрофией Дюшенна. Все исследования оказа- лись безопасными для пациента, в большинстве из них были получены признаки некоторого улучшения сократительной способности мышцы (у 15% пациен- тов), но клинически значимых сдвигов в состоянии здоровья пациентов отмечено не было нигде. Этот результат следует признать вполне закономерным, в связи с тем, что местная трансплантация не может решить проблему системного заболевания; кроме того, после введения клетки подвергались быстрой массивированной гибели (в течение 72 ч.), также были зафиксированы и иммунологические реакции на вве- денные клетки, даже в тех случаях, где имелась HLA- тождественность клеточного препарата [186]. В кли- нических исследования первой волны, как правило, включали от 3 до 21 пациентов со средним возрастом около 10 лет. Чаще всего количество вводимых ал- логенных культивированных «миобластов» составляло около 100 млн, хотя в одном из исследований P. Low (1992) фигурирует цифра 5 млрд. Важно отметить, что введение клеток всегда осуществлялось на фоне базовой терапии иммунодепрессантами — циклоспо- рином, циклофосфамидом, что могло влиять в т.ч. на выживаемость клеток.

Полученный опыт позволил заключить, что подоб- ная техника вполне осуществима и безопасна, одна- ко приводит к низкой выживаемости пересаженных клеток, низкой экспрессии дистрофина и небольшому изменению силы одной единственной мышцы. В свя- зи с этим в протоколах нового поколения предусмо- трен ряд общих корректировок. В первую очередь они связаны с методикой введения — не менее 30 млн аллогенных «миобластов» на 1 см³ мышечной ткани через 25–100 отдельных вколов (инъекции высокой плотности, «high-density injections») на фоне приме- нения иммуносупрессии (Такролимус, FK506) [187]. Использование такой методики по мнению авторов дает возможность повысить количество химерных мышечных волокон, вырабатывающих дистрофин. По- зволим себе выразить скепсис по отношению к раз- рабатываемой методике, поскольку вполне очевидно, что «лечение одной мышцы» не в состоянии повлиять на продолжительность жизни и даже ее качество у пациентов с МДД, в связи с этим, и этический аспект таких протоколов небесспорен. В том числе и в свя- зи с этим существенное внимание сосредоточено на методиках системного введения других клеток; мезо- ангиобластов, CD133⁺ и др.

Первое клиническое исследование по применению мезангиобластов проводится в Европе по программе 1–2 фазы [136]. Несмотря на то, что доклиническая проработка использования других клеток существенно уступает перечисленным, в клинике апробируются и они (табл. 3), в частности различные предшественники клеток стромального ряда. В качестве единичных кейсов имеются описания применения ядросодержащих клеток пуповинной крови после иммуноабляции; в таких случаях показана активация выработки дистрофина [227].

Параллельно клеточной терапии успешно развиваются подходы, связанные с воздействием на первопричину заболевания, тем более, что генотерапевтический препарат может изготавливаться и применяться подобно обычным лекарственным средствам, не нуждающимся в сложной производственной и клинической инфраструктуре. Среди всех вариантов генной терапии наиболее отвечает особенностям заболевания применение терапевтических конструкций на основе AAV. Однако в клинической практике опробованы и другие методы. Так, в частности, проверена безопасность и тенденции эффективности плазмидной доставки гена дистрофина при внутримышечных инъекциях [228, 229]. Доказана безопасность данного метода и иммунологическое безразличие организма к трансгену,

однако с точки зрения эффективности плазмидные векторы остаются малоэффективными. Тем не менее, было показано, что через три недели до 6% мышечных волокон в месте введения вырабатывали дистрофин, и до 26% делали это частично. К сожалению, о стойкости достигнутых эффектов не сообщается. Существенным фактом, ограничивающим этот подход является теоретически малая полезность системного введения плазмиды, ввиду ее нестойкости в крови и большого размера релаксированной молекулы, что резко снижает эффективность проникновения внутрьклеточно.

Вместе с тем, имеется понимание того, что эффективно доставить в большие объемы мышечной ткани вирусную генную конструкцию пока не представляется возможным вследствие большой вирусной нагрузки. В связи с этим, а также в связи с совершенствованием техники коррекции генов все больше внимания уделяется потенциальной возможности генно-клеточной терапии, при которой в качестве клеточного компонента используются или аутогенные клетки, способные к эффективному слиянию с волокнами поперечно-полосатой мышечной ткани, или пациентспецифические клетки с индуцированной плюрипотентностью, позволяющие после коррекции мутации индуцировать направленный рабдомиогенез (рис. 5).

