

## Терапия генетических заболеваний: актуальные направления разработки биомедицинских клеточных продуктов

О. А. Рачинская<sup>1,\*</sup>, М. А. Водякова<sup>1</sup>, Е. В. Мельникова<sup>1</sup>, В. А. Меркулов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Генетические заболевания в большинстве случаев носят прогрессирующий характер и без соответствующего лечения приводят к смерти или инвалидизации человека. Актуальными проблемами мирового здравоохранения являются как трудность диагностики, так и отсутствие эффективного лечения для многих генетических заболеваний. Медицинская помощь пациентам с генетическими заболеваниями часто сводится к симптоматическому и паллиативному лечению. Начиная с 2000-х годов перспективным направлением для терапии таких заболеваний являются препараты на основе жизнеспособных клеток человека (в соответствии с законодательством Российской Федерации — биомедицинские клеточные продукты) и генотерапевтические препараты. Цель работы — обзор актуальных направлений разработки биомедицинских клеточных продуктов для лечения генетических заболеваний. В работе рассмотрены препараты на основе клеток для лечения таких моногенных генетических заболеваний, как тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз (RDEB), β-гемоглобинопатии, дефицит альфа-1-антитрипсина, гемофилия А и мышечная дистрофия Дюшенна. Разработка подобных препаратов осуществляется во многих странах и находится на разных стадиях: до-клинические и разные фазы клинических исследований. Для одного заболевания могут разрабатываться препараты, содержащие разные типы жизнеспособных клеток: дифференцированных, стволовых и фибробластов, индуцированных плюрипотентных, а также *ex vivo* генетически модифицированных. Приоритетными задачами разработки таких препаратов являются отказ от проведения заместительной терапии или паллиативного лечения, а также существенное увеличение продолжительности и качества жизни пациентов.

**Ключевые слова:** биомедицинские клеточные продукты; генетические заболевания; орфанные заболевания; генотерапевтические препараты; стволовые клетки; индуцированные плюрипотентные клетки

**Для цитирования:** Рачинская ОА, Водякова МА, Мельникова ЕВ, Меркулов ВА. Терапия генетических заболеваний: актуальные направления разработки биомедицинских клеточных продуктов. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):225–232. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-225-232>

**Контактное лицо:** Рачинская Ольга Анатольевна; [Rachinskaya@expmed.ru](mailto:Rachinskaya@expmed.ru)

## Treatment of Genetic Diseases: Current Trends in the Development of Biomedical Cell Products

O. A. Rachinskaya<sup>1,\*</sup>, M. A. Vodyakova<sup>1</sup>, E. V. Melnikova<sup>1</sup>, V. A. Merkulov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

<sup>2</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,  
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Genetic diseases are often progressive in nature, and without proper treatment may result in disability or death. Difficulties with diagnosis of genetic diseases and lack of effective treatment are global public health challenges. Medical care for patients with genetic diseases is often confined to symptomatic and palliative care. Starting from the 2000s, great hopes have been placed on cell-based medicinal products (which are referred to as biomedical cell products in the Russian legislation) and gene therapy products. The aim of the study was to review current trends in the development of biomedical cell products for the treatment of genetic diseases. The paper focuses on cell-based products for the treatment of monogenic genetic diseases, such as severe combined immunodeficiency (SCID), recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB), beta-haemoglobinopathies, alpha-1-antitrypsin deficiency, haemophilia A, and Duchenne muscular dystrophy. Such drugs are being developed in many countries and are now entering preclinical and different stages of clinical trials. Products based on various types of viable

cells, including differentiated cells, stem cells, induced pluripotent cells, as well as cells genetically modified *ex vivo*, may be developed for the treatment of one and the same disease. The main priority is the creation of such products that will obviate the need for replacement therapy or palliative care, and that will significantly increase life expectancy and quality of life.

**Key words:** biomedical cell products; genetic diseases; orphan diseases; gene therapy products; stem cells; induced pluripotent cells

**For citation:** Rachinskaya OA, Vodyakova MA, Melnikova EV, Merkulov VA. Treatment of genetic diseases: current trends in the development of biomedical cell products. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):225–232. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-225-232>

**Corresponding author:** Olga A. Rachinskaya; [Rachinskaya@expmed.ru](mailto:Rachinskaya@expmed.ru)

На протяжении долгого эволюционного пути человечеством было приобретено около 6000–7000 редких заболеваний и расстройств. Международные определения редких (орфанных) (англ. rare disease, orphan disease) заболеваний различны. Например, в Соединенных Штатах заболевание считается «редким», если оно встречается менее чем у 200 тысяч человек<sup>1</sup>, а в Европе — если уровень заболеваемости не превышает 10 случаев на 20 тысяч человек<sup>2</sup>. В соответствии с российским законодательством к таким патологиям относятся заболевания, которые имеют распространенность не более 10 случаев на 100 тысяч населения<sup>3</sup>. В список орфанных болезней в России Минздравом России на 11 ноября 2019 года внесено 256 заболеваний<sup>4</sup>. Российский регистр людей с орфанными заболеваниями включает менее 30 тысяч человек, но, по оценкам экспертов, реальное число пациентов достигает 1,5 млн<sup>5</sup>.

