

Современные подходы к лечению миодистрофий

Вяхирева Ю.В.¹, Зернов Н.В.¹, Марахонов А.В.^{1,2}, Гуськова А.А.¹, Скоблов М.Ю.^{1,2,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва 115478, e-mail: mskoblov@generesearch.ru

² — Московский физико-технический институт, Долгопрудный 141700, Московская обл.

³ — Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва 127473

Мышечные дистрофии представляют собой группу генетически обусловленных нервно-мышечных заболеваний, характеризующихся нарастающей мышечной слабостью и дегенерацией мышц. Наиболее распространенные из них — миодистрофия Дюшенна (МДД) и лице-плече-лопаточная дистрофия Ландузи—Дежерина (МЛД). К настоящему времени патогенез данных заболеваний достаточно хорошо изучен, что позволяет разрабатывать различные терапевтические подходы. Некоторые препараты для терапии МДД прошли все стадии клинических испытаний, одобрены медицинскими ассоциациями и применяются для лечения больных. В случае же МЛД, кардинально отличающейся своим патогенезом, терапевтические подходы только разрабатываются. Появившиеся в последнее время молекулярные и клеточные технологии в совокупности с пониманием патогенеза данного заболевания позволяют надеяться на скорый успех в данной области.

Ключевые слова: миодистрофия Дюшенна, миодистрофия Ландузи—Дежерина, патогенез заболевания, терапия моногенных заболеваний

Введение

Мышечные дистрофии (МД) представляют собой клинически, биохимически и генетически гетерогенную группу заболеваний, характеризующуюся прогрессирующей слабостью различных групп мышц, повышением уровня креатинфосфокиназы в плазме крови и первично-мышечным характером поражения на электромиограмме [1]. При некоторых нозологических формах МД наблюдается вовлечение других органов и тканей, таких, как мозг или структуры глазного яблока, а также возникновение выраженных нарушений сердечного ритма.

В представленном обзоре изложены современные данные о патогенезе и разрабатываемых способах лечения двух наиболее распространенных МД: миодистрофии Дюшенна (МДД) и лице-плече-лопаточной миодистрофии Ландузи—Дежерина (МЛД).

Патогенез миодистрофии Дюшенна (OMIM #310200)

МДД — наиболее тяжелое и часто встречающееся нервно-мышечное заболевание с X-сцепленным рецессивным типом наследования. Частота встречаемости МДД у мужчин достигает 1:3600 [2]. Клиническая карти-

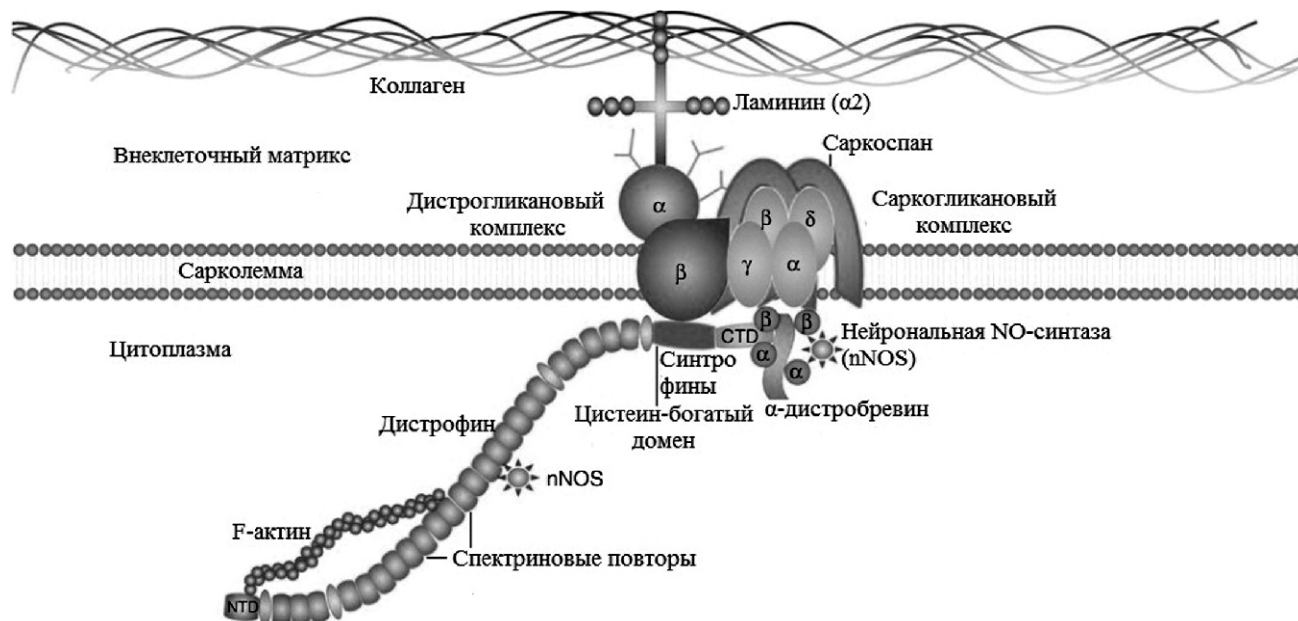


Рис. 1. Структура ДАБК.

на и типичные особенности наследования с преимущественным поражением мальчиков были впервые описаны английским врачом Эдвардом Мерионом в 1851 г. [3]. Он обнаружил, что спинной мозг у таких больных не поражается, таким образом, показав мышечную природу расстройства [4]. Кроме того, Мерион впервые провел гистологическое исследование биоптатов мышц обследуемых пациентов и обнаружил типичные изменения сарколеммы мышечных клеток [5]. Однако по различным причинам его данные не использовались в медицинском сообществе. Несколькими годами спустя это заболевание было изучено другим врачом — Гийомом Дюшенном, именем которого и было названо описанное нервно-мышечное расстройство [6, 7].

Причиной МДД являются мутации в гене дистрофина (OMIM *300377), расположенном на X-хромосоме, его длина составляет около 2,2 млн п.н., что делает его одним из самых длинных генов в человеческом геноме. Ген дистрофина экспрессируется, в основном, в мышечных клетках, в кардиомиоцитах и в клетках Пуркинье в мозге [8]. Транскрипция гена осуществляется с трех независимых промоторов, которые тканеспецифично распознаются РНК-полимеразой в каждом из упомянутых типов клеток. В результате мутаций нарушаются экспрессия, структура и функция белка дистрофина, который принимает участие в образовании сложной функциональной сети, необходимой для поддержания структуры мышечной клетки, — так называемого дистрофин-ассоциированного белкового комплекса (ДАБК) [9]. Структура ДАБК представлена на рис. 1.

ДАБК является связующим звеном между миофибриллами и внеклеточным матриксом и обеспечивает поддержание стабильности сарколеммы (рис. 1). Центральный домен белка дистрофина содержит 24 спектриновых повтора и четыре петлевых участка. N-концевой домен и спектриновые повторы взаимодействуют с молекулами F-актина в цитозоле. Богатый цистеином C-концевой домен связывает дистрофин с β -дистрогликанами, ассоциированными с сарколеммой. β -дистрогликаны, в свою очередь, связываются с α -, γ - и δ -дистрогликанами, с образованием сложного дистрогликанового комплекса. Этот комплекс стабилизируется за счет связывания с саркоспанами, расположенными на сарколемме, а также α 2-ламинином во внеклеточном матриксе. C-концевой домен дистрофина образует также связь с несколькими цитозольными белками, такими, как α -дистробревин и синтрофины (α и β). Синтрофины способны привлекать молекулы нейрональной синтазы оксида азота (HCOA) к сарколемме через специфические PDZ домены в их структуре, чтобы регулировать поступление крови в мышечное волокно. Помимо этого, дистрофин взаимодействует с микротрубочками косвенно через анкирин-B и непосредственно через спектриновые повторы 20—23. Таким образом, дистрофин является важной молекулой, обеспечивающей, главным образом, структурную функцию [10, 11].

В нервной системе дистрофин может входить в состав аналогичного по составу комплекса [12]. Но чаще в состав этого комплекса входят белок утrophин, а также дополнительный белок распин. Принципиальная структура утrophинового комплекса схожа с дистрофин-ассоциированным комплексом в мышечных волокнах. Комплекс на основе утrophина принимает участие в кластеризации ацетилхолиновых рецепторов на поверхности мембраны клетки. Кроме того, C-концевой домен утrophина связывается с белком MAST, который опосредует взаимодействие комплекса с микротрубочками [13]. Поэтому степень умственной отсталости при миодистрофии Дюшенна определяется уровнем экспрессии дистрофина в ЦНС.

В результате мутаций в гене дистрофина структура и функционирование комплекса ДАБК нарушается, что приводит к развитию симптомов, затрагивающих экспрессирующие данный белок ткани: прогрессирующей мышечной слабости, кардиомиопатии и умственной отсталости [1, 6].