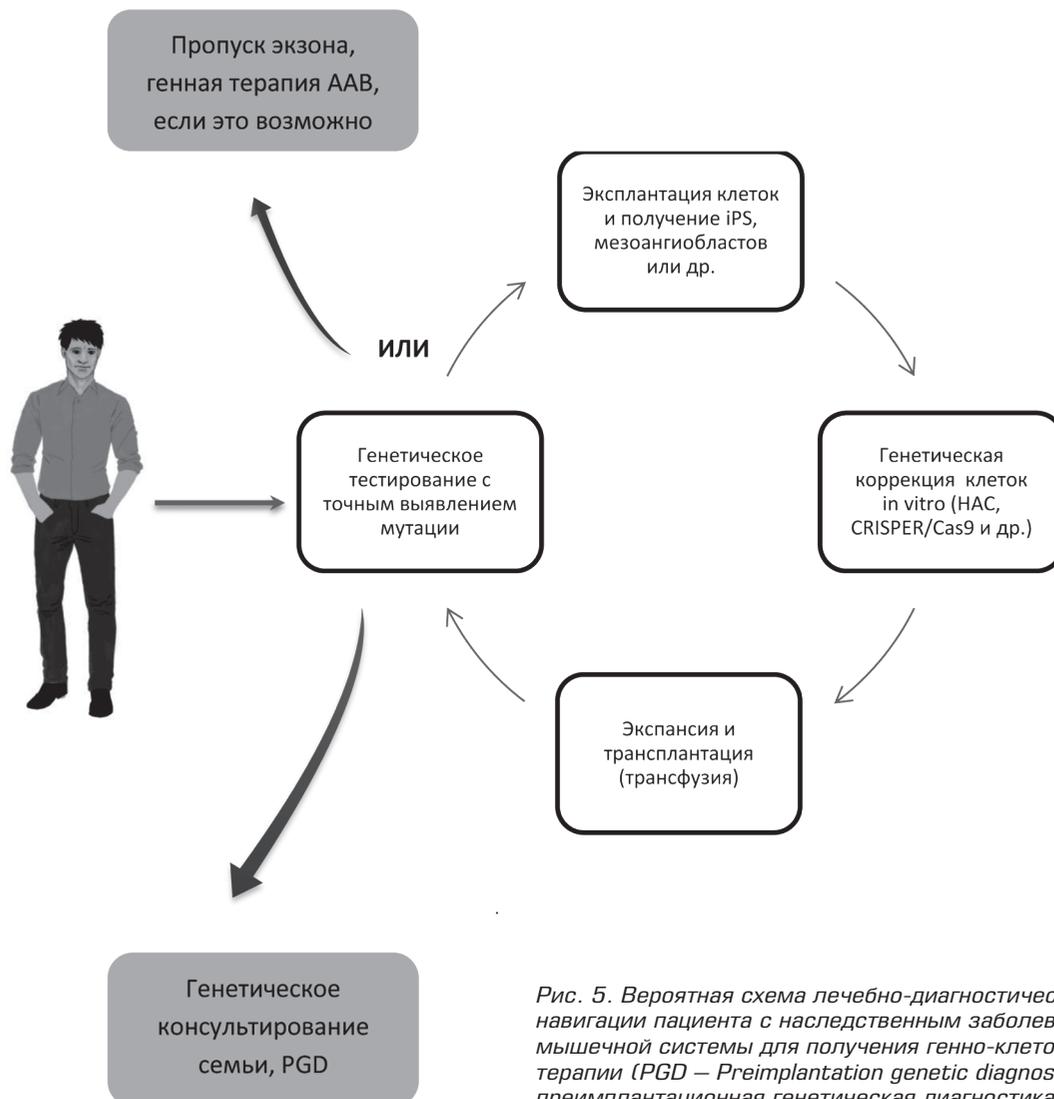


Рис. 5. Вероятная схема лечебно-диагностической навигации пациента с наследственным заболеванием мышечной системы для получения генно-клеточной терапии (PGD – Preimplantation genetic diagnosis – преимплантационная генетическая диагностика)

Таблица 3. Характеристика наиболее значимых клинических исследований по генной и клеточной терапии наследственных заболеваний мышечной системы

№ п/п	Идентификатор	Название	Нозология	Лечебный агент	Фаза исследования	Количество пациентов	Страна	Статус исследования	Примечания	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ										
«Миобласты»										
1	NCT00773227	Treatment of Dysphagia in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy by Autologous Transplantation of Myoblasts (OPMD)	Dysphagia in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy	Аутомиобласты (178 млн), выделенные из мышц нижних конечностей, введение местное	2	30	ЕС (Франция)	Завершение ожидается в 2015 г.	Введение клеток непосредственно в мышцы переходит глотки в пищевод после миотомии	187, 188
2	NCT02196467	Transplantation of Myoblasts to Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Patients	МДД	Аллогенные миобласты, экспансия в лаборатории, 30 млн в 1 см ³ , введение местное в <i>Extensor carpi radialis</i>	1–2 фаза	10	Канада	Завершение ожидается в 2018 г.	На фоне применения такролимуса	189
Гемопоэтические клетки и CD133+клетки										
3	NCT02050776	Stem Cell Therapy in Limb Girdle Muscular Dystrophy (The Role of Cell Therapy in Modifying the Course of Limb Girdle Muscular Dystrophy- A Longitudinal 5-year Study)	ПКМД	Аутомононуклеары КМ, введение внутримышечное	1 фаза	65	Индия	Завершено в 2013 г.	Опубликованы результаты лечения 150 больных; через год наблюдения показана безопасность и статистически значимое увеличение мышечной силы мышц различных групп	190–192
4	NCT01834066	Study Safety and Efficacy of Bone Marrow Derived Autologous Cells for the Treatment of Muscular Dystrophy. (mdp)	МДД	Внутривенное введение аутоСК КМ, 1 доза – 100 млн, курс – 6 доз за 3 мес.	1–2 фаза	25	Индия	Завершение ожидается в 2016 г.		193
5	NCT02241434	Stem Cell Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy (The Role of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy)	МДД	Аутомононуклеары КМ	1 фаза	500	Индия	Завершение ожидается в 2016 г.		194

6	–	Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients	МДД	АутоCD133+	Пилотное исследование	8	ЕС	Опубликован предварительный результат	195
Мезоангиобласты									
7	2011-000176-33	Cell Therapy Of Duchenne Muscular Dystrophy by intra-arterial delivery of HLA-identical allogeneic mesoangioblasts	МДД	Мезоангиобласты HLA, от 100 до 100 млн, внутриаартериально	1-2 фаза	?	ЕС	Продолжается	136
Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки									
8	NCT02208713	Intramuscular Transplantation of Muscle Derived Stem Cell and Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients With Facioscapulohumeral Dystrophy (FSHD)	Лице-плечелопаточная мышечная дистрофия	аутоММСК из жировой ткани и стволовые клетки – производные мышечной ткани, в/м инъекции – бицепс, трицепс и трапециевидные мышцы,	1 фаза	15	Иран	Завершение ожидается в 2015 г.	196
9	NCT01610440	Safety and Efficacy of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy for Patients With Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	ММСК из пупочного канатика	1-2 фаза	15	Китай	Исследование завершено в 2013 г.	197
10	NCT02285673	Efficacy of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	ММСК из пупочного канатика	1-2 фаза	10	Турция	Завершение ожидается в 2015 г.	198
11	NCT02235844	Allogeneic Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for a Single Male Patient With Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)	МДД	ММСК из пупочного канатика	1 фаза	Нет данных	США	Завершение ожидается в 2018 г.	199
12	NCT02484560	Efficacy of Stem Cell Therapy in Ambulatory and Non-ambulatory Children With Duchenne Muscular Dystrophy - Phase 1-2	МДД	ММСК из пупочного канатика	фаза	10	Турция	Завершение ожидается в 2015 г.	200