Большинство редких заболеваний (до 80%) вызваны генетическими нарушениями, многие из которых являются наследственными и сопровождают человека на протяжении всей жизни, даже в случае позднего проявления симптомов. Если нарушения (замена нуклеотидов, небольшие дупликации, делеции, инверсии) затрагивают один ген, то речь идет о моногенных заболеваниях, которые, как правило, проявляются в уменьшении продуцирования клетками какого-либо белка или в снижении его активности. В настоящее время идентифицировано более 1000 генов, мутации в которых приводят к развитию заболеваний [1]. Если нарушения затрагивают большие районы или даже целые хромосомы (крупные структурные перестройки, изменение числа хромосом), то говорят о хромосомных болезнях. Такие патологии, как правило, характеризуются множественными клиническими проявлениями<sup>6</sup>.

На сегодняшний день из всего огромного числа генетических заболеваний методы лечения/лекарственные препараты существуют примерно для 300. Чаще всего медицинская помощь сводится к симптоматическому и паллиативному лечению. При этом диагностика с использованием молекулярно-генетических методов анализа и лечение таких заболеваний являются в основном дорогостоящими, и в постоянной терапии пациенты часто нуждаются на протяжении всей жизни. Кроме того, необходимо обратить внимание на то, что для лечения некоторых генетических заболеваний прибегают к пересадке костного мозга, что не всегда осуществимо вследствие отсутствия подходящего донора и большого числа возможных побочных явлений. Поэтому в последние пару десятилетий ак-

тивно ведутся разработки, проводятся доклинические (ДКИ) и клинические исследования (КИ) препаратов на основе клеточной и генной терапии, прежде всего, для лечения моногенных заболеваний. Разрабатываемые в настоящее время генотерапевтические препараты позволяют осуществлять точное воздействие на определенный ген благодаря появлению новых технологий коррекции генома и других биотехнологических подходов [2]. Большинство современных разработок в области терапии генетических заболеваний приходится на генотерапевтические препараты, с помощью которых осуществляют коррекцию генома *in vivo*.

Однако сходные механизмы генетических модификаций, основанные на применении векторных конструкций и систем редактирования генома, позволяют осуществить удаление гена с мутацией или внесение копии корректного гена в геном предварительно выделенных из организма донора клеток (генная терапия *ex vivo*). При этом зачастую различные векторные конструкции используют для трансдукции стволовых клеток (СК), например гемопоэтических стволовых клеток, для лечения различных орфанных заболеваний крови и обмена веществ. Препараты генной терапии *ex vivo* в соответствии с национальным законодательством отнесены к биомедицинским клеточным продуктам (БМКП)<sup>7</sup>. Область БМКП является новой для фармацевтического рынка Российской Федерации, в настоящее время ни один БМКП не зарегистрирован в нашей стране. Основываясь на опыте регуляторной практики применения подобных препаратов в мире, необходимо отметить, что они используются главным образом для терапии генетических заболеваний, для которых отсутствуют доступные методы/препараты лечения, направленные на устранение причины заболевания, а также для лечения онкологических заболеваний и жизнеугрожающих состояний. Учитывая сложность состава БМКП — наличие жизнеспособных клеток человека со своим набором генов и секретируемых факторов, существуют определенные риски применения БМКП в медицинской практике (главным образом проявление туморогенного и онкогенного потенциала) [3]. Поэтому разработка, проведение ДКИ и КИ БМКП представляют собой процесс значительно более сложный, трудоемкий, долгосрочный и дорогостоящий по сравнению с традиционными лекарственными препаратами. Что касается генетических заболеваний, дополнительными сдерживающими факторами для разработки БМКП в Российской Федерации являются незначительное количество пациентов и необходимость продолжительных КИ. В настоящее время

<sup>1</sup> Orphan Drug Act of 1983. US Food and Drug Administration. 4 January 1983. Retrieved 27 October 2015.

<sup>2</sup> [www.orpha.net](http://www.orpha.net)

<sup>3</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

<sup>4</sup> Перечень редких (орфанных) заболеваний. Минздрав России. <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8048-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy>

<sup>5</sup> Попович ЛД. Нельзя подходить к космосу с линейкой. Редкие болезни в России. 2019;14:14–26.

<sup>6</sup> Гинтер ЕК. Медицинская генетика. М.: Медицина; 2003.

<sup>7</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

в мире зарегистрировано два препарата на основе генетически модифицированных клеток человека для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с недостатком гена аденозиндезаминазы (Strimvelis, GSK)<sup>8</sup>, и для лечения β-талассемии (Zynteglo, bluebird bio)<sup>9</sup>.

Цель работы — обзор актуальных направлений разработки препаратов на основе жизнеспособных клеток человека (биомедицинских клеточных продуктов) для лечения генетических заболеваний. В рамках поставленной цели были рассмотрены возможные способы терапии некоторых генетических заболеваний с помощью разных типов клеток, в том числе генетически модифицированных, а также приведены результаты исследований эффективности применяемых клеточных препаратов.