Наиболее частые мутации, вызывающие МДД — крупные делеции одного или нескольких экзонов (частота встречаемости — 65%), дупликации (6—10%) разных участков гена, оставшуюся часть составляют точковые мутации, в том числе приводящие к сдвигу рамки считывания [14]. К настоящему времени зарегистрировано около тысячи различных патогенных мутаций в гене дистрофина. Большинство из них приводит к МДД, однако описано около 10 вариантов, ведущих к развитию менее тяжелого варианта МД — дистрофии Беккера (OMIM #300376). Кроме этого, охарактеризованы 2 мутации, ведущие к развитию дилатационной кардиомиопатии (OMIM #302045) [8].

Отсутствие нормально функционирующей молекулы дистрофина приводит к нарушению функционирования сложной сети взаимодействующих белков в мышечном волокне, что ведет к снижению стабильности мембраны, приводя к развитию некроза мышечных волокон и возникновению хронического воспаления. В этих условиях активируются сателлитные клетки, необходимые для восстановления мышечных клеток. Однако довольно быстро их ресурсов перестает хватать для нормального восстановления структуры и функций мышечных волокон, приводя к их дистрофии [15].

Для изучения патогенеза, а также разработки и тестирования новых методов лечения была получена модельная линия мышей со спонтанной нонсенс-мутацией в экзоне 23 дистрофина, называемая *mdx*. Мутация вызывает появление преждевременного стоп-кодона, что останавливает трансляцию дистрофина. Фенотип таких мышей соответствует клинической картине МД с более мягко выраженными симптомами и медленно прогрессирующим заболеванием [16, 17]. В связи с этим использование данной модельной линии ограничено тестированием лишь некоторых препаратов, однако это дает представления о патогенезе заболевания у некоторого числа пациентов.

Варианты лечения МДД

Из-за высокой частоты встречаемости МДД, а также вследствие хорошо изученного патогенеза заболевания, предлагается много различных вариантов лечения (рис. 2). Все существующие на сегодня способы лечения можно разделить на паллиативную и этиотропную терапию. В паллиативную группу входит лечение кортикостероидами (противовоспалительная терапия) и лечение стволовыми клетками (клеточная терапия). Этиотропная терапия включает в себя подходы супрессии преждевременного стоп-кодона, метод пропуска экзона (антисмысловая терапия) и большой арсенал различных вариантов генной терапии, включающих экспрессию нормального дистрофина, компенсацию отсутствия дистрофина утрофином, редактирование генома (рис. 2).

Для оценки эффективности терапии МДД используются молекулярные методы и физиологические тесты. К молекулярным относят различные методы, позволяющие обнаружить и оценить терапевтический эффект по восстановлению экспрессии нормального белка. К физиологическим относят функциональные тесты, отражающие состояние пациентов. Одним из широко используемых физиологических тестов при оценке эффективности лечения МДД является тест 6-минутной ходьбы. В ходе теста измеряется расстояние, пройденное пациентом за 6 минут по твердой плоской поверхности. Это расстояние напрямую зависит от степени выраженности мышечной дистрофии — главного клинического проявления МДД, поэтому тест является наиболее применимым для оценки состояния больных.

Паллиативная терапия Противовоспалительная терапия

В настоящее время применение глюкокортикоидов является золотым стандартом в лечении МДД, позволяющим замедлить прогрессию МД. Впервые ее предложили в 1974 г. [18], тем не менее, этот вид терапии остается самым активно применяемым, несмотря на серьезные побочные эффекты, связанные с длительным применением глюкокортикостероидных гормонов: повышение массы тела, синдром Кушинга, расстройства нервной системы, нарушения со стороны ЖКТ, метаболические расстройства, остеопороз [19].

Действие глюкокортикоидов направлено на устранение воспаления, вызываемого постоянным повреждением мышечных волокон и приводящим к гиперактивации сателлитных клеток.

В настоящее время используют два основных препарата: преднизолон и дефлазакорт, принимаемые наиболее часто в дозе 0,75 мг на кг массы в день преднизолона или 0,9 мг на кг массы в день дефлазакарта [20].

Преднизолон является наиболее часто используемым кортикостероидом, как у детей, так и у взрослых. Дефлазакорт — новый препарат, который обладает меньшей токсичностью и реже вызывает побочные эффекты, хотя для достижения эквивалентного терапевтического эффекта доза дефлазакарта должна быть выше дозы преднизолона. Однако это компенсируется более пролонгированным эффектом дефлазакарта по сравнению с преднизолоном. Кроме того, использование дефлазакарта оказывает меньшее влияние на углеводный обмен [21].

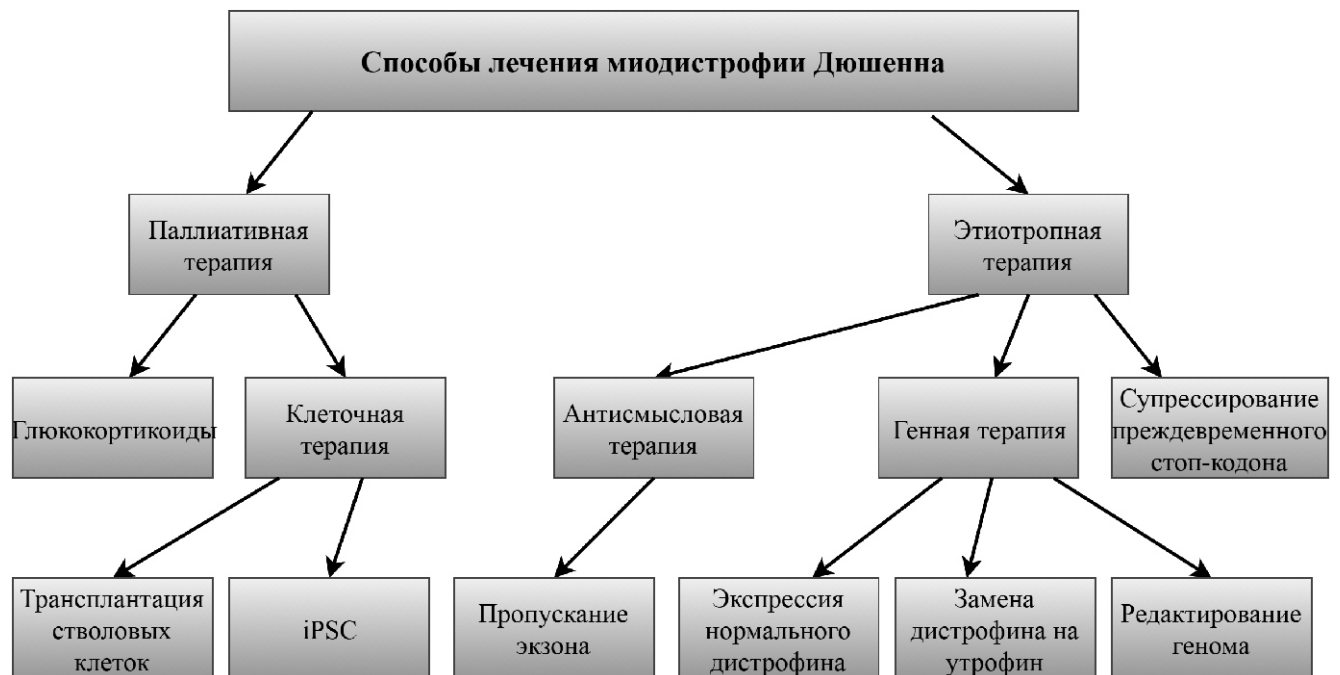


Рис. 2. Современные подходы к лечению МДД.

Применение кортикостероидов вызывает значительное замедление прогрессии МД при использовании от полугода до двух лет [22–26]. Некоторые исследования показывают, что при более длительном применении (до 5 лет) кортикостероиды улучшают состояние сердечной мышцы, дыхательной системы, а также общее качество жизни больных [27–30].

Ряд работ посвящен воздействию на альтернативные мишени, принимающие участие в развитии хронического воспаления. Одной из таких мишеней является путь, запускаемый транскрипционным фактором NF-κB. Эти данные позволили Heig с соавторами найти соединение VBP15, являющееся ингибитором NF-κB. VBP15 представляет собой структурно сходное с глюкокортикоидными гормонами соединение. VBP15 не действует сходно с глюкокортикоидами, но повышает специфичность глюкокортикостероидного рецептора и его экспрессию на поверхности клеток. Его использование на модельных мышцах линии *mdx* показало более эффективное противовоспалительное действие при совместном использовании с глюкокортикостероидными гормонами, например преднизолоном [31].

Клеточная терапия

Первой попыткой применения клеточной терапии для лечения пациентов с МДД было использование миоцитов здоровых доноров (как правило, родственников), вводимых внутримышечно. Однако этот метод не получил распространения ввиду низкой выживаемости вводимых клеток, невысокого процента их миграции в зону мышечных волокон, а также ответной иммунной реакции на чужеродные клетки [32]. С развитием технологий стали использовать аутологичные стволовые клетки, получаемые от пациентов. Эти клетки могут дифференцироваться в миоциты и способствовать регенерации мышечных волокон, замедляя таким образом прогрессию заболевания. Для поиска оптимального источника были протестированы клетки, полученные из разных источников. Наилучшие результаты по эффективности миграции и дифференцировки показали мезенхимные и сосудодиссоциированные мышечные стволовые клетки [32–34].