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ										
1	NCT00494195	Gene Transfer Therapy for Treating Children and Adults With Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2D (LGMD2D)	ПКМД-2D	ААВ, 3,25×10 в/м, в <i>m. extensor digitorum brevis</i>	1 фаза	6	США	Завершено в 2011 г.	Показана безопасность, показана локальная экспрессия трансгена у большей части пациентов	201, 202
2	NCT01976091	Gene Transfer Clinical Trial for LGMD2D (Alpha-sarcoglycan Deficiency) Using scAAVrh74.1MCK.hSGCA	ПКМД-2D	ААВ, в/м	1–2 фаза	8	США, изолированная перфузия – 10 мин.	Завершение ожидается в 2017 г.		203, 204
3	NCT01344798	Clinical Study of AAV1-gamma-sarcoglycan Gene Therapy for Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2C	ПКМД-2C	ААВ, в/м, в <i>m. carpi radialis</i>	1 фаза	9	Франция	Завершено в 2010 г.	Показана безопасность, показана локальная экспрессия трансгена у большей части пациентов	205, 206
4	NCT00428935	Safety Study of Mini-dystrophin Gene to Treat Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	ААВ, мини-ген дистрофина в/м в <i>m. biceps brachii</i>	1 фаза	6	США	Завершено в 2010 г.	Установлена безопасность	207
5	NCT02376816	Clinical Intramuscular Gene Transfer Trial of rAAVrh74.1MCK.Micro-Dystrophin to Patients With Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	ААВ, мини-ген дистрофина в/м, в <i>m. extensor digitorum brevis</i>	1 фаза	6	США	Завершение планируется в 2017 г.		208
ПРОПУСК ЭКЗОНА										
1	NCT00159250	Safety and Efficacy Study of Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy	МДД и миодистрофия Беккера	Антисмысловые нуклеотиды к экзону 51 AVI-4658 (PMO), в/м введение в <i>m. extensor digitorum brevis</i>	1–2 фаза	7	Велико-британия	Завершено в 2009 г.		209, 210
2	NCT00844597	Dose-Ranging Study of AVI-4658 to Induce Dystrophin Expression in Selected Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Patients	МДД	Антисмысловые нуклеотиды к экзону 51 AVI-4658 (PMO), в/м введение в <i>m. extensor digitorum brevis</i>	1–2 фаза	19	Велико-британия	Завершено в 2010 г.	Sarepta Therapeutics. Показана безопасность, экспрессия дистрофина, нормализация гистологической картины, эффективная доза	211, 212

3	NCT01396239	Efficacy Study of AVI-4658 to Induce Dystrophin Expression in Selected Duchenne Muscular Dystrophy Patients	МДД	Етеплирсен (AVI-4658), в/в	2 фаза	12	США	Завершено в 2013 г.	Sarepta Therapeutics, показана безопасность нормализация гистологической картины и улучшение по тесту 6-минутной ходьбы	213, 214
4	NCT01540409	Efficacy, Safety, and Tolerability Rollover Study of Eteplirsen in Subjects With Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	Етеплирсен (AVI-4658), в/в	2 фаза	12	США	Завершение ожидается в 2016 г.	Sarepta Therapeutics	215
5	NCT02286947	Safety Study of Eteplirsen to Treat Advanced Stage Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	Етеплирсен (AVI-4658), в/в	2 фаза	20	США	Завершение ожидается в 2017 г.	Sarepta Therapeutics	216
	NCT02420379	Safety Study of Eteplirsen to Treat Early Stage Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	Етеплирсен (AVI-4658), в/в	2 фаза	40	США	Завершение ожидается в 2018 г.	Sarepta Therapeutics	217
	NCT02255552	Confirmatory Study of Eteplirsen in DMD Patients (PROMOVI)	МДД	Етеплирсен (AVI-4658), в/в	3 фаза	160	США, 39 ЛПУ	Завершение ожидается в 2016 г.	Sarepta Therapeutics	218
	NCT01910649	A Phase I/II, Open Label, Escalating Dose, Pilot Study to Assess Effect, Safety, Tolerability and PK of Multiple SC Doses of Drisapersen in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and to Assess the Potential for IV Dosing as an Alternative Route of Administration	МДД	Drisapersen (PRO051), п/к и в/в	1-2 фаза	12	ЕС (Бельгия)	Завершение ожидается в 2016 г.	BioMarin Nederland BV. Установлен дозозависимый эффект	219, 220
	NCT01480245	Open Label Study of GSK2402968 in Subjects With Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	GSK 2402968 (PRO051)	3 фаза	233	28 стран (исключая США) 59 ЛПУ	Завершено в 2014 г.	GlaxoSmithKline Результат не ясен	221
	NCT01890798	Drisapersen Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Treatment Protocol	МДД	Drisapersen (PRO051), подкожно	3 фаза	0	США	Исследование прекращено досрочно	GlaxoSmithKline	222
	NCT01803412	A Study of the Safety, Tolerability & Efficacy of Long-term Administration of Drisapersen in US & Canadian Subjects	МДД	Drisapersen (PRO051), подкожно	3 фаза	67	США и Канада	Завершение ожидается в 2016 г.	BioMarin Nederland BV	223

Окончание таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
СРЕДСТВА, ИНГИБИРУЮЩИЕ МИОСТАТИН										
NCT01519349	Follistatin Gene Transfer to Patients With Becker Muscular Dystrophy and Sporadic Inclusion Body Myositis	МД Беккера и идиопатический миозит	ААВ (ген фоллистатина), в/м, <i>m. quadriceps femoris</i>	1 фаза	15	США	Завершение планируется в 2016 г.			224
NCT02354781	Clinical Intramuscular Gene Transfer of rAAV1. CMV.huFollistatin344 Trial to Patients With Duchenne Muscular Dystrophy	МДД	ААВ (ген фоллистатина), в/м, <i>m. gluteus sp.</i>	1–2 фаза	6	США	Завершение ожидается в 2017 г.			225
NCT00104078	Study Evaluating MYO-029 in Adult Muscular Dystrophy	Миодистрофия Беккера, ПКМД, лице-лопаточно-плечевая миодистрофия	MYO-029 (Stamulumab) Растворимое антитело к миостатину	1–2 фаза	108	США, 10 ЛПУ	Завершено 2007 г.		Pfizer Показана безопасность, хорошая переносимость, тенденции функциональной эффективности не зафиксировано. Принято решение не развивать препарат дальше	226

Примечания: МДД — мышечная дистрофия Дюшенна; КМ — костный мозг; СК — стволовые клетки; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЕС — Европейский Союз; ААВ — аденоассоциированный вирус; ЛПУ — лечебно-профилактическое учреждение; п/к — подкожно; в/в — внутривенно; в/м — внутримышечно.

Существенные надежды дает метод пропуска экзона, однако нужно понимать, что для каждого экзона в том или ином гене необходимо создать собственный антисмысловый олигонуклеотид и провести с ним весь многолетний комплекс исследований как с кандидатом в активные вещества лекарственного средства. Для примера, в 12% случаев миодистрофия Дюшенна обусловлена мутациями в 51 экзоне; кроме этого выявлены еще 2–3 экзона, близкие по частоте локализации мутаций. Таким образом разработка антисмысловых нуклетотидов для остальных 80 экзона становится экономически непосильной. Для ряда других генов наиболее частые мутации отсутствуют, они равновероятно распределены по всему гену. Это означает, что данная технология оказывается бесполезной для большого числа пациентов, и лечебная стратегия в отношении них неизбежно будет базироваться на создании персонифицированных, не требующих иммуносупрессивной терапии, генно-клеточных препаратов, в которых генная коррекция может быть достигнута плазмидными или

вирусными векторами, либо современными молекулярными инструментами коррекции генома.