### Клеточная терапия тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID)

Первый генотерапевтический препарат *ex vivo* был применен для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита (severe combined immunodeficiency, SCID), вызванного недостаточностью фермента аденозиндезаминазы (adenosine deaminase, ADA) [4, 5]. К развитию заболевания приводят мутации в гене, кодирующем фермент ADA, что проявляется в снижении иммунитета и появлении осложнений, связанных с нарушением обмена веществ. До появления генотерапевтических препаратов единственным способом лечения SCID с дефицитом ADA, приводящим к полному выздоровлению, была аллогенная трансплантация костного мозга (КМ) от родственников реципиента с идентичным главным комплексом гистосовместимости (Human Leukocyte Antigens, HLA). В случае отсутствия подходящих доноров пациентам осуществляли заместительную терапию бычьей аденозиндезаминазой, конъюгированной с полиэтиленгликолем, которая не могла привести к долговременному восстановлению иммунитета [6].

Генотерапевтический препарат *ex vivo* для лечения SCID основан на применении системы переноса гена фермента ADA с помощью ретровирусного вектора в лимфоциты периферической крови [7]. При этом было показано, что, несмотря на заметные улучшения состояния больных (восстановление иммунитета, исчезновение симптомов сопутствующих заболеваний, отказ от заместительной терапии), уровень фермента ADA у них в крови был недостаточным для полного исчезновения токсичных метаболитов, образующихся в результате нарушения обмена веществ [8]. Поэтому перенос гена фермента стали осуществлять в плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки, что позволило существенно увеличить число клеток с корректированным геномом, способных к пролиферации и передаче генетической конструкции в дочерние клетки. Последующее совершенствование процедуры генной терапии, например применение цитокинов, использование ретронектина для увеличения проникающей способности вектора в клетку, привело к долгосрочной ремиссии заболевания и прекращению какого-либо лечения у пациентов [9].

В 2016 году Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) было выдано разрешение на коммерческое использование генотерапевтического препарата Strimvelis (Orchard Therapeutics (Netherlands)

BV) пациентам, для которых отсутствует подходящий HLA-идентичный донор. Препарат представляет собой фракцию клеток, содержащую аутологичные CD34<sup>+</sup> клетки, трансдуцированные ретровирусным вектором GSK3336223, несущим последовательность кДНК ADA человека, полученную из гемопоэтических CD34<sup>+</sup> стволовых клеток здоровых доноров. Strimvelis относится к группе препаратов — иммуностимуляторов. Клетки препарата трансплантируются в КМ пациента, где они восстанавливают гемопоэтическую систему, экспрессируя активный фермент ADA. После успешного приживления клеток у пациентов возможен пожизненный терапевтический эффект<sup>10</sup>.

В результате трехлетнего открытого клинического исследования в общей сложности 18 пациентов разных рас в возрасте до 6 лет (12 пациентов в основном исследовании), для которых не было возможности подобрать донора и у которых не было адекватного ответа на заместительную терапию бычьей ADA, прошли лечение с помощью Strimvelis. Терапия привела к 100% выживанию пациентов через 7 лет, снижению тяжести сопутствующих инфекционных заболеваний, увеличению числа Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>) и снижению содержания дезоксиаденозина в венозных эритроцитах ниже патологического уровня. После лечения Strimvelis 7 человек (58%) не нуждались в терапии иммуноглобулинами в течение трех лет<sup>11</sup>.

### Клеточная терапия рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза (RDEB)

Ярким примером заболевания, для лечения которого признаются перспективы клеточной терапии в целом и генотерапии *ex vivo* в частности является рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз (recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) — тяжелое наследственное кожное заболевание, вызванное рецессивными мутациями в гене Col7a1, кодирующем коллаген VII типа (C7), который имеет большое значение для формирования устойчивого контакта между слоями дермы и эпидермиса. Нарушение контакта приводит к появлению пузырей и эрозий на коже и слизистых оболочках. Кроме того, дефект коллагена VII типа ассоциирован с хронической анемией и остеопатией, а также с повышением вероятности развития тяжелых осложнений, в том числе плоскоклеточного рака кожи. На сегодняшний день медицинская помощь для пациентов с RDEB сводится в основном к паллиативному лечению, направленному на облегчение симптомов заболевания и защиту от инфекций, попадающих через дефекты кожи. При образовании контрактур проводится оперативное лечение [10].

Тем не менее разработаны способы лечения, основанные на аутологичной и аллогенной трансплантации клеток кожи, зачастую прошедших стадию культивирования. Так, способность заживления кожных ран при RDEB была показана для аллогенных фибробластов, синтезирующих коллаген VII типа, при этом обладающих низкой иммуногенностью и полностью элиминирующихся из организма реципиента в течение двух недель [11]. Более высокая эффективность препарата отмечалась у пациентов с RDEB, у которых сохранялся некоторый базовый уровень экспрессии белка C7 [12].

<sup>8</sup> Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information_en.pdf)

<sup>9</sup> Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information_en.pdf)

<sup>10</sup> Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information_en.pdf)

<sup>11</sup> Там же.