Кроме получения стволовых клеток путем биопсии, существуют технологии, с помощью которых можно получить стволовые клетки — так называемые iPS — индуцированные плюрипотентные клетки — из дифференцированных клеток, вызывая индукцию экспрессии в них маркеров стволовых клеток [35]. В настоящее время iPS получают из дифференцированных клеток пациентов, а далее дифференцируют их в другой тип клеток для получения моделей развития патологии у конкретного пациента, например, в кардиомиоциты [36]. Такие iPS получают не только для моделирования, но и для исправления мутаций, приведших к заболеванию, путем редактирования их генома с помощью разнообразных

инструментов, таких, как системы TALEN (Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALE-ассоциированные нуклеазы) и CRISPR/Cas9 (Clustered, Regularly Interspaced, Short Palindromic Repeats (CRISPR)-CRISPR-associated system (Cas), сгруппированные короткие палиндромные повторы, разделенные промежутками, и ассоциированная с ними система) [37]. Далее, эти клетки с уже нормально экспрессирующимся дистрофином можно трансплантировать в мышцы больных, избегая тем самым иммунных реакций.

Применение аутологичных клеток в сочетании с редактированием генома является довольно перспективным подходом для терапии не только МДД, но и других заболеваний, как например β-талассемии [38], дегенеративных заболеваний сетчатки [39]. Развитие подходов к трансплантации и методов получения iPS, оптимизация методов редактирования генома дадут толчок к широкому применению этого подхода в клинической практике.

Этиотропная терапия Генная терапия

Под генной терапией подразумевают доставку нормальной копии гена в клетки, содержащие его дефектные копии. К настоящему времени международными ассоциациями были допущены к применению около десятка препаратов для лечения различных заболеваний, как наследственных, так и приобретенных.

Лечение МДД с использованием генной терапии представляется затруднительным ввиду большого размера зрелой мРНК (около 14 т.п.н.) [9]. Такой протяженный фрагмент сложно не только клонировать, но и доставить в клетки. Однако наблюдения за больными миодистрофией Беккера показали, что для компенсации отсутствующего дистрофина вполне достаточно наличия укороченного белка размером до половины исходной длины — мини/микродистрофина [32].

Другой важной составляющей генной терапии является система доставки, которая должна отвечать ряду требований: быть эффективной, способной нести транскрипт нужного размера, направленной в отношении определенного типа клеток, неиммунотоксичной и непатогенной для человека [40]. На сегодняшний день одним из самых распространенных и безопасных вариантов является система на основе адено-ассоциированного вируса. Максимальный размер вставки в такой вектор составляет 5 т.п.н. Однако введение векторов, содержащих мини/микродистрофин, мышцам линии *mdx* не вызывало значительного увеличения уровня дистрофина. Это было связано, прежде всего, с иммунным ответом на продуцируемый белок, а также компоненты системы доставки [33, 41, 42]. Данная проблема была отчасти решена изменением серотипа адено-ассоциированного вируса, что привело к положительному эффекту не только у молодых мышей, но и у старых. Полностью проблему

иммуногенности как вектора, так и целевого белкового продукта устранить к настоящему времени не удастся, но сейчас группа ученых под руководством Van Westering ведет исследования в направлении создания химерных векторов — комбинации вирусов гAAB2/8 двух серотипов, — которые увеличивают экспрессию дистрофина в скелетной и сердечной мускулатуре и не вызывают иммунного ответа [17].

Многообещающим вариантом генной терапии выглядит идея замены дистрофина на его гомолог утrophин. Утрофин имеет меньшую по сравнению с дистрофином молекулярную массу в 395 кДа (против 427 кДа у дистрофина) и обладает похожей на дистрофин структурой и свойствами связывать другие белки. В мышцах взрослых здоровых людей утрофин локализован в синапсах и мышечно-сухожильных соединениях. У больных МД экспрессия утрофина повышается вследствие отсутствия дистрофина для компенсации нарушенной функции. Несмотря на некоторые функциональные отличия, утрофин может эффективно заменять дистрофин, как было показано в экспериментах на мышцах линии *mdx* [43, 44].

Tinsley с соавторами создали препарат SMT C1100 — индуктор экспрессии утрофина. При введении в человеческие линии клеток он увеличивал экспрессию утрофина как на уровне мРНК, так и на уровне белка без проявления побочных эффектов. В настоящий момент идут клинические испытания фазы Ib этого препарата [44]. В ходе первой фазы клинических испытаний применение на здоровых добровольцах продемонстрировало безопасность препарата, а также отсутствие побочных эффектов, что явилось главным положительным качеством этого препарата, однако его применение вызвало повышение уровней печеночных ферментов [45].

Хотя препарат еще не дошел до более поздних стадий клинических испытаний и не доказал свою эффективность у больных, замена дистрофина на утрофин может стать более универсальным подходом, потому что замена дефектного белка на аналогичный по функции может быть эффективной для пациентов с разными типами мутаций, а не только изменениями в определенных экзонах.

Наиболее перспективными направлениями этиотропной терапии наследственных заболеваний, в том числе и МДД являются стратегии *редактирования генома*. К настоящему времени опубликован ряд работ по использованию системы CRISPR для редактирования генома. Все они были выполнены на модельной линии *mdx* с нонсенс-мутацией в экзоне 23. Для восстановления нормального фенотипа у этой линии необходимо восстановить рамку считывания, что было достигнуто вырезанием всего экзона путем конструирования направляющих РНК (sgRNA). В качестве системы доставки в работах использованы адено-ассоциированные вирусные векторы разных серотипов. При постнатальном

редактировании генома было показано, что уровень дистрофина в мышечных волокнах может увеличиваться до 59% [46] при внутримышечном способе введения. Кроме того, было показано, что адено-ассоциированный вирус способен преодолевать гематоэнцефалический барьер. И действительно, было продемонстрировано восстановление локализации нейрональной синтазы, что в дальнейшем может позволить нивелировать проявления умственной отсталости при использовании данной системы у человека [46].

Стоит отметить, что внутримышечный способ введения препарата не является единственным. На новорожденных мышцах протестировали способы введения в ретроорбитальное венозное сплетение (как альтернативу внутривенному) и внутрибрюшинный. При сравнении средних значений экспрессии дистрофина в мышечных волокнах и кардиомиоцитах, оказалось, что наименее эффективно увеличивает экспрессию внутрибрюшинный способ введения, а лучше всего увеличивает экспрессию внутримышечный способ введения [47].

Данные работы были посвящены возможности редактирования гена дистрофина с мутацией в экзоне 23, однако заболевание может быть вызвано большим спектром разных мутаций, поэтому при разработке лечения с помощью систем редактирования генома потребуется персонализированный подход.

Супрессия преждевременного стоп-кодона

Еще одной стратегией терапии МДД является индукция трансляции белка через преждевременный стоп-кодон (так называемая супрессия), появление которого ответственно за 13% случаев МДД. Некоторые виды антибиотиков, например, гентамицин, продемонстрировали способность активировать прочтение рибосомой преждевременного стоп-кодона, как значимого, тем самым восстанавливая синтез полноразмерного белка, увеличивая уровень дистрофина до 15% [48]. Поскольку гентамицин весьма токсичен, был проведен поиск более безопасных соединений, обладающих таким же свойством. Первое в таком классе соединение — *ataluren* (Translarna, PTC124) [49].

На настоящее время закончены клинические испытания аталурена, проведенные по современным стандартам. Для их проведения были отобраны 174 мальчика старше 5 лет с нонсенс-мутациями в гене дистрофина. На 48-й неделе испытаний было показано, что малые дозы (утром — 10 мг/кг, днем — 10 мг/кг, вечером — 20 мг/кг) более эффективно улучшают результаты теста 6-минутной ходьбы, чем высокие (больше в два раза) (рис. 3). Кроме того, было отмечено, что у пациентов с тяжелой формой МД, принимавших аталурен, увеличивается время самостоятельного использования рук для приема пищи и питья [50]. Однако авторы отмечают, что эти данные не являются статистически значимыми.

Стратегия супрессии терминирующего кодона является весьма перспективной для увеличения уровня дистрофина в мышечных волокнах, однако она применима только для нонсенс-мутаций, в то время как при делециях, приводящих к изменению рамки считывания, она не будет эффективна. Кроме того, такая супрессия может вызывать трансляцию других нежелательных белков, что может сопровождаться развитием побочных эффектов. В ходе клинических испытаний у пациентов, принимавших аталурен, наблюдались такие побочные эффекты, как: расстройства ЖКТ (тошнота, рвота, диарея, метеоризм, дискомфорт в желудке), инфекционные осложнения (грипп, ринит, ушные инфекции), а также нарушения со стороны нервной системы (боли в конечностях, спине, мышечные спазмы). Комбинация аталурена с аминогликозидными антибиотиками резко ухудшила функцию почек [50].

Пропускание экзона (exon-skipping)

Гены эукариот имеют сложную структуру, состоящую из экзонов и интронов. При созревании пре-мРНК происходит сплайсинг, в ходе которого из нее вырезаются интроны и остаются только кодирующие белок экзоны. Однако у эукариот довольно распространено явление альтернативного сплайсинга, при котором альтернативные изоформы мРНК могут содержать различные сочетания вырезаемых интронов и экзонов. Это явление может быть использовано при разработке способов лечения различных заболеваний, в том числе и МДД.