Таким образом, несмотря на большой объем проделанной в мире работы, существенного прогресса на пути радикального лечения наследственных заболеваний мышечной системы пока нет. Вместе с тем, созданы и в большом числе случаев отработаны прототипы технологий, способных изменить ситуацию. Наиболее перспективными в этом плане представляются способы вирусного трансфера на платформе ААВ, методики экзон-скиппинга и коррекции генов с клеточной формой доставки исправленного генома в мышечные волокна.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований в 2014–2016 гг., соглашение № 14-25-00166.

ЛИТЕРАТУРА:

- River F., Meyer P., Walther-Louvie U. и др. Врожденные мышечные дистрофии: классификация и диагностика. Нервно-мышечные болезни 2014; 1: 6-19.
- Leung D.G., Wagner K.R. Therapeutic Advances in Muscular Dystrophy. Ann. Neurol. 2013; 74(3): 404-11.
- Nigro V., Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. Acta Myol. 2014; 33(1): 1-12.
- Mahmood O.A., Jiang X.M. Limb-girdle muscular dystrophies: Where next after six decades from the first proposal. Mol. Med. Rep. 2014; 9(5): 1515-32.
- Rocha C.T., Hoffman E.P. Limb-Girdle and Congenital Muscular Dystrophies: Current Diagnostics, Management, and Emerging Technologies. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2010; 10(4): 267-76.
- Kinter J., Sinnreich M. Molecular targets to treat muscular dystrophies. Swiss Med. Wkly. 2014; 144:w13916. doi: 10.4414/smw.2014.13916.
- Allamand V., Guicheney P. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, LAMA2 genocoding for alpha2 chain of laminin). Eur. J. Hum. Genet. 2002; 10(2): 91-4.
- Bönnemann C. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. Nat. Rev. Neurol. 2011; 7: 379-90.
- Muscle disease: pathology and genetics / edited by Hans H. Goebel, Caroline A. Sewry, Roy O. Weller. Second edition. 2013.
- Muscular dystrophy, congenital, due to ITGA7 deficiency/ <http://omim.org/entry/613204?search=613204&highlight=613204>.
- Muscular dystrophy, limb-girdle, type IC/. <http://www.omim.org/entry/607801>.
- Rippling muscle disease. <http://www.omim.org/entry/606072>.
- Creatine phosphokinase, elevated serum. <http://www.omim.org/entry/123320>.
- Caveolin 3. <http://www.omim.org/entry/601253>.
- Cardiomyopathy, familial hypertrophic. <http://www.omim.org/entry/192600>.
- Шнайдер Н.А., Николаева Т.Я., Борова Е.Н. и др. Конечностно-поясная мышечная дистрофия с аутосомно-доминантным типом наследования: пельвиофemorальная форма Лейдена–Мебуса. Нервно-мышечные болезни 2014; 1: 46-61.
- Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (limb-girdle), type C, 9. <http://www.omim.org/entry/613818>.
- Kirschner J., Lochmüller H. Sarcoglycanopathies. Handb. Clin. Neurol. 2011; 101: 41-6.
- Sandonà D., Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. Expert Rev. Mol. Med. 2009; 11: e28.
- Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2Q. <http://omim.org/entry/613723>.
- Epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. <http://omim.org/entry/226670>.
- Epidermolysis bullosa simplex with pyloric atresia. <http://omim.org/entry/612138>.
- Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2A. <http://omim.org/entry/253600>.
- Cardiomyopathy, dilated, 1X. <http://www.omim.org/entry/611615>.
- Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 4. <http://www.omim.org/entry/253800>.
- Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital without mental retardation), type B, 4. <http://www.omim.org/entry/613152>.
- Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (limb-girdle), type C, 4. <http://www.omim.org/entry/611588>.
- Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2R. <http://www.omim.org/entry/615325>.
- Cardiomyopathy, dilated, 1I. <http://www.omim.org/entry/604765>.
- Myopathy, myofibrillar, 1. <http://www.omim.org/entry/601419>.
- Scapulohumeral syndrome, neurogenic, Kaeser type. <http://www.omim.org/entry/181400>.
- van Spaendonck-Zwarts K.Y., van Hessem L., Jongbloed J.D. et al. Desmin-related myopathy: a review and meta-analysis. Clin. Genet. 2011; 80: 354-66.
- Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 5. <http://www.omim.org/entry/613153>.
- Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with or without mental retardation), type B, 5. <http://www.omim.org/entry/606612>.
- Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (limb-girdle), type C, 5. <http://www.omim.org/entry/607155>.
- Selenoprotein N, 1. <http://www.omim.org/entry/606210>.
- Rigid Spine with Muscular Dystrophy Type 1 (RSMD1): SEPN1 Gene Deletion/Duplication. <http://geneticslab.emory.edu/tests/DSEP1>.
- LAMIN A/C. <http://omim.org/entry/150330>.
- Emery-Dreifuss muscular dystrophy 1, X-linked. <http://www.omim.org/entry/300384>.
- Zhang M., Chen J., Si D. et al. Whole exome sequencing identifies a novel EMD mutation in a Chinese family with dilated cardiomyopathy. BMC Med. Genet. 2014; 15: 77. doi: 10.1186/1471-2350-15-77.
- Muscular dystrophy, congenital, megaconial type. <http://www.omim.org/entry/602541>.
- Oliveira J., Negrão L., Fineza I. et al. New splicing mutation in the choline kinase beta (CHKB) gene causing a muscular dystrophy detected by whole-exome sequencing. J. Hum. Genet. 2015; 60(6): 305-12.
- Miller J.B., Girgenrath M. The role of apoptosis in neuromuscular diseases and prospects for anti-apoptosis therapy. Trends Mol. Med. 2006; 12: 279-86.
- Сапрыкин В.П., Турбин Д.А. Основы морфологической диагностики заболеваний скелетных мышц: М. 1997.
- Therapeutic Strategies. <http://www.jain-foundation.org/scientific-resources/therapeutic-strategies>.
- Сукач А.Н. Перспективы использования генной и клеточной терапии для лечения мышечных дистрофий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 2(4): 44-50.
- Mackenzie T.C., Flake A.W. Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation. Cytotherapy 2001; 3(5): 403-5.
- Nijagal A., Le T., Wegorzewska M., Mackenzie T.C. A mouse model of in utero transplantation. J. Vis. Exp. 2011; (47). pii: 2303. doi: 10.3791/2303.
- Cerletti M., Negri T., Cozzi F. et al. Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. Gene Ther. 2003; 10: 750-7.
- Zucconi E., Valadares M.C., Vieira N.M. et al. Ringo: Discordance between the molecular and clinical manifestation in a golden retriever muscular dystrophy dog. Neuromuscul. Disord. 2010; 20: 64-70.