Для лечения трудноизлечимых язвенных поражений кожи у пациентов с RDEB также применяли Apligraf (Organogenesis, Canton, MA, USA), который представляет собой дермальный эквивалент из кератиноцитов и фибробластов на бычьем коллагене. Первоначально препарат использовался для лечения диабетических язв, впоследствии был многократно применен для лечения разных подтипов буллезного эпидермолиза [13]. Например, одним из первых описан случай лечения новорожденной девочки с генерализованным подтипом RDEB с эрозиями, затрагивающими 80 % кожных покровов. Кожный эквивалент помещался на участки кожи ног, ягодиц и рук с наибольшим числом булл и эрозий. Значительные улучшения состояния кожных покровов в местах трансплантации наблюдались уже через 3 суток. Повторного образования булл и эрозий кожи в местах трансплантации не отмечалось на протяжении периода наблюдения (6 недель). У девочки также не обнаруживались признаки развития инфекции и сепсиса [14].

Для лечения буллезного эпидермолиза также имеется опыт применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК обладают способностью мигрировать в поврежденные участки ткани и стимулировать регенерацию, выделяя различные факторы роста и цитокины, при последующей полной элиминации клеток из организма [15]. Эффективность от введения МСК при RDEB была впервые зарегистрирована у 13-летнего и 25-летнего пациентов из Чили в 2010 году. Оба пациента имели клинически выраженное образование булл на фоне полного отсутствия экспрессии белка C7. Используемые для лечения МСК были аллогенными, полученными из КМ донора, и подкожно вводились как в интактные, так и в поврежденные участки кожи, что приводило к сокращению раневых поверхностей через 12 недель. Новообразованный коллаген обнаруживался между эпидермисом и дермой, что свидетельствовало о возможности экспрессии белка C7 *de novo*. Однако терапевтический эффект сохранялся лишь в течение 4 месяцев, после чего свойства кожных покровов становились исходными [16].

Еще один тип клеточной терапии, разрабатываемый для лечения RDEB, — лечение ревертантными кератиноцитами. У пациентов с наследственными заболеваниями кожи иногда спонтанно появляются участки с нормальной кожей, где преобладают ревертантные клетки — клетки, геном которых вторично потерял мутацию, приводящую к заболеванию. Это явление получило название «ревертантный мозаицизм» или «естественная генная терапия» [17]. Накопление кератиноцитов, выделенных из участка кожи с ревертантными клетками, позволяет осуществлять персонализированную и специфичную для пациентов форму терапии. В культуре клеток или в сформированных эпидермальных лоскутах содержится 30 % ревертантных кератиноцитов, однако после трансплантации в участки с поврежденной кожей остается только 3 % таких клеток. Несмотря на это, трансплантация ревертантных кератиноцитов осуществлялась, при этом было продемонстрировано устойчивое улучшение состояния кожи пациентов: заживление кожи в участках трансплантации. Однако отмечалось повторное образование булл [18].

В настоящее время ведутся разработки препаратов с использованием клеток с индуцированной плюрипотентностью (induced pluripotent stem cells, iPSCs), полученных из ревертантных кератиноцитов, которые в дальнейшем могут быть дифференцированы в любые необходимые типы клеток, включая кератиноциты [19, 20].

Существуют попытки терапии различных типов буллезного эпидермолиза генетически модифицированными *ex vivo* клетками, которые могут быть трансплантированы пациенту в форме кожных эквивалентов, а также с помощью внутривенных инъекций. При этом трансдуцированные эпидермальные стволовые клетки и фибробласты демонстрируют свой потенциал к делению и пролиферации, обеспечивая возможность долгосрочной экспрессии белков, необходимых для формирования нормальной структуры дермы и эпидермиса<sup>12</sup>.

Первое КИ такого препарата было проведено для генетически модифицированных *ex vivo* эпидермальных СК, трансдуцированных вектором на основе ретровируса, содержащим ген LAMB3, ответственный за экспрессию гликопротеина ламинина-332. Наблюдения на протяжении восьми лет показали устойчивый синтез белка ламинина-332 и отсутствие в участках трансплантации булл, воспаления и опухолей [21].

Приживление кожных эквивалентов, содержащих клетки, трансдуцированные вектором на основе гамма-ретровируса, несущим полноразмерный ген Col7a1, через 3 месяца приводило к увеличению экспрессии белка C7 в 90 % трансплантированных участков, через 6 месяцев — в 66 %, через 12 месяцев — в 42 %. Отмечалось уменьшение кожных повреждений в течение года [22].

С целью снижения рисков инсерционного мутагенеза вирусные векторные конструкции подвергались модификации — появилось новое поколение самоинактивирующихся (SIN) вирусных векторов, не способных активировать гены трансдуцированных клеток. Использование такой векторной конструкции привело к трансдукции 95 % клеток и позволило получить стойкий синтез белка C7 в течение 5 месяцев *in vitro* [23].

В настоящее время разработан препарат, представляющий собой трансплантат аутологичного кожного эквивалента. Трансплантаты изготавливаются из клеток-предшественников кератиноцитов и фибробластов (эпидермальных стволовых клеток), генетически исправленных с помощью безопасного (SIN) ретровирусного вектора, экспрессирующего коллаген VII типа под контролем промотора EF1alpha. Используемый SIN-вектор был охарактеризован EUFETS (BioNTech IMFS, Германия) и назван pCMS-EF1.COL7A1.SIN1 (E890)<sup>13</sup>.