Пропускание экзона (exon-skipping) является одним из широко распространенных подходов терапии на

основе механизмов сплайсинга. Он направлен на индуцирование альтернативного сплайсинга путем «пропускания» мутантного экзона при созревании пре-мРНК с исключением его из зрелой мРНК. Для этой цели в основном используются антисмысловые олигонуклеотиды (ASON) с системой доставки. ASON — олигонуклеотиды длиной 20—30 нуклеотидов, подбираемые комплементарно последовательностям мРНК, фланкирующим мутантный экзон, таким образом, чтобы восстановить рамку считывания в новой изоформе [43]. Индукция сплайсинга посредством ASON вызывает вырезание «неправильного» экзона, восстановление рамки считывания в мРНК и продукцию уменьшенного в размерах белка, однако способного частично выполнять свою функцию (рис. 4).

Первые поколения препаратов ASON показали высокую эффективность на клеточных линиях, но не дошли до пациентов в связи с низкой эффективностью образования нормального белка в сердечной мышце, быстрым выведением из организма, а также низкой эффективностью доставки. Поэтому все силы исследователей были направлены на разработку более эффективной системы доставки [13].

Было показано, что малые ядерные РНК, например, U7, индуцируют высокоэффективное пропускание экзона как *in vitro*, так и *in vivo* [51]. Инъекции векторов, содержащих комбинацию антисмыслового олигонуклеотида против мутантного участка и малую ядерную РНК, повышали уровень дистрофина практически до нормы как в скелетной, так и сердечной мышцах. Однако главной проблемой этой методики является иммунный ответ пациента на вводимую конструкцию.

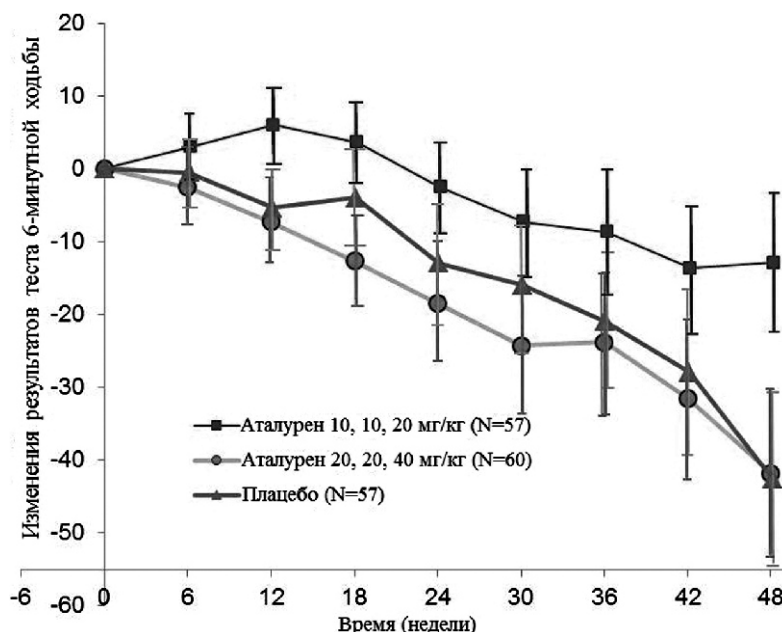


Рис. 3. Результаты теста 6-минутной ходьбы при применении различных доз аталурена в сравнении с плацебо [50].

Для увеличения времени жизни антисмысловых олигонуклеотидов, силы взаимодействия с транскриптом-мишенью, а также для увеличения специфичности и упрощения доставки в клетку существует множество разработок по модификации сахарофосфатного остова олигонуклеотидов [52]. Наиболее часто используемыми модификациями являются 2'-О метилфосфоротиоат — модификация рибозного кольца с фосфоротиоатными связями по всей длине олигонуклеотида — и фосфородиамидат-морфолиновые олигомеры (РМО), в которых рибоза заменена на 6-членное гетероциклическое соединение морфолин, а фосфатные мостики заменены на фосфородиамидат [16]. В первых исследованиях было показано отсутствие иммунного ответа на такие олигонуклеотиды, а также увеличение уровня укороченного дистрофина в скелетной мускулатуре, но недостаточное изменение количества белка в сердечной мышце [53—57]. Недавно была описана модификация, называемая *Pip* (РМО internalizing peptides — РМО интернализирующие пептиды) [16]. Это конъюгация антисмысловых олигонуклеотидов с пептидными молекулами, встраивающимися в мембрану клеток, что увеличивает специфичность и эффективность доставки. Использование этого способа модификации позволило получить достаточно хороший уровень восстановления уровня белка как в скелетной, так и в сердечной мускулатуре.

Betts с соавторами описали новый класс трицикло-ДНК (tcDNA) с уникальными фармакологическими свойствами, способный попадать в скелетную и сердечную мускулатуру, а также мозг. Трицикло-ДНК представляет собой два объединенных кольца, одно из которых связано с азотистым основанием, а другое — с остатком фосфорной кислоты. По сравнению с другими модификациями олигонуклеотидов tcDNA более эффективно действуют при использовании на мышцах *mdx* для пропуска экзона 23. Помимо ожидаемых эффектов в виде увеличения экспрессии нормального дистрофина, кардиальных эффектов, наблюдались эффекты в ЦНС в виде уменьшения симптоматики. Данные об

эффективности использования для пропуска других экзонов не опубликованы. Эта технология еще не дошла до клинических испытаний [54].

На настоящее время до фазы 3 клинических исследований дошли два препарата АSON: дрисаперсен и этеплирсен на основе 2'-О-метилфосфоротиоатной и фосфородиамидат-морфолиновой модификации олигомеров.

Для второй фазы клинических испытаний этеплирсена были отобраны больные мальчики с делецией в экзоне 51. Их разделили на 4 группы. В двух группах пациенты получали раз в неделю внутривенно часовую инфузию препарата в концентрации 30 мг/кг или 50 мг/кг соответственно, остальные 2 группы — контрольные, получавшие плацебо в тех же концентрациях. Терапия велась в течение 24 и 48 недель. В результате выявили увеличение количества дистрофин-положительных волокон в мышечных биоптатах [58].

Эти результаты позволили провести более длительное исследование на 25 пациентах в течение трех лет. В ходе его было показано статистически значимое различие между прогрессией дистрофии у пациентов, принимавших плацебо, и пациентов, принимавших этеплирсен (рис. 5). Однако этот препарат еще не одобрен американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для применения в клинической практике в связи с довольно частыми побочными эффектами.

Другой препарат для пропуска экзона 51 — дрисаперсен, антисмысловый олигонуклеотид на основе 2'-О-метилфосфоротиоатной модификации остова. На клеточных культурах препарат также показал высокую эффективность по восстановлению рамки считывания дистрофина. Но в ходе клинических испытаний выявили множество побочных эффектов (например, развитие язв в месте инъекций).

При проведении клинических испытаний дрисаперсен вводили подкожно один раз в неделю в дозе 6 мг/кг. При развитии нежелательных побочных эффектов де-

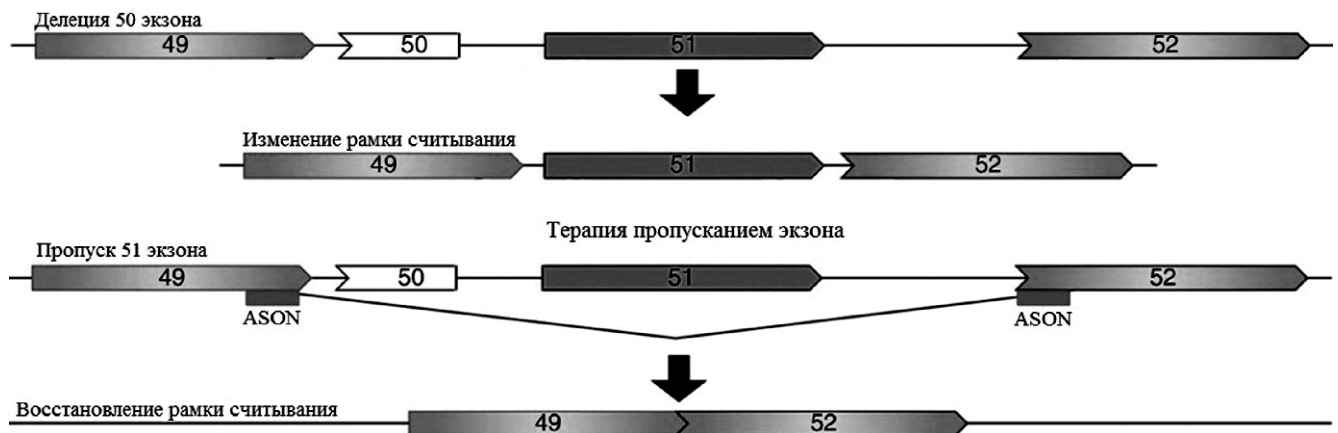


Рис. 4. Принцип технологии пропуска экзона (exon-skipping).