51. Tinsley J.M., Potter A.C., Phelps S.R. et al. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 1996; 384: 349-53.
52. Gilbert R., Nalbantoglu J., Petrof B.J. et al. Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10: 1299-310.
53. Sonnemann K.J., Heun-Johnson H., Turner A.J. et al. Functional substitution by TAT-utrophin in dystrophin-deficient mice. *PLoS Med.* 2009; 6: e1000083.
54. Miura P., Jasmin B.J. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol. Med.* 2006; 12: 122-9.
55. Gauthier-Rouviere C., Bonet-Kerrache A. RhoA leads to up-regulation and relocalization of utrophin in muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 384: 322-8.
56. Khurana T.S., Davies K.E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009; 2: 379-90.
57. Courdier-Fruh I., Briguet A. Utrophin is a calpain substrate in muscle cells. *Muscle Nerve* 2006; 33: 753-9.
58. Ljubicic V., Burt M., Jasmin B.J. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets. *FASEB J.* 2014; 28(2): 548-68.
59. Quenneville S.P., Chappellaine P., Rousseau J. et al. Nucleofection of Muscle-Derived Stem Cells and Myoblasts with C31 Integrase: Stable Expression of a Full-Length-Dystrophin Fusion Gene by Human Myoblasts. *Mol. Ther.* 2004; 10: 679-87.
60. Zhang G., Ludtke J.J., Thiouillet C. et al. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15(8): 770-82.
61. Romero N.B., Braun S., Benveniste O. et al. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15(11): 1065-76.
62. Fassati A., Bresolin N. Retroviral vectors for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neurol. Sci.* 2000; 21(5 Suppl): S925-7.
63. Berardi E., Annibaldi D., Cassano M. et al. Molecular and cell-based the rapies for muscle degenerations: a road under construction. *Front Physiol.* 2014; 8(5): 119.
64. Gregorevic P., Chamberlain J.S. Gene therapy for muscular dystrophy - a review of promising progress. *Exp. Opin Biol. Ther.* 2003; 3(5): 803-14.
65. Rodino-Klapac L.R., Janssen P.M.L., Montgomery C.L. et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J. Transl. Med.* 2002; 5: 45.
66. Wang B., Li J., Fu F.H. Xiao X. Systemic human minidystrophin gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. *J. Orthop. Res.* 2009; 27(4): 421-6.
67. Dickson G., Roberts M.L., Wells D.J., Fabb S.A. Recombinant micro-genes and dystrophin viral vectors. *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12(Suppl 1): S40-4.
68. 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.
69. Rodino-Klapac L.R., Montgomery C.L., Mendell J.R., Chicoine L.G. AAV-mediated gene therapy to the isolated limb in rhesus macaques. *Methods Mol. Biol.* 2011; 709: 287-98.
70. Lostal W., Bartoli M., Bourg N. et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19(10): 1897-907.
71. Pryadkina M., Lostal W., Bourg N. et al. A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2015; 2: 15009.
72. Nathwani A.C., Rosales C., McIntosh J. et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* 2011; 19: 876-85.
73. Kotterman M.A., Schaffer D.V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2014; 15: 445-51.
74. Strimpakos G., Corbi N., Pisani C. et al. Novel Adeno-Associated Viral Vector Delivering the Utrophin Gene Regulator Jazz Counteracts Dystrophic Pathology in mdx Mice. *J. Cell. Physiol.* 2014; 229(9): 1283-91.
75. Liu J., Harper S.Q. RNAi-based Gene Therapy for Dominant Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Curr. Gene Ther.* 2012; 12(4): 307-14.
76. Aartsma-Rus A., Bremmer-Bout M., Janson A.A. et al. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12(Suppl 1): S71-7.
77. Siva K., Covello G., Denti M.A. Exon-Skipping Antisense Oligonucleotides to Correct Missplicing in Neurogenetic Diseases. *Nucleic Acid Ther.* 2014; 24(1): 69-86.
78. Chen H.C., Cheng S.C. Functional roles of protein splicing factors. *Biosci. Rep.* 2012; 32: 345-59.
79. McClorey G., Moulton H.M., Iversen P.L. et al. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther.* 2006; 13(19): 1373-81.
80. Walmsley G.L., Arechavala-Gomez V., Fernandez-Fuente M. et al. A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping. *PLoS One* 2010; 5(1): e8647.
81. Bish L.T., Sleeper M.M., Forbes S.C. et al. Long-term restoration of cardiac dystrophin expression in golden retriever muscular dystrophy following rAAV6-mediated exon skipping. *Mol. Ther.* 2012; 20(3): 580-9.
82. Vulin A., Barthélémy I., Goyenvalle A. et al. Muscle function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. *Mol. Ther.* 2012; 20(11): 2120-33.
83. Aartsma-Rus A. Exon skipping for the therapy of Duchenne muscular dystrophy. <http://www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Interview%20with%20Dr.%20Annemieke%20Aartsma-Rus.pdf>.
84. Hoffman E.P., Connor E.M. Orphan drug development in muscular dystrophy: Update on two large clinical trials of dystrophin rescue therapies. *Discov. Med.* 2013; 16: 233-9.
85. Peltz S.W., Morsy M., Welch E.M., Jacobson A. Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression. *Annu. Rev. Med.* 2013; 64: 407-25.
86. de Semir D., Aran J.M. Targeted gene repair: The ups and downs of a promising gene therapy approach. *Curr. Gene Ther.* 2006; 6: 481-504.
87. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas инструменты открытий. *Acta Naturae* 2014; 6(3): 27-49.
88. Phase 1 Dose Escalation Study of Autologous T-cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases in HIV-Infected Patients. NCT01044654. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01044654?term=NCT01044654&rank=1>.
89. Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-728 for HIV (Zinc-Finger). NCT00842634. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT00842634>.
90. Tebas P., Stein D., Tang W.W. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(10): 901-10.
91. Dose Escalation Study of Cyclophosphamide in HIV-Infected Subjects on HAART Receiving SB-728-T. NCT01543152. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01543152>.
92. Study of Autologous T-cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases in HIV-Infected Subjects. NCT01252641. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01252641>.
93. Repeat Doses of SB-728mR-T After Cyclophosphamide Conditioning in HIV-Infected Subjects on HAART. NCT02256665. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02256665>.
94. Ousterout D.G., Kabadi A.M., Thakore P.I. et al. Correction of Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients Through Genomic Excision of Exon 51 by Zinc Finger Nucleases. *Mol. Ther.* 2015; 23(3): 523-32.
95. Ding Q., Lee Y.K., Schaefer E.A. et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(2): 238-51.
96. Ousterout D.G., Perez-Pinera P., Thakore P.I. et al. Reading Frame Correction by Targeted Genome Editing Restores Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Mol. Ther.* 2013; 21(9): 1718-26.
97. Yin H., Xue W., Chen S. et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32: 551-3.
98. Chandrakasan S., Malik P. Gene Therapy for Hemoglobinopathies: The State of the Field and the Future. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2014; 28(2): 199-216.
99. Ye L., Wang J., Beyer A.I. et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *PNAS USA* 2014; 111(26): 9591-6.
100. Finotti A., Breda L., Lederer C.W. et al. Recent trends in the gene therapy of β-thalassemia. *J. Blood Med.* 2015; 6: 69-85.
101. Yang H., Wang C.S., Shivalila A.W. et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 154: 1370-9.
102. Long C., McAnally J.R., Shelton J.M. et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 2014; 345(6201): 1184-8.
103. Li H.L., Fujimoto N., Sasakawa N. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 2015; 4(1): 143-54.
104. Oshimura M., Katoh M. Transfer of human artificial chromosome vectors into stem cells. *Reproductive biomedicine online* 2008. 16(1): 57-69.
105. Kim J.H., Kononenko A., Erliandri I. et al. Human artificial chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells. *PNAS USA* 2011; 108(50): 20048-53.