Следует отметить, что были разработаны и другие системы трансфекции, например на основе фагов, демонстрирующие более низкий трансфекционный потенциал по сравнению с векторами на основе ретровирусов, что компенсировалось последующим культивированием и отбором трансдуцированных клеток. При этом отмечалось устойчивое продуцирование белка C7 несколькими поколениями фибробластов на протяжении 14 недель в культуре клеток, а также в коже [24].

### Клеточная терапия β-гемоглобинопатий

β-гемоглобинопатии, которые включают β-талассемию и серповидноклеточную анемию, являются одними из самых распространенных моногенных заболеваний в мире [25]. β-талассемию могут вызвать более 200 различных мутаций в гене глобина HBB, который кодирует бета-цепь гемоглобина А человека. Мутации в этом гене приводят или к снижению (β+), или к полному отсутствию (β0) синтеза β-глобина, что обуславливает возникновение мишеневидных форм эритроцитов, нарушение эритропоэза, хронический гемолиз и тяжелую анемию [26]. При самых тяжелых клинических проявлениях заболевания пациенты нуждаются в постоянном переливании

<sup>12</sup> Phase I/II *ex vivo* gene therapy clinical trial for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using skin equivalent grafts genetically corrected with a COL7A1-encoding SIN retroviral vector. GENEGRAFT Project. CORDIS. European Commission. [https://cordis.europa.eu/project/rcn/98248\\_en.html](https://cordis.europa.eu/project/rcn/98248_en.html)

<sup>13</sup> Там же.

эритроцитарной массы и сопутствующей терапии, направленной на хелирование избытков железа, возникающих при частых переливаниях крови. На данный момент единственным вариантом лечения, приводящим к полному излечению заболевания, является аллогенная пересадка костного мозга [27].

Сложность подбора доноров и риски, связанные с трансплантацией, ограничивают широкое использование аллогенных гемопоэтических клеток пациентам с  $\beta$ -талассемией. Эту проблему, а также необходимость регулярного переливания эритроцитарной массы можно решить, используя векторные конструкции, кодирующие функционально-активные формы  $\beta$ -глобина. Так, аутологичные CD34<sup>+</sup> гемопоэтические клетки, трансдуцированные *ex vivo* с помощью вектора LentiGlobin BV305, который несет ген гемоглобина взрослого человека с аминокислотной заменой T87Q (HbAT87Q), вводили в кровь пациентам с разным генотипом, в том числе с генотипом  $\beta^0/\beta^0$  [28]. Терапия привела к снижению или даже полному отказу пациентов от переливания крови, увеличению уровня HbAT87Q и общего гемоглобина. У пациентов также отмечалась коррекция биологических маркеров дизэритропоэза [29].

Другой вид  $\beta$ -гемоглобинопатии — серповидноклеточная анемия возникает в результате гомозиготной миссенс-мутации (замене) в одном из экзонов гена  $\beta$ -глобина (HBB) (Glu6Val), что приводит к образованию аномального гемоглобина S [30]. В условиях гипоксии гемоглобин S полимеризуется, в результате чего эритроциты приобретают серповидную форму. У больных наблюдаются болезненные вазоокклюзивные кризы, приводящие к повреждению разных органов, снижению качества и продолжительности жизни [31].

На сегодняшний день единственным одобренным видом терапии серповидноклеточной анемии является применение гидроксимочевины — цитотоксического соединения, способного приводить к повышению уровня фетального гемоглобина. Для некоторых пациентов, страдающих этим заболеванием, возможно лечение с помощью аллогенной трансплантации гемопоэтическими стволовыми клетками [32].

Несколько лет назад подход, разработанный для лечения  $\beta$ -талассемии, был применен и для лечения пациента с серповидноклеточной анемией — 13-летнего мальчика с генотипом  $\beta^S/\beta^S$  с осложненным клиническим анамнезом. В связи с низкой чувствительностью к терапии дезоксимочевиной пациенту регулярно проводилось переливание эритроцитарной массы с хелатированием железа. Введение пациенту аутологичных CD34<sup>+</sup> гемопоэтических стволовых клеток, полученных из КМ и трансдуцированных самоинактивирующимся лентивирусным вектором LentiGlobin BV305, несущим ген  $\beta$ -глобина (человеческий вариант HBB  $\beta^A$ -T87Q), привело к значительному увеличению уровня  $\beta$ -глобина и отсутствию рецидивов заболевания. В результате терапии биохимические параметры крови пришли в норму, и переливание эритроцитарной массы было прекращено на 88 сутки после трансплантации. Пациент был выписан на 50 сутки после трансплантации, и повторных госпитализаций, связанных с заболеванием, у него не было на протяжении более 15 месяцев [33].

В июне 2019 года ЕМА было выдано разрешение на коммерческое использование препарата на основе аутологичных генетически модифицированных CD34<sup>+</sup> клеток, содержащих корректную копию гена  $\beta^A$ -T87Q-глобина, под торговым названием Zynteglo (bluebird bio). Препарат предназначен для пациентов старше 12 лет, нуждающихся в регулярном переливании крови и для которых отсутствует донор для пересад-

ки КМ. Так же, как в случае с препаратом Strimvelis, клетки препарата Zynteglo трансплантируются в КМ пациента, где они восстанавливают гемопоэтическую систему. При применении препарата ожидается пожизненный терапевтический эффект<sup>14</sup>.