лся перерыв в инъекциях или же способ введения менялся на внутривенный. Эффективность оценивалась по количеству дистрофин-положительных волокон и результатам физиологических тестов по сравнению с плацебо после 24 и 48 недель приема препарата. Происходило достоверное увеличение как уровня дистрофин-положительных волокон, так и пройденного расстояния в тесте 6-минутной ходьбы после 24 недель приема препарата, однако после 48 недель различие было недостоверным (рис. 6). Поначалу, предполагалось, что статистическая незначимость может быть объяснена тем, что через 48 недель препарат эффективен только

у определенной возрастной группы, но это предположение оказалось неверным [62].

Препарат прошел все стадии клинических испытаний, но FDA не одобрило его из-за достаточно высокой токсичности.

Данные клинических исследований убедительно доказывают эффективность препаратов ASON. Однако ASON к 51-му экзону могут оказать терапевтическое действие лишь у 13% пациентов. Процент пациентов, которым может оказать помощь введение антисмысловых олигонуклеотидов, можно увеличить, если появится возможность для пропуска множества экзонов. Од-

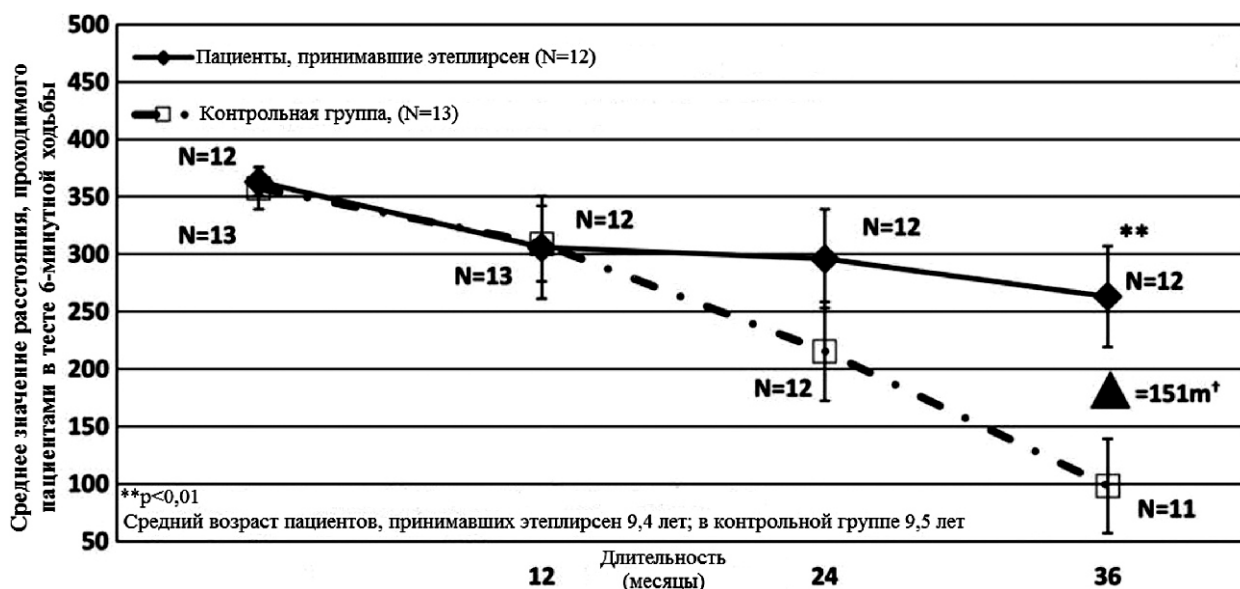


Рис. 5. Результаты клинических испытаний этеплирсена выявили увеличение количества дистрофина в саркомере, замедление прогрессирования заболевания и улучшение результатов теста 6-минутной ходьбы [53, 56, 58, 61].

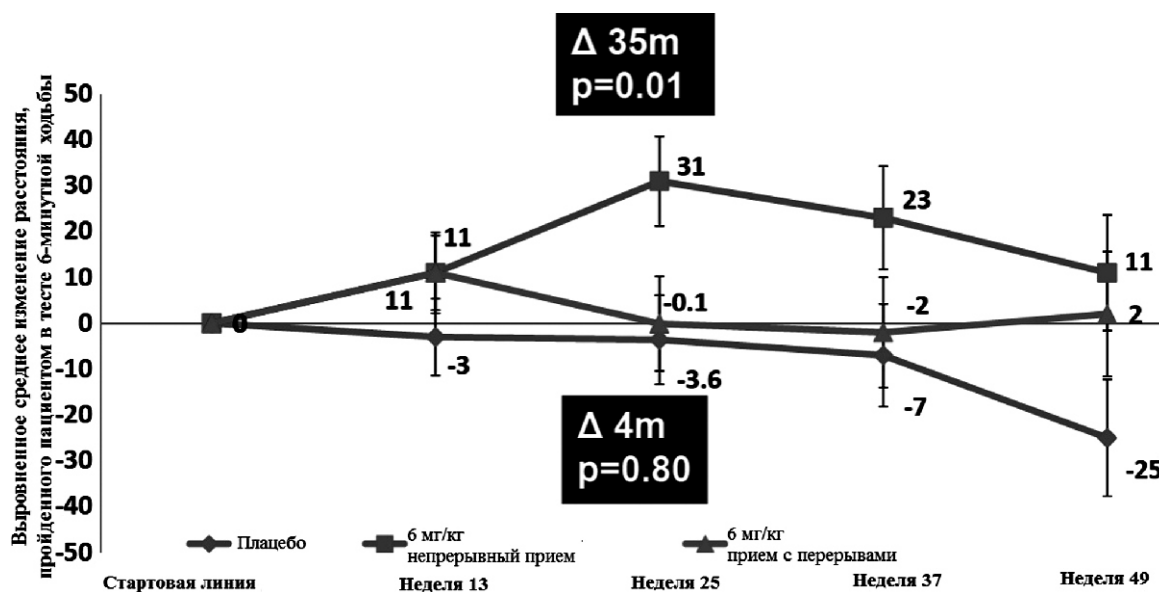


Рис. 6. Результаты теста 6-минутной ходьбы у пациентов, принимавших драсперсен.

нако на данный момент технологическая реализация с одновременной доставкой всех антисмысловых нуклеотидов остается нерешенной задачей [13].

Итак, на сегодняшний день золотым стандартом терапии МДД является симптоматическая терапия глюкокортикостероидами. При их длительном применении возникает множество побочных эффектов без устранения причины заболевания, поэтому ведутся попытки создания эффективной этиотропной терапии. Для этого разработан целый ряд специфичных методик. Несмотря на высокую эффективность на клеточных культурах, они могут оказаться неэффективными для лечения пациентов. Достоверно эффективные препараты могут помочь лишь небольшому числу пациентов. В таблице представлены препараты, клинические испытания которых ведутся в настоящее время [63].

Молекулярный патогенез миодистрофии Ландузи—Дежерина (МЛД)

МЛД — это третье по частоте встречаемости заболевание (по оценкам разных авторов частота встречаемости составляет от 1:10 000 до 1:20 000) среди МД [64—67].

Существует два типа МЛД: часто встречающийся (у 95% больных) с аутосомно-доминантным типом наследования (МЛД 1 типа) и более редкий тип со сложным дигенным механизмом наследования (МЛД 2 типа). Несмотря на отличия в генетической причине, клинически они практически идентичны [68].

Чаще всего, МЛД проявляется региональной, асимметричной мышечной слабостью, начинающейся с мышц лица и плеч и прогрессирующей каудально в течение долгого времени, однако у трети пациентов селек-

тивно поражаются только мышцы лица и плеч. Раннее вовлечение перискапулярных мышц приводит к особому профилю плеч пациентов с МЛД — крыловидным лопаткам, выпрямленным ключицам и округлым плечам. Комбинация таких симптомов, как крыловидные лопатки и слабость мышц лица без других признаков поражения мышц, а также аутосомно-доминантного типа наследования является необходимым и достаточным критерием для постановки диагноза МЛД [69]. В отличие от других видов МД, мышцы глаза, глоточные мышцы и сердечная мышца не поражаются. В связи с медленным прогрессированием заболевания пациент адаптируется к мышечной недостаточности, оставаясь способным в большинстве случаев самостоятельно ходить. Продолжительность жизни не уменьшается, за исключением тяжелых форм или при отсутствии должного ухода. Несмотря на это, доля пациентов, прикованных к инвалидной коляске составляет 10% [70].

Причиной МЛД1 является укорочение субтеломерного региона на длинном плече хромосомы 4, содержащем тандемные повторы D4Z4 размером 3,3 т.п.н. [71]. В норме количество повторов составляет от 11 до 100. Уменьшение количества повторов ниже порога 10 единиц вызывает ремоделирование хроматина в области 4q35, проявляющееся падением уровня метилирования, что способствует экспрессии гена, кодирующего транскрипционный фактор DUX4 (рис. 7) [72]. DUX4 способствует экспрессии генов-мишеней, вызывающих клинические проявления.