106. Лисковых М.А., Куприна Н., Ларионов В., Томилин А.Н. Искусственные хромосомы для генотерапии и тканезамещения. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; VII(4): 8-20.
107. 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.
108. Tedesco F.S., Hoshiya H., D'Antona G. et al. Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3(96): 96ra78.
109. Tedesco F.S., Gerli M.F., Perani L. et al. Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(140): 140ra89.
110. Yuryeva K., Liskovykh M., Ponomartsev S. et al. Human artificial chromosomes (HAC) as vectors for gene therapy. 3rd International Conference Genetics of Aging and Longevity, 2014: p60.
111. Isaev A., Eremin I., Pulin A. et al. Development of Human Artificial Chromosomes for Gene Cell Therapy of Muscular Dystrophie. ASGCT 18 Annual meeting, New Orleans, 2015: http://www.abstracts2view.com/asgct/view.php?nu=ASGCT15L1_404.
112. Ceafalan L.C., Popescu B.O., Hinescu M.E. Cellular Players in Skeletal Muscle Regeneration. *BioMed Res. Int.* 2014; 2014: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/957014>.
113. Одинцова И.А., Челурненко М.Н., Комарова А.С. Миосателлитциты — камбиальный резерв поперечнополосатой мышечной ткани. *Гены и Клетки* 2014; IX(1): 6-14.
114. Rinaldi F., Perlingeiro R.C.R. Stem Cells for Skeletal Muscle Regeneration: Therapeutic Potential and Roadblocks. *Transl. Res.* 2014; 163(4): 409-17.
115. Tedesco F.S., Dellavalle A., Diaz-Manera J.J. et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *Clin. Invest.* 2010; 120(1): 11-9.
116. Сабурова И.Н. Трансплантация миобластов и стромальных клеток костного мозга человека в скелетные мышцы мыши. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2003: 22.
117. Соколова А.В., Зенин В.В., Михайлов В.М. Структура нейромышечных соединений и дифференцировка поперечнополосатых мышечных волокон у мышей mdx после клеточной терапии стволовыми клетками костного мозга. *Цитология* 2010; 52(5): 399-406.
118. Киясов А.П., Титова М.А. Способ стимуляции кроветворения в облученном организме. Авторское свидетельство № 1797189, 1990.
119. Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS USA* 1999; 96(25): 14482-6.
120. McKinney-Freeman S.L., Jackson K.A., Camargo F.D. et al. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *PNAS USA* 2002; 99(3): 1341-6.
121. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M. Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science* 1998; 279(5356): 1528-30.
122. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401(6751): 390-4.
123. Gussoni E., Bennett R.R., Muskiewicz K.R. et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 2002; 110(6): 807-14.
124. Kang P.B., Lidov H.G., White A.J. et al. Inefficient dystrophin expression after cord blood transplantation in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2010; 41(6): 746-50.
125. Marchesi C., Belicchi M., Meregalli M. et al. Correlation of Circulating CD133+ Progenitor Subclasses with a Mild Phenotype in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *PLoS One* 2008; 3(5): e2218.
126. Abdel-Salam E., Abdel-Meguid I.E., Shatla R., Korraa S.S. Stromal cell-derived factors in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2010; 29(3): 398-403.
127. Meregalli M., Farini A., Belicchi M., Torrente Y. CD133(+) Cells for the Treatment of Degenerative Diseases: Update and Perspectives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 777: 229-43.
128. Thanabalasundaram G., Arumalla N., Tailor H.D., Khan W.S. Regulation of differentiation of mesenchymal stem cells into musculoskeletal cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2012; 7(2): 95-102.
129. Farini A., Razini P., Erratico S. et al. Cell based therapy for duchenne muscular dystrophy. *J. Cell. Physiol.* 2009; 221(3): 526-34.
130. De Angelis L., Berghella L., Coletta M. et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol.* 1999; 147: 869-78.
131. Minasi M.G., Riminucci M., De Angelis L. et al. The mesoangioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Dev.* 2002; 129: 2773-83.
132. Cossu G., Bianco P. Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003; 13(5): 537-42.
133. Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A. et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 2003; 301: 487-92.
134. Sampaolesi M., Blot S., D'Antona G. et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006; 444: 574-9.
135. Tedesco F.S., Hoshiya H., D'Antona G. et al. Stem cell mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3(96): 96ra78.
136. Cell Therapy Of Duchenne Muscular Dystrophy by intra-arterial delivery of HLA-identical allogeneic mesoangioblasts. 2011-000176-33. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2011-000176-33/IT>.
137. Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R. et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 255-67.
138. Caplan A. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 2008; 3: 229-30.
139. Morgan J., Muntoni F. Mural cells paint a new picture of muscle stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 249-51.
140. Студицкий А.Н. Трансплантация мышц у животных. М.: Медицина, 1977: 248.
141. Данилов Р.К., Клишов А.А. Миосателлитциты и проблема камбиальности скелетной мышечной ткани. *Успехи современной биологии* 1982; 93(3): 409-20.
142. Данилов Р.К., Одинцова И.А. Мышечная система. В: Руководство по гистологии. Т.1. СПб.: СпецЛит. 2011; 425-41.
143. Seale P., Sabourin L.A., Giris-Gabardo A. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000; 102: 777-86.
144. Collins C.A., Olsen I., Zammit P.S. et al. Stem cell function, selfrenewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005; 122: 289-301.
145. Maier F., Bornemann A. Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve* 1999; 22: 578-83.
146. Kadi F., Charifi N., Denis C., Lexell J. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* 2004; 29: 120-7.
147. Montarras D., Morgan J., Collins C. et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 2005; 309: 2064-7.
148. Sacco A., Doyonnas R., Kraft P. et al. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 2008; 456: 502-6.
149. Karpatis G., Pouliot Y., Zubrzycka-Gaarn E. et al. Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. *Am. J. Pathol.* 1989; 135: 27-32.
150. Partridge T.A., Morgan J.E., Coulton G.R. et al. Conversion of mdx myofibers from dystrophin negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; 337: 176-9.
151. Arpke R.W., Darabi R., Mader T.L. et al. A New ImmunoDystrophin-Deficient Model, the NSG-Mdx Mouse, Provides Evidence for Functional Improvement Following Allogeneic Satellite Cell Transplantation. *Stem cells* 2013; 31(8): 1611-20.
152. Arpke R.W., Darabi R., Mader T.L. et al. A new immuno-, dystrophin-deficient model, the NSG-mdx(4Cv) mouse, provides evidence for functional improvement following allogeneic satellite cell transplantation. *Stem Cells* 2013; 31(8): 1611-20.
153. Skuk D., Tremblay J.P. Cell therapy in muscular dystrophies: many promises in mice and dogs, few facts in patients. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015; 15(9): 1307-19.
154. Partridge T., Lu Q.L., Morris G., Hoffman E. Is myoblast transplantation effective? *Nat. Med.* 1998; 4: 1208.
155. Beauchamp J.R., Morgan J.E., Pagel C.N., Partridge T.A. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J. Cell Biol.* 1999; 144: 1113-22.
156. Asakura A., Rudnicki M.A. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 1339-45.
157. Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R. et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: Potential for muscle regeneration. *J. Cell Biol.* 2002; 157: 851-64.
158. Torrente Y., Tremblay J.P., Pisati F. et al. Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol.* 2001; 152: 335-48.
159. Chirieleison S.M., Feduska J.M., Schugar R.C. et al. Human Muscle-Derived Cell Populations Isolated by Differential Adhesion Rates: Phenotype and Contribution to Skeletal Muscle Regeneration in Mdx/SCID Mice. *Tissue Eng., Part A* 2012; 18(3-4): 232-41.
160. Qu Z., Balkir L., van Deutekom J.C. et al. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J. Cell Biol.* 1998; 142: 1257-67.
161. Deasy B.M., Jankowski R.J., Huard J. Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol. Dis.* 2001; 27: 924-33.