Таким образом, эффект при лечении генетических заболеваний с помощью клеток, модифицированных векторной конструкцией, достигается путем трансфекции в клетку гена, экспрессирующего функционально-активный белок, недостаток которого и приводит к развитию заболевания. Другой стратегией лечения генетических заболеваний с помощью *ex vivo* генотерапевтических препаратов является применение модифицированных с помощью различных систем редактирования генома клеток, в которых выключены или изменены аномальные гены.

### Клеточная терапия дефицита альфа-1-антитрипсина

Дефицит альфа-1-антитрипсина (A1AT, также известного как SERPINA1) — генетически детерминированное заболевание, вызванное недостаточностью белка A1AT в сыворотке крови и проявляющееся в виде хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), эмфиземы легких, поражения печени и сосудов. Белок A1AT — это ингибитор сериновой протеазы, в основном экспрессируемый и секретируемый гепатоцитами и защищающий соединительную ткань от деградации нейтрофильной эластазой и другими протеазами [34]. Дефицит A1AT является аутосомно-рецессивным заболеванием, обнаруживаемым у 1 из 2000 европеоидов, и представляет собой наиболее распространенное наследственное заболевание обмена, приводящее к поражению печени [35]. В основе заболевания лежит единственная точечная мутация (Glu342Lys) в гене, кодирующем белок A1AT. В настоящее время единственным способом лечения является пересадка печени. Растущая нехватка доноров и отрицательные эффекты иммуносупрессивного лечения накладывают серьезные ограничения на трансплантацию органов, что делает применение индуцированных плюрипотентных клеток человека весьма привлекательным для терапии генетического заболевания, связанного с дефицитом A1AT.

K. Yusa с соавт. [36] применили систему коррекции генома ZFN совместно с *piggyBac*-технологией в iPSCs для биллельной коррекции точечной мутации в гене A1AT. Транспозон *piggyBac* выделен из клеток *Trichoplusia ni*, может эффективно транспонироваться в геном клеток млекопитающих и осуществлять бесшовное удаление участков ДНК, окруженных инвертированными повторами (inverted terminal repeat sequences, ITRs) [37]. iPSCs с скорректированным геномом дифференцировали *in vitro* в гепатоцитоподобные клетки. Полученные клетки секретируют белок A1AT, который проявлял ферментативную ингибирующую активность, сравнимую с активностью фермента из нормальных гепатоцитов. Полученные iPSCs через 14 суток после инъекции в печень мышей демонстрировали способность дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки, которые были способны заселять печень *in vivo* и проявлять функциональную активность [36].

### Клеточная терапия гемофилии А

Гемофилия А — одно из наиболее распространенных генетических заболеваний, вызванное мутациями в гене фактора свертывания крови VIII (F8), локализованном в хромосоме X.

<sup>14</sup> Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information_en.pdf)

В зависимости от видов мутаций выделяют три степени тяжести протекания заболевания, которые связаны с количеством и активностью фактора VIII в крови: легкий (активность фермента варьирует от 5 до 30% от нормы), умеренный (активность фермента варьирует от 2 до 5% от нормы) и тяжелый (активность фермента составляет менее 1% от нормы). Почти половина всех случаев тяжелой гемофилии А является результатом двух грубых хромосомных инверсий размером 140 т. п.н. в области интрона 1 (int1h-1/int1h-2) и 600 т. п.н. в области интрона 22 (int22h-1/int22h-2.3) гена F8 [38].

Для лечения данного генетического заболевания было предложено осуществить восстановление нормальной последовательности нуклеотидов в инвертированном участке с помощью системы CRISPR/Cas9 — РНК-направляемых нуклеаз (RNA-guided engineered nucleases, RGENs) в iPSCs. Эндотелиальные клетки, дифференцированные из iPSCs с отредактированным геном F8, были способны экспрессировать активный фактор свертывания крови VIII и приводить к устранению его дефицита в крови иммунодефицитных мышей. У мышей, которым трансплантировали клетки с отредактированным геномом, наблюдалось значительное увеличение продолжительности жизни и более высокие показатели активности фактора VIII [39].

### Клеточная терапия мышечной дистрофии Дюшенна

Возможность использования системы CRISPR/Cas9 предлагается для лечения другого генетического заболевания — мышечной дистрофии Дюшенна (МДД). МДД — наиболее распространенное детское, чаще встречающееся у мальчиков генетическое заболевание с летальным исходом, сцепленное с хромосомой X. Заболевание вызывается различными мутациями, в том числе точечными делециями и дупликациями, в экзонных областях (чаще в экзонах 45–55) гена дистрофина, приводящими к сдвигу рамки считывания, что проявляется в изменении структуры или снижении количества белка дистрофина в клетках мышечной ткани [40]. Функция дистрофина в мышечных волокнах заключается в стабилизации сарколеммы за счет образования дистрофин-ассоциированного гликопротеинового (ДАГ) комплекса, при деградации которого происходит нарушение целостности клеточной мембраны с последующей дегенерацией мышечных волокон.