При МЛД2 количество повторов D4Z4 остается нормальным, однако уровень их метилирования значительно снижается, что приводит к эктопической экспрессии гена DUX4. Данные изменения связаны с мутациями в гене SMCHD1 (в 85% случаев), белковый продукт ко-

Таблица

Список клинических испытаний препаратов для терапии миодистрофия Дюшенна

Препарат	Химическая природа	Механизм	Введение	Стадия	Дозировка	Эффективность
Eteplirsen	PMO ASON	Пропускание экзона 51	в/в	3	1. 50,0 мг/кг раз в неделю в течение 60 минут в/в инфузии 24 недели 2. 30,0 мг/кг в течение 60 минут в/в инфузии 24 недели	Показано увеличение уровня дистрофина в биоптатах двуглавой мышцы плеча, достоверное улучшение результатов теста 6-минутной ходьбы
Ataluren	Производное оксидиазола бензойной кислоты	Супрессирование преждевременного стоп-кодона	в/в	3	40 мг/кг в день в течение 48 недель	Достоверное улучшение результатов теста 6-минутной ходьбы
Drisapersen	2'-O methyl phosphorothioate ASON	Пропускание экзона 51	в/в	3	6 мг/кг в неделю в течение 48 недель	Достоверное улучшение результатов теста 6-минутной ходьбы
Ezutromid	Производное бензоксазола	Индукция экспрессии утрофина	Нет данных	2	Данные не опубликованы	Нет данных
NS-065	PMO ASON	Пропускание экзона 53	Нет данных	2	Нет данных	На 10 пациентах было показано увеличение количества дистрофина

торого поддерживает метилирование региона 4q35 и структуру хромосом [73].

Описана также комбинация малого числа повторов D4Z4 и мутаций в гене *SMCHD1*. Клинические симптомы у пациентов с такими изменениями намного серьезнее и тяжелее по сравнению с теми, у которых обнаружено только уменьшение количества повторов D4Z4.

Запускаемая DUX4 экспрессия генов вызывает несколько процессов в клетке. Пожалуй, самым значимым является р53-зависимый апоптоз и хроническое воспаление скелетных мышц [74]. Кроме того, DUX4 изменяет экспрессию генов, участвующих в сплайсинге и процессинге РНК, убиквитинлигаз и многих некодирующих РНК. Одной из мишеней DUX4 является ген *DEFB103*. Он является членом семейства малых пептидов дефензинов, ингибирует врожденный иммунный ответ, а также является антагонистом лиганда для рецептора CXCR4 (необходимого для миграции миобластов и дифференцировки мышечных клеток) [75]. При экзогенном введении *DEFB103* ингибирует дифференцировку клеток мышц и врожденный иммунный ответ в клетках скелетных мышц [76].

Кроме описанной выше мишени, у DUX4 есть еще ряд мишеней, имеющих патогенетическое значение, например, группа раково-тестикулярных антигенов, вызывающих иммунный ответ в мышцах, что тоже может быть причиной развития хронического воспаления в мышцах [76].

Методом иммунопреципитации хроматина было показано, что DBE-T, одна из некодирующих РНК, транскрибируемых с локуса D4Z4, входит в состав белкового комплекса Tritorax, который участвует в деконденсации хроматина [77]. Благодаря комплементарному взаимодействию между транскриптом DBE-T и участком повтора D4Z4, расположенным проксимальнее последовательности DUX4, белки комплекса Tritorax связываются с D4Z4 повторами. Примечательно, что DBE-T связы-

вается с D4Z4-проксимальным регионом только укороченного аллеля, регулируя депрессию генов локуса 4q35, в том числе и DUX4, что было показано на клетках, полученных от пациентов с МЛД [77]. Активация транскрипции с локуса 4q35 происходит посредством привлечения белка ASH1L комплекса Tritorax [77]. ASH1L является метилтрансферазой, участвующей в метилировании гистонов промоторов множества генов, приводя к активации их транскрипции [78, 91]. В клетках здоровых людей неукороченные массивы D4Z4 демонстрируют повышенное связывание с конденсирующим хроматин комплексом белков группы Polycomb и отсутствие транскрипции DBE-T. Вместе эти результаты свидетельствуют в пользу модели, согласно которой, присутствие укороченного массива D4Z4 способствует связыванию Tritorax белков и активации транскрипции гена *DUX4* у пациентов с МЛД1.

Терапия миодистрофии Ландузи—Дежерина

Для терапии МЛД, как и для большинства наследственных заболеваний, не существует этиотропного лечения. Однако к настоящему времени есть несколько медикаментозных стратегий для улучшения качества жизни пациентов и замедления прогрессии заболевания. Лечение кортикостероидами не дает положительных результатов, несмотря на значительную роль воспаления в патогенезе и клинических проявлениях [76].

В отличие от МДД, при МЛД происходит гиперэкспрессия патогенного белка, поэтому подходы к возможной этиотропной терапии этих заболеваний различаются.

Для доклинического тестирования препаратов разрабатываются модели МЛД. В настоящий момент описан ряд мышиных моделей с вставкой одного гена *DUX4* или нескольких D4Z4-повторов, также существует модель *Danio rerio* с трансгенной вставкой одной из мишеней DUX4 — гена *MHCK7* [76, 80]. В таких организмах стабильно экспрессируется DUX4, а проявления варьируют от полной дезорганизации мышечных волокон до типичных проявлений МЛД у человека [80].

В 2006 году была предпринята попытка симптоматического лечения метионином и фолиевой кислотой девяти больных и шести здоровых добровольцев. Предполагалось, что эти соединения способны изменить статус метилирования, что должно облегчать клинические проявления, однако ни изменений метилирования, ни значимых эффектов в клинической картине выявлено не было [81].

Для увеличения мышечной силы было предложено использование агонистов β_2 -адренорецепторов, поскольку они влияют на кровоток в мышечной ткани. Однако длительные исследования на крысах также не продемонстрировали значимых эффектов [82, 83].

Попытки использования антител против миостатина, контролирующего пролиферацию стволовых клеток и их дифференцировку, должны были потенциально повлиять

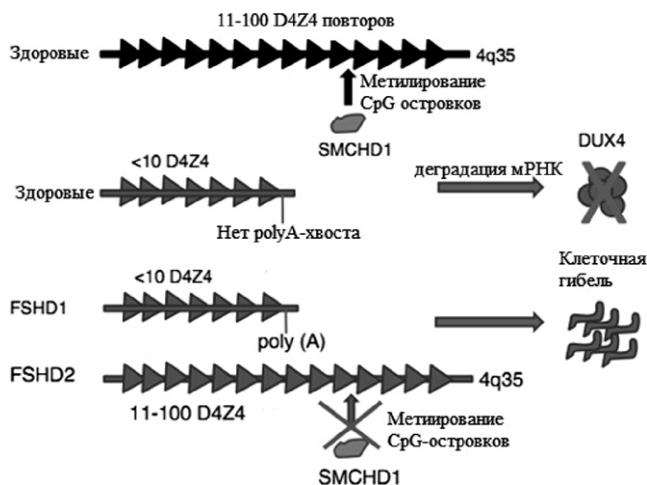


Рис. 7. Схема патогенеза лицеплечелопаточной дистрофии.

на регенерацию мышц и привести к замедлению прогрессии течения патологического процесса [84]. Однако длительное введение антител против миостатина пациентам, страдающим МЛД, не повлияло на мышечную силу, хотя и не вызывало токсических эффектов [85].

Клеточная терапия

Трансплантация стволовых клеток также может быть использована для лечения МЛД. МЛД характеризуется избирательным вовлечением мышц в патологический процесс, поэтому возможна аутологичная трансплантация клеток из незатронутых патологическим процессом мышц в пораженные. Для этого возможно использование мезангиобластов, показывающих высокую эффективность доставки в мышцы и большой процент дифференцировки в миоциты [86]. Кроме этого, можно провести слияние больных миоцитов со здоровыми для формирования нормальных фибрилл. Было показано, что в таких объединенных клетках меняется профиль экспрессии, приближаясь к профилю экспрессии нормальных клеток [87].

На сегодняшний день клеточные технологии являются весьма перспективным вариантом симптоматической терапии, позволяющим замедлить прогрессию развития дистрофии при МЛД, однако, причина заболевания при этом все-таки не устраняется, и это требует постоянного пожизненного лечения.

Генная терапия

При развитии МЛД ключевым событием является эктопическая избыточная экспрессия одной из изоформ DUX4, что принципиально отличает ее от МДД. Поэтому главная задача этиотропной терапии в случае МЛД — снизить избыточную экспрессию гена.

Для подавления транскрипции может быть использован механизм РНК-интерференции. В 2012 г. Уоллейс с соавторами разработали малую интерферирующую РНК, которая достоверно уменьшала экспрессию DUX4 *in vitro* на клеточных культурах и *in vivo* на мышцах [88]. В качестве системы доставки использовался адено-ассоциированный вирусный вектор. Однако, его введение сопровождалось развитием иммунного ответа, что ограничивает применение такого препарата.

Помимо РНК-интерференции для подавления экспрессии транскрипта можно также использовать технологию пропускания экзона. Был показан эффективный нокдаун гена *DUX4* при применении олигонуклеотидов с 2'-О-метилфосфоротиоатным остовом. Более эффективно подавлялись экспрессию олигонуклеотиды, мишенью которых являлось соединение интрона 2 и экзона 3 [76].