162. Mitrano T.I., Grob M.S., Carrión F. et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J. Periodontol.* 2010; 81 (6): 917-25.
163. Zhang Q.Z., Nguyen A.L., Yu W.H. et al. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *J. Dent. Res.* 2012; 91(11): 1011-8.
164. Fournier B.P.J., Larjava H., Häkkinen L. Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential. *Stem Cells Dev.* 2013; 22(24): 3157-77.
165. Зорин В.Л., Еремин И.И., Рыбко В.А. и др. Слизистая оболочка полости рта — новый источник получения миобластов. *Гены и клетки* 2014; IX(3A): 76-84.
166. Chang H., Yoshimoto M., Umeda K. et al. Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 2009; 23: 1907-19.
167. Darabi R., Arpke R.W., Irion S. et al. Human ES- and iPSC-derived myogenic progenitors restore dystrophin and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell stem cell* 2012; 10: 610-9.
168. Goudenege S., Lebel C., Huot N.B. et al. Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation. *J. Am. Soc. Gene Ther.* 2012; 20: 2153-67.
169. Filareto A., Parker S., Darabi R. et al. An ex vivo gene therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells. *Nat. communications* 2013; 4: 1549.
170. Tedesco F.S., Gerli M.F., Perani L. et al. Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci. transl. med.* 2012; 4:140ra89.
171. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGFbeta superfamily member. *Nature* 1997; 387: 83-90.
172. Schuelke M., Wagner K.R., Stolz L.E. et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350(26): 2682-8.
173. White T.A., LeBrasseur N.K. Myostatin and Sarcopenia: Opportunities and Challenges. *A Mini-Review Gerontol.* 2014; 60: 289-93.
174. Bogdanovich S., Krag T.O., Barton E.R. et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002; 420(6914): 418-21.
175. 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: 635-42.
176. Malik V., Rodino-Klapac L., Mendell J.R. Emerging Drugs for Duchenne Muscular Dystrophy. *Exp. Opin. Emerg. Drugs* 2012; 17(2): 261-77.
177. Bartoli M., Poupiot J., Vulin A. et al. AAV-mediated delivery of a mutated myostatin propeptide ameliorates calpain 3 but not alpha-sarcoglycan deficiency. *Gene Ther.* 2007; 14(9): 733-40.
178. Benabdallah B.F., Bouchentouf M., Rousseau J. et al. Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice. *Cell Transplant.* 2008; 17(3): 337-50.
179. Nakatani M., Takehara Y., Sugino H. et al. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J.* 2008; 22(2): 477-87.
180. Colussi C., Gaetano C., Capogrossi M.C. AAV-dependent targeting of myostatin function: Follistatin strikes back at muscular dystrophy. *Gene Ther.* 2008; 15: 1075-1076.
181. Zhu J., Li Y., Lu A. et al. Follistatin improves skeletal muscle healing after injury and disease through an interaction with muscle regeneration, angiogenesis and fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2011; 179(2): 915-30.
182. Haidet A.M., Rizo L., Handy C. et al. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *PNAS USA* 2008; 105(11): 4318-22.
183. Rodino-Klapac L.R., Janssen P.M., Shontz K.M. et al. Microdystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22(24): 4929-37.
184. Shimizu-Motohashi Y., Asakura A. Angiogenesis as a novel therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy through decreased ischemia and increased satellite cells. *Front Physiol.* 2014; 5: 50.
185. Law P.K., Bertorini T.E., Goodwin T.G. et al. Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 1990; 336(8707): 114-5.
186. Skuk D., Tremblay J.P. Clarifying Misconceptions About Myoblast Transplantation in Myology. *Mol. Ther.* 2014; 22(5): 897-8.
187. Treatment of Dysphagia in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy by Autologous Transplantation of Myoblasts (OPMD). NCT00773227. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00773227>.
188. Périé S., Trollet C., Mouly V. et al., Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol. Ther.* 2014; 22(11): 219-25.
189. Transplantation of Myoblasts to Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Patients. NCT02196467. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02196467>.
190. Stem Cell Therapy in Limb Girdle Muscular Dystrophy. NCT02050776. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02050776?term=NCT02050776>.
191. Sharma A., Sane H., Badhe P. et al. A clinical study shows safety and efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy to improve quality of life in muscular dystrophy patients. *Cell Transplant.* 2013; 22(Suppl 1): S127-38.
192. Sharma A., Sane H., Paranjape A. et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in Duchenne muscular dystrophy - a case report. *Am. J. Case Rep.* 2014; 15: 128-34.
193. Study Safety and Efficacy of Bone Marrow Derived Autologous Cells for the Treatment of Muscular Dystrophy. NCT01834066. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01834066?term=NCT01834066>.
194. Stem Cell Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. NCT02241434. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02241434?term=NCT02241434>.
195. Torrente Y., Belicchi M., Marchesi C. et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* 2007; 16(6): 563-77.
196. Intramuscular Transplantation of Muscle Derived Stem Cell and Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients With Facioscapulohumeral Dystrophy (FSHD). NCT02208713. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT02208713>.
197. Safety and Efficacy of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy for Patients With Duchenne Muscular Dystrophy. NCT01610440. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01610440?term=NCT01610440&rank=1>.
198. Allogeneic Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for a Single Male Patient With Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). NCT02235844. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02235844?term=NCT02235844>.
199. Efficacy of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Duchenne Muscular Dystrophy. NCT02285673. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02285673?term=NCT02285673>.
200. Efficacy of Stem Cell Therapy in Ambulatory and Non-ambulatory Children With Duchenne Muscular Dystrophy - Phase 1-2. NCT02484560. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02484560?term=NCT02484560>.
201. Gene Transfer Therapy for Treating Children and Adults With Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2D (LGMD2D). NCT00494195. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00494195?term=NCT00494195>.
202. Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R., Rosales-Quintero X. et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann. Neurol.* 2009; 66(3): 290-7.
203. Gene Transfer Clinical Trial for LGMD2D (Alpha-sarcoglycan Deficiency) Using scAAVrh74.tMCK.hSGCA. NCT01976091. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01976091?term=NCT01976091>.
204. Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R., Rosales X.Q. et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann. Neurol.* 2010; 68(5): 629-38.
205. Clinical Study of AAV1-gamma-sarcoglycan Gene Therapy for Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2C. NCT01344798. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01344798?term=NCT01344798>.
206. Herson S., Hentati F., Rigolet A. A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1-gamma-sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. *Brain* 2012; 135(Pt 2): 483-92.
207. Safety Study of Mini-dystrophin Gene to Treat Duchenne Muscular Dystrophy. NCT00428935. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00428935?term=NCT00428935>.
208. Clinical Intramuscular Gene Transfer Trial of rAAVrh74.MCK.Micro-Dystrophin to Patients With Duchenne Muscular Dystrophy. NCT02376816. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02376816?term=NCT02376816>.
209. Safety and Efficacy Study of Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy. NCT00159250. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00159250?term=NCT00159250>.
210. Kinali M., Arechavala-Gomez V., Feng L. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 2009; 8(10): 918-28.
211. Dose-Ranging Study of AVI-4658 to Induce Dystrophin Expression in Selected Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Patients. NCT00844597. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00844597?term=NCT00844597>.
212. Cirak S., Arechavala-Gomez V., Guglieri M. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 2011; 378(9791): 595-605.
213. Efficacy Study of AVI-4658 to Induce Dystrophin Expression in Selected Duchenne Muscular Dystrophy Patients. NCT01396239. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01396239?term=NCT01396239>.

214. Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R., Sahenk Z. et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2013; 74(5): 637-47.
215. Efficacy, Safety, and Tolerability Rollover Study of Eteplirsen in Subjects With Duchenne Muscular Dystrophy. NCT01540409. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01540409?term=NCT01540409>.
216. Safety Study of Eteplirsen to Treat Advanced Stage Duchenne Muscular Dystrophy. NCT02286947. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02286947?term=NCT02286947>.
217. Safety Study of Eteplirsen to Treat Early Stage Duchenne Muscular Dystrophy. NCT02420379. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02420379?term=NCT02420379>.
218. Confirmatory Study of Eteplirsen in DMD Patients (PROMOVI). NCT02255552. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02255552?term=NCT02255552>.
219. A Phase I/II, Open Label, Escalating Dose, Pilot Study to Assess Effect, Safety, Tolerability and PK of Multiple SC Doses of Drisapersen in Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and to Assess the Potential for IV Dosing as an Alternative Route of Administration. NCT01910649. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01910649>.
220. Goemans N.M., Tulinus M., van den Akker J.T. et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(16): 1513-22.
221. Open Label Study of GSK2402968 in Subjects With Duchenne Muscular Dystrophy. NCT01480245. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01480245?term=NCT01480245>.
222. Drisapersen Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Treatment Protocol. NCT01890798. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01890798?term=NCT01890798>.
223. A Study of the Safety, Tolerability & Efficacy of Long-term Administration of Drisapersen in US & Canadian Subjects. NCT01803412. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01803412?term=NCT01803412>.
224. Follistatin Gene Transfer to Patients With Becker Muscular Dystrophy and Sporadic Inclusion Body Myositis. NCT01519349. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01519349?term=NCT01519349>.
225. Clinical Intramuscular Gene Transfer of rAAV1.CMV.huFollistatin344 Trial to Patients With Duchenne Muscular Dystrophy. NCT02354781. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT02354781>.
226. Study Evaluating MYO-029 in Adult Muscular Dystrophy. NCT00104078. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00104078>.
227. Zhang C., Feng H.Y., Huang S.L. et al. Therapy of Duchenne muscular dystrophy with umbilical cord blood stem cell transplantation. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2005; 22(4): 399-405.
228. Romero N.B., Benveniste O., Payan C. et al. Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part I: clinical protocol. *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12(Suppl 1): S49-51.
229. Fardeau M., Braun S., Romero N.B. et al. About a phase I gene therapy clinical trial with a full-length dystrophin gene-plasmid in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J. Soc. Biol.* 2005; 199(1): 29-32.

Поступила: 20.11.2014