В настоящее время не существует высокоэффективных методов лечения МДД, есть лишь способы замедления скорости прогрессирования заболевания. Однако ведутся разработки клеточной и генной терапии, которые позволяют восстановить синтез дистрофина либо путем встраивания в клетки нормального гена дистрофина, либо с помощью коррекции мутации в самом гене дистрофина или в его мРНК [41]. Многочисленные доклинические и клинические исследования продемонстрировали, что удаление из гена экзонах 45–55 приводит к частичному исправлению структуры дистрофина и к более легкому течению заболевания по типу мышечной дистрофии Беккера, при котором симптомы заболевания могут не проявляться даже к 60 годам [40].

Именно на удаление экзонах 45–55 с последующим неомологичным соединением концов ДНК направлена система коррекции генома на основе CRISPR/Cas9. В результате ее действия происходит устранение сдвига рамки считывания и экспрессия стабильного и функционально-активного белка DYSΔ45–55. Полученная система была применена к клеткам iPSCs, полученным из фибробластов людей с миодистрофией, с последующей их дифференцировкой в кар-

диомиоциты и клетки скелетных мышц. Клетки скелетных мышц, полученные из iPSCs, инъецированные в переднюю большеберцовую мышцу иммунодефицитных мышей, секретировали дистрофин и β-дистрогликан правильной структуры, что приводило к образованию функционально-активного ДАГ комплекса [42].

Кроме подхода с использованием генотерапевтических препаратов для лечения МДД с 1990-х годов проводятся клинические исследования внутримышечных инъекций СК людям. Так, при введении миобластов, полученных путем культивирования из биопсии мышечной ткани здоровых доноров, в мышцы-разгибатели стопы и пальцев, у пациентов с МДД отмечалось увеличение изометрической силы и произвольных сокращений мышц [43]. В другом исследовании проводили имплантацию в переднюю большеберцовую мышцу культивированных миобластов, полученных от здоровых доноров. Гистологическое и молекулярно-биологическое исследование биопсийного материала подтвердило увеличение числа мышечных волокон, экспрессирующих донорский дистрофин [44].

### Заключение

Таким образом, клеточные препараты (БМКП), в том числе генотерапевтические *ex vivo*, в настоящее время все больше применяются для терапии моногенных генетических заболеваний. Интерес к разработке БМКП, содержащих генетически модифицированные клетки, обусловлен проблемами лечения генетических заболеваний, связанными с отсутствием совместимого донора для пересадки костного мозга, отсутствием препаратов/методов лечения или ответа на стандартное лечение (в частности, на заместительную терапию). Разработки подобных препаратов осуществляются во многих странах и находятся на разных стадиях: ДКИ и разные фазы КИ. Для одного заболевания могут разрабатываться различные подходы к лечению с применением БМКП, основанных на разных типах жизнеспособных клеток: дифференцированных, СК и фибробластов, iPSCs, а также *ex vivo* генетически модифицированных. Генетическая модификация выделенных из организма клеток может заключаться в исправлении дефектного гена либо его нокауте, а также внесении в клетку корректной копии гена. Именно использование генотерапевтических препаратов, в том числе для генной терапии *ex vivo*, позволит добиться долгосрочного эффекта и устойчивой ремиссии заболевания. Целью дальнейшей разработки и совершенствования таких препаратов является отказ от проведения заместительной терапии или паллиативного лечения, а также существенное продление продолжительности и качества жизни пациентов.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590045-2).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine — a primer. *N Engl J Med*. 2002;347(19):1512–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012240>
2. Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet*. 2008;371(9629):2044–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60874-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60874-0)
3. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Рачинская ОА, Чапленко АА, Меркулов ВА, Олефир ЮВ и др. Современные подходы к проведению оценки качества препаратов для клеточной терапии. *Биофармацевтический журнал*. 2016;8(4):35–46. [Melnikova EV, Merkulova OV, Rachinskaya OA, Chaplenko AA, Merkulov VA, Olefir YuV, et al. Modern approaches to the assessment of the quality control of cell-therapy products. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2016;8(4):35–46 (In Russ.)]
4. Abbott A. Italians first to use stem cells. *Nature*. 1992;356(6369):465. <https://doi.org/10.1038/356465a0>
5. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science*. 1995;270(5235):470–5. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.470>
6. Chan B, Wara D, Bastian J, Hershfield MS, Bohnsack J, Azen CG, et al. Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for Adenosine deaminase (ADA)-deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID). *Clin Immunol*. 2005;117(2):133–43. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.07.006>
7. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270(5235):475–80. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>
8. Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, Casorati G, Ficara F, Andolfi G, et al. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med*. 2002;8(5):423–5. <https://doi.org/10.1038/nm0502-423>
9. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002;296(5577):2410–3. <https://doi.org/10.1126/science.1070104>
10. Rashidghamat E, McGrath JA. Novel and emerging therapies in the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Intractable Rare Dis Res*. 2017;6(1):6–20. <https://doi.org/10.5582/iridr.2017.01005>
11. Wong T, Gammon L, Liu L, Mellerio JE, Dopping-Hepenstal PJ, Pacy J, et al. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2008;128(9):2179–89. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.78>
12. Nagy N, Almaani N, Tanaka A, Lai-Cheong JE, Techanukul T, Mellerio JE, McGrath JA. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1771–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.85>
13. Natsuga K, Sawamura D, Goto M, Homma E, Goto-Ohguichi Y, Aoyagi S, et al. Response of intractable skin ulcers in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients to an allogeneic cultured dermal substitute. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(2):165–9. <https://doi.org/10.2340/00015555-0776>
14. Falabella AF, Schachner LA, Valencia IC, Eaglstein WH. The use of tissue-engineered skin (Apligraf) to treat a newborn with epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*. 1999;135(10):1219–22. <https://doi.org/10.1001/archderm.135.10.1219>
15. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther*. 2009;17(6):939–46. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.62>
16. Conget P, Rodriguez F, Kramer S, Allers C, Simon V, Pallissou F, et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2010;12(3):429–31. <https://doi.org/10.3109/14653241003587637>
17. Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R, Pas HH, Nijenhuis M, Heeres K, et al. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell*. 1997;88(4):543–51. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81894-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81894-2)
18. Gostynski A, Deviaene FC, Pasmooij AM, Pas HH, Jonkman MF. Adhesive stripping to remove epidermis in junctional epidermolysis bullosa for revertant cell therapy. *Br J Dermatol*. 2009;161(2):444–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09118.x>
19. Tolar J, McGrath JA, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide C, et al. Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2014;134(5):1246–54. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.523>
20. Umegaki-Arao N, Pasmooij AM, Itoh M, Cerise JE, Guo Z, Levy B, et al. Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med*. 2014;6(264):264ra164. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009342>
21. De Rosa L, Carulli S, Cocchiarella F, Quaglino D, Enzo E, Franchini E, et al. Long-term stability and safety of transgenic cultured epidermal stem cells in gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Stem Cell Reports*. 2013;2(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.001>
22. Siprashvili Z, Nguyen NT, Gorell ES, Loutit K, Furukawa LK, et al. Safety and wound outcomes following genetically corrected autologous epidermal grafts in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JAMA*. 2016;316(17):1808–17. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.15588>
23. Titeux M, Pendaries V, Zanta-Boussif MA, Décha A, Pironon N, Tonasso L, et al. SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2010;18(8):1509–18. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.91>
24. Ortiz-Urda S, Lin Q, Green CL, Keene DR, Marinkovich MP, Khavari PA. Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. *J Clin Invest*. 2003;111(2):251–5. <https://doi.org/10.1172/JCI17193>
25. Piel FB. The present and future global burden of the inherited disorders of hemoglobin. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(2):327–41. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.004>
26. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010;12(2):61–76. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed>
27. Lucarelli G, Isgrò A, Sodani P, Gaziev J. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(5):a011825. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011825>
28. Takekoshi KJ, Oh YH, Westerman KW, London IM, Lebovich P. Retroviral transfer of a human beta-globin/delta-globin hybrid gene linked to beta locus control region hypersensitive site 2 aimed at the gene therapy of sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(7):3014–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.3014>
29. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Ribeil JA, Hongeng S, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med*. 2018;378(16):1479–93. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705342>
30. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 1956;178(4537):792–4. <https://doi.org/10.1038/178792a0>
31. Strouse JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: a sys-