Эти методики способны уменьшить клинические проявления и прогрессию заболевания, но поскольку время жизни таких молекул ограничено, требуется постоянное, пожизненное введение таких препаратов.

Современные методы редактирования генома, такие, как система CRISPR/Cas9, позволяют решить проблему постоянного введения в клетки генетического материала. В настоящее время опубликован ряд работ, посвященных подавлению экспрессии DUX4 в клетках с помощью конструкции dCas9 KRAB, состоящей из каталитически неактивной формы нуклеазы dCas9, слитой в рамке считывания с KRAB-доменом, осуществляющей функцию транскрипционного репрессора [89, 90]. Использование такой системы позволило эффективно снизить экспрессию как DUX4, так и его мишеней в клеточных культурах.

Еще одной стратегией для лечения МЛД с помощью CRISPR/Cas9 — это оверэкспрессия белков, отвечающих за метилирование гистонов, например SMCHD1 [90]. Увеличение метилирования локуса D4Z4 позволило снизить экспрессию DUX4, но использование этой стратегии сопряжено с рядом побочных эффектов, поскольку гистон-метилтрансферазы имеют множество мишеней по всему геному. Данная стратегия также неприменима в случае комбинации МЛД 1 и МЛД 2, то есть при наличии мутации в гене *SMCHD1* на фоне укорочения повторов в локусе 4q35.

Как уже упоминалось выше, внедрение в клиническую практику системы редактирования генома в настоящее время невозможно в связи со сложностями доставки и недостаточной эффективностью и точностью работы системы.

Помимо подавления самого DUX4 можно снизить клинические проявления, подавляя экспрессию мишеней транскрипционного фактора. В частности, олигонуклеотиды, модифицированные фосфородиамидат-морфолиновыми олигомерами, использовались Ченом для подавления экспрессии белка Pitx1 — одной из первых открытых прямых мишеней DUX4, оверэкспрессированных при МЛД [91]. Такое воздействие приводило к уменьшению числа атрофированных волокон в биоптатах пораженных мышц и увеличению мышечной силы [91]. Но стоит упомянуть, что Pitx1 — не единственная мишень транскрипционного фактора DUX4, поэтому более правильным для устранения всех проявлений патологии являются манипуляции с DUX4.

Не так давно было показано, что значительная роль в развитии МЛД принадлежит длинной некодирующей РНК (lncRNA) DBE-T [92]. Она является также потенциальной мишенью для терапевтического лечения. Подавление экспрессии DBE-T приводит к репрессии DUX4, что нивелирует клинические проявления. Таким образом, эта мишень может быть очень значимой для терапии МЛД1.

Патогенез МЛД1 более сложен, чем патогенез МДД, что значительно усложняет поиск мишеней для терапии. На рис. 8 представлено современное представление о молекулярном механизме развития патологии и отмечены возможные терапевтические мишени.

Таким образом, несмотря на перспективность современных подходов к терапии наследственных заболеваний, их разработка и одобрение компетентными органами находятся лишь в начальной стадии. Широкое применение находит лишь симптоматическая терапия, не всегда эффективная. С одной стороны, это связано с рядом технологических ограничений: до сих пор не разработано эффективной и универсальной системы доставки генотерапевтических препаратов. С другой стороны, далеко не все системы могут быть использованы для доставки полноразмерных генотерапевтических конструкторов, как это происходит, например, с препаратами для лечения МДД. Более того, зачастую невозможно применять универсальные подходы для терапии одного и того же заболевания, вызываемого различными типами мутаций, что приводит к резкому сужению целевой группы пациентов. Наконец, несмотря на перспективность разрабатываемых подходов и успех в доклинических испытаниях, не все из них показывают высокую эффективность в клинических исследованиях.

Список литературы

1. Emery, A.E., The muscular dystrophies. *Lancet*, 2002. 359(9307): p. 687-95.
2. Chung, J. et al. Twenty-year follow-up of newborn screening for patients with muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 2016. 53(4): p. 570-8.
3. E. M., On fatty degeneration of the voluntary muscles: report of the Royal Medical and Chirurgical Society. 1851. 2: p. 588-89.
4. E., M., On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. *Medico-Chirurgical Trans*, 1852. 35: p. 73-84.
5. Emery AEH, E.M., The history of a genetic disease: Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. London: Royal Society of Medicine Press, 1995.
6. GBA., D., Case 68: Paraplegie cerebrale, congenitale, hypertrophique. L'Electrisation localisee et de son application a la pathologie et a la therapeutique, 2nd edn. Paris: J-B Bailliere et Fils, 1861: p. 354-56.
7. GBA., D., Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique. *Archives Generales Medecine* 1868. 11: p. 5-25, 179-209, 305-21, 421-43, 552-88.
8. Muntoni, F.T., S.; Ferlini, A., Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.*, 2003. 2: p. 731-740.
9. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 1987. 51(6): p. 919-28.
10. Cirak, S. et al. 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): p. 595-605.
11. Ogura, Y. et al. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. *Front Cell Dev Biol*, 2014. 2: p. 11.
12. Kim, T.W., K. Wu, and I.B. Black, Deficiency of brain synaptic dystrophin in human Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 1995. 38(3): p. 446-9.
13. Guiraud, S. et al. Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol*, 2015. 100(12): p. 1458-67.

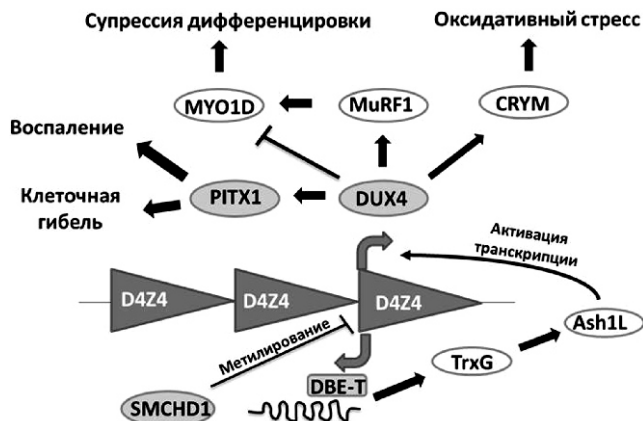


Рис. 8. Патогенез МДД, возможные терапевтические мишени представлены на сером фоне.

14. Ferlini, A., M. Neri, and F. Gualandi, The medical genetics of dystrophinopathies: molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice. *Neuromuscul Disord*, 2013. 23(1): p. 4-14.
15. Falzarano, M.S. et al. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules*, 2015. 20(10): p. 18168-84.
16. Falzarano, M.S., C. Passarelli, and A. Ferlini, Nanoparticle delivery of antisense oligonucleotides and their application in the exon skipping strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Nucleic Acid Ther*, 2014. 24(1): p. 87-100.
17. van Westering, T.L., C.A. Betts, and M.J. Wood, Current understanding of molecular pathology and treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy. *Molecules*, 2015. 20(5): p. 8823-55.
18. Drachman, D.B., K.V. Toyka, and E. Myer, Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*, 1974. 2(7894): p. 1409-12.
19. Goemans, N. and G. Buyse, Current treatment and management of dystrophinopathies. *Curr Treat Options Neurol*, 2014. 16(5): p. 287.
20. Griggs, R.C. et al. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: major variations in practice. *Muscle Nerve*, 2013. 48(1): p. 27-31.
21. Nayak, S. and B. Acharjya, Deflazacort versus other glucocorticoids: a comparison. *Indian J Dermatol*, 2008. 53(4): p. 167-70.
22. Bonifati, D.M.R., G.; Bonometto, P.; Berardinelli, A.; Gorni, K.; Orcesi, S.; Lanzi, G.; Angelini, C., A multicenter double-blind randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 2000. 23: p. 1344-1347.
23. Escolar, D.M. et al. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 2011. 77(5): p. 444-52.
24. Griggs, R.C. et al. Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). *Neurology*, 1993. 43(3 Pt 1): p. 520-7.
25. Mendell, J.R. et al. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 1989. 320(24): p. 1592-7.
26. Mesa, L.E.D., A.L.; Corderi, J.; Marco, P.; Flores, D., Steroids in Duchenne muscular dystrophy-deflazacort trial. *Neuromuscul. Disord.*, 1991. 1: p. 261-266.
27. Balaban, B. et al. Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect. *Am J Phys Med Rehabil*, 2005. 84(11): p. 843-50.