- tematic review for efficacy and toxicity in children. *Pediatrics*. 2008;122(6):1332–42. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0441>
32. Krishnamurti L, Abel S, Maiers M, Flesch S. Availability of unrelated donors for hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31(7):547–50. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703887>
33. Badat M, Davies J. Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2017;376(21):2093–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1704009>
34. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(8):2136–41.
35. Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:147–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082107.133320>
36. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, et al. Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;478(7369):391–6. <https://doi.org/10.1038/nature10424>
37. Wang W, Lin C, Lu D, Ning Z, Cox T, Melvin D, et al. Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(27):9290–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801017105>
38. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*. 2005;6(6):488–501. <https://doi.org/10.1038/nrg1617>
39. Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, et al. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2015;17(2):213–20. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.001>
40. Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63 % of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat*. 2007;28(2):196–202. <https://doi.org/10.1002/humu.20428>
41. Wilton SD, Lloyd F, Carville K, Fletcher S, Honeyman K, Agrawal S, Kole R. Specific removal of the nonsense mutation from the *mdx* dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord*. 1999;9(5):330–8. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(99\)00010-3](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(99)00010-3)
42. Young CS, Hicks MR, Ermolova NV, Nakano H, Jan M, Younesi S, et al. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(4):533–40. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.021>
43. Law PK, Goodwin TG, Fang Q, Duggirala V, Larkin C, Florendo JA, et al. Feasibility, safety, and efficacy of myoblast transfer therapy on Duchenne muscular dystrophy boys. *Cell Transplant*. 1992;1(2-3):235–44. <https://doi.org/10.1177/0963689792001002-305>
44. Skuk D, Goulet M, Roy B, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, et al. Dystrophin expression in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(4):371–86. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218443.45782.81>

## Об авторах / Authors

**Рачинская Ольга Анатольевна**, канд. биол. наук. *Olga A. Rachinskaya*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9555-1950>

**Водякова Марина Андреевна**. *Marina A. Vodyakova*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6008-0554>

**Мельникова Екатерина Валерьевна**, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 26.09.2019

После доработки 13.11.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 26 September 2019

Revised 13 November 2019

Accepted 22 November 2019