28. Biggar, W.D.H., V.A.; Eliasoph, L.; Alman, B., Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul. Disord.*, 2006. 16: p. 249-255.
29. King, W.M. et al. Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 2007. 68(19): p. 1607-13.
30. Merlini, L. et al. Early corticosteroid treatment in 4 Duchenne muscular dystrophy patients: 14-year follow-up. *Muscle Nerve*, 2012. 45(6): p. 796-802.
31. Heier, C.R.D., J.M.; Yu, Q.; Dillingham, B.C.; Huynh, T.; van der Meulen, J.H.; Sali, A.; Miller, B.K.; Phadke, A.; Scheffer, L.; et al., VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol. Med.*, 2013. 5: p. 1569-1585.
32. Seto, J.T., N.E. Bengtsson, and J.S. Chamberlain, Therapy of Genetic Disorders—Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Pediatr Rep*, 2014. 2(2): p. 102-112.
33. Guiraud, S. et al. The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015. 16: p. 281-308.
34. Noviello, M.T., F.S.; Bondanza, A.; Tonlorenzi, R.; Rosaria Carbone, M.; Gerli, M.F.; Marktel, S.; Napolitano, S.; Cicalese, M.P.; Ciceri, F., Inflammation converts human mesoangioblasts into targets of alloreactive immune responses: Implications for allogeneic cell therapy of DMD. *Mol. Ther.*, 2014. 22: p. 1342-1352.
35. Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
36. Hashimoto A, N.A., Lee JK, Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Induction to Cardiomyocytes. *Int Heart J.*, 2016. 57(1): p. 112-7.
37. Li HL, F.N.e.a., 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): p. 143-54.
38. Niu, X. et al. Combining single-strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in Beta-thalassemia-induced Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem*, 2016.
39. Song, M.J. and K. Bharti, Looking into the future: Using induced pluripotent stem cells to build two and three dimensional ocular tissue for cell therapy and disease modeling. *Brain Res*, 2016. 1638(Pt A): p. 2-14.
40. K. V. Glebova, A.V.M., A. V. Baranova, M. Yu. Skoblov, Nonviral delivery systems for small interfering RNAs. *Molecular Biology*, 2012. 46(3): p. 349-361.
41. Mendell, J.R. et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 2010. 363(15): p. 1429-37.
42. Mendell, J.R. et al. Gene therapy for muscular dystrophy: lessons learned and path forward. *Neurosci Lett*, 2012. 527(2): p. 90-9.
43. Nakamura, A., X-Linked Dilated Cardiomyopathy: A Cardiospecific Phenotype of Dystrophinopathy. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2015. 8(2): p. 303-20.
44. Tinsley, J., N. Robinson, and K.E. Davies, Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multiple-dose administration to healthy male adult volunteers. *J Clin Pharmacol*, 2015. 55(6): p. 698-707.
45. Ricotti, V. et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-Arylbenzoxazole Utrophin Modulator, following Single- and Multiple-Dose Administration to Pediatric Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One*, 2016. 11(4): p. e0152840.
46. Nelson, C.E. et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016. 351(6271): p. 403-7.
47. Long, C. et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016. 351(6271): p. 400-3.
48. Jarmin, S. et al. New developments in the use of gene therapy to treat Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther*, 2014. 14(2): p. 209-30.
49. Bushby, K. et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve*, 2014. 50(4): p. 477-87.
50. Haas, M. et al. European Medicines Agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord*, 2015. 25(1): p. 5-13.
51. Goyenvall, A. et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 2004. 306(5702): p. 1796-9.
52. M.Yu.Skoblov, M.Yu.Skoblov. *Molecular Biology*, 2009. 43(6): p. 1-15.
53. Goemans, N.M. et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 2011. 364(16): p. 1513-22.
54. Heemskerk, H.A. et al. In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J Gene Med*, 2009. 11(3): p. 257-66.
55. Lu, Q.L. et al. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(1): p. 198-203.
56. van Deutekom, J.C. et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*, 2007. 357(26): p. 2677-86.
57. Yokota, T. et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol*, 2009. 65(6): p. 667-76.
58. Mendell, J.R. et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 2013. 74(5): p. 637-47.
59. Goyenvall, A. et al. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat Med*, 2015. 21(3): p. 270-5.
60. Kinali, M. et al. 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): p. 918-28.
61. Lu, Q.L., S. Cirak, and T. Partridge, What Can We Learn From Clinical Trials of Exon Skipping for DMD? *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014. 3: p. e152.
62. Veneeta Tandon, S.Y., Ashutosh Rao. FDA Efficacy Review. Available from: <http://www.fda.gov/>.
63. Sheridan, C., Duchenne muscular dystrophy drugs at the crossroads, as newer agents advance. *Nat Biotechnol*, 2016. 34(7): p. 675-6.
64. Flanigan, K.M. et al. Genetic characterization of a large, historically significant Utah kindred with facioscapulohumeral dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 2001. 11(6-7): p. 525-9.
65. Mostacciolo, M.L. et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: epidemiological and molecular study in a north-east Italian population sample. *Clin Genet*, 2009. 75(6): p. 550-5.
66. Norwood, F.L. et al. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain*, 2009. 132(Pt 11): p. 3175-86.

67. Padberg, G.W. et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in the Dutch population. *Muscle Nerve Suppl*, 1995(2): p. S81-4.
68. Sacconi, S., L. Salviati, and C. Desnuelle, Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1852(4): p. 607-14.
69. Tawil, R. and S.M. Van Der Maarel, Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 2006. 34(1): p. 1-15.
70. M. Upadhyaya, D.N.C., G. Padberg, Facioscapulohumeral muscular dystrophy: a clinician's experience, in: *Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Clinical Medicine and Molecular Cell Biology*. 2004: Garland Science/BIOS Scientific Publishers, Oxon, United Kingdom.
71. Wijmenga, C. et al. Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization. *Genomics*, 1991. 9(4): p. 570-5.
72. Deidda, G. et al. Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *J Med Genet*, 1996. 33(5): p. 361-5.
73. de Greef, J.C. et al. Hypomethylation is restricted to the D4Z4 repeat array in phenotypic FSHD. *Neurology*, 2007. 69(10): p. 1018-26.
74. Kowaljow, V. et al. The DUX4 gene at the MJD4 locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*, 2007. 17(8): p. 611-23.
75. Griffin, C.A. et al. Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 18): p. 3052-60.
76. Tawil, R., S.M. van der Maarel, and S.J. Tapscott, Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skelet Muscle*, 2014. 4: p. 12.
77. Cabianca, D.S. et al. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell*, 2012. 149(4): p. 819-31.
78. Gregory, G.D. et al. Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(24): p. 8466-79.
79. Tanaka, Y. et al. Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene*, 2007. 397(1-2): p. 161-8.
80. Angela Lek, F.R., Peter L. Jones, Louis M. Kunkel, Emerging preclinical animal models for FSHD. *Trends in Molecular Medicine*, 2015. 21(5): p. 295-306.
81. van der Kooi, E.L. et al. No effect of folic acid and methionine supplementation on D4Z4 methylation in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 2006. 16(11): p. 766-9.
82. Benson, D.W. et al. Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol. *J Surg Res*, 1991. 50(1): p. 1-5.
83. Maltin, C.A. et al. Tissue specific responses to clenbuterol; temporal changes in protein metabolism of striated muscle and visceral tissues from rats. *Growth Regul*, 1992. 2(4): p. 161-6.
84. Patel, K. and H. Amthor, The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*, 2005. 15(2): p. 117-26.
85. Wagner, K.R. et al. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 2008. 63(5): p. 561-71.
86. Vilquin, J.T. et al. Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther*, 2005. 12(22): p. 1651-62.
87. Dib, C. et al. Correction of the FSHD myoblast differentiation defect by fusion with healthy myoblasts. *J Cell Physiol*, 2016. 231(1): p. 62-71.
88. Wallace, L.M. et al. RNA interference improves myopathic phenotypes in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1). *Mol Ther*, 2011. 19(11): p. 2048-54.
89. Himeda, C.L., T.I. Jones, and P.L. Jones, CRISPR/dCas9-mediated Transcriptional Inhibition Ameliorates the Epigenetic Dysregulation at D4Z4 and Represses DUX4-fl in FSH Muscular Dystrophy. *Mol Ther*, 2016. 24(3): p. 527-35.
90. McCullers, M.R., CRISPR-Cas9 Utilit in Genome Engineering. *The Owl*, 2016. 6(1): p. 62-79.
91. Pandey, S.N. et al. Morpholino treatment improves muscle function and pathology of Pitx1 transgenic mice. *Mol Ther*, 2014. 22(2): p. 390-6.
92. Vizoso, M. and M. Esteller, The activatory long non-coding RNA DBE-T reveals the epigenetic etiology of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cell Res*, 2012. 22(10): p. 1413-5.

Current approaches for treatment of muscular dystrophies

Vyakhireva J.V.¹, Zernov N.V.¹, Marakhonov A.V.^{1,2}, Guskova A.A.¹, Skoblov M.Yu.^{1,2,3}

¹ — Research Center for Medical Genetics, Moscow 115478, e-mail: mskoblov@generesearch.ru

² — Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi 141700, Moscow region

³ — Evdokimov Moscow Medical Stomatological University, Moscow 127473

Muscular dystrophies are the group of hereditary neuromuscular disorders characterized by progressive muscular weakness and degeneration of muscles. The most common of them are Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Landouzy-Dejerine facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). To date, the pathogenesis of these diseases is well studied that allow to develop various therapeutic approaches for the treatment. Several drugs for the Duchenne muscular dystrophy get through all stages of clinical trials approved by FDA (food drug administration) and are utilized for treatment. Pathogenesis of FSHD differs substantially from DMD, and therapeutic approaches are only under development. Molecular and cellular technologies as well as the understanding of the disease pathogenesis allow to hope for a quick success in this area.

Key words: Duchenne muscular dystrophy, Landouzy-Dejerine facioscapulohumeral muscular dystrophy, pathogenesis of the disease, therapy of monogenic diseases