

УДК 577.21 573.6

Мышечно-специфические промоторы для генной терапии

В. В. Скопенкова^{1,2,3*}, Т. В. Егорова^{1,2}, М. В. Бардина^{1,2,3}¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия²ООО «Марлин Биотех», Москва, 121205 Россия³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (ЦВРГТБ) ИБГ РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: v.silina.marlin@gmail.com

Поступила в редакцию 06.06.2020

Принята к печати 30.07.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11063

РЕФЕРАТ Современной стратегией лечения наследственных заболеваний, приводящих к патологии мышц, является заместительная генная терапия, при которой функциональную копию поврежденного гена доставляют в пораженные ткани с помощью вирусных векторов. Для этого необходимы также короткие регуляторные последовательности, которые обеспечивают устойчивую высокую экспрессию терапевтического гена в скелетных мышцах, диафрагме и сердце и имеют ограниченную активность в других тканях. В представленном обзоре рассмотрены этапы создания и совершенствования мышечно-специфических промоторов на основе генов α -скелетного актина, мышечной креатинкиназы, десмина и других генов, экспрессирующихся в мышцах. Описаны современные подходы к созданию синтетических мышечно-специфических промоторов, а также рассмотрены элементы вектора, способные (помимо промотора) влиять на экспрессию терапевтического гена. Приведены результаты клинических и доклинических исследований генотерапевтических препаратов с применением мышечно-специфических промоторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА генная терапия, мышечно-специфические промоторы, ААВ, синтетические промоторы.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ААВ – аденоассоциированный вирус; ДИ – доклинические исследования; КИ – клинические исследования; КПМД – конечностно-поясная мышечная дистрофия; НТО – нетранслируемая область; ТФ – фактор транскрипции; CMV – цитомегаловирус; MVM – мелкий вирус мышей; TSS – сайт начала транскрипции; TFBS – сайт связывания фактора транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

Наследственные мышечные заболевания диагностируют у четырех-пяти человек на каждые 20000 населения [1]. К таким заболеваниям относят клинически и генетически гетерогенную группу мышечных дистрофий, врожденных миопатий, лизосомных болезней накопления, каналопатий и митохондриальных болезней, вызывающих поражения мышечной ткани. Слабость скелетной мускулатуры приводит к ограничению двигательной активности, нарушение работы глотательных мышц затрудняет самостоятельный прием пищи, а сердечная и дыхательная недостаточность требуют аппаратной поддержки и могут служить причиной ранней смерти. Лечение наследственных мышечных заболеваний носит по большей части симптоматический характер [2].

Многие наследственные мышечные заболевания обусловлены дефицитом определенного белка, вызванным мутацией в соответствующем гене (*таблица*). В качестве перспективной стратегии лечения таких заболеваний рассматривается *заместитель-*

ная генная терапия, т.е. доставка генетической конструкции с функциональной копией гена в мышечные ткани. В качестве инструмента для доставки генетических конструкций *in vivo* наиболее перспективны и безопасны рекомбинантные вирусные векторы, созданные на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ) [3]. Природные серотипы ААВ, такие, как ААВ9, ААВ8, ААВrh74, ААВ1 обладают естественным тропизмом к мышцам, что позволяет доставлять функциональную копию гена преимущественно в поврежденные ткани. В *таблице* приведены примеры разрабатываемых в настоящее время препаратов на основе ААВ для генной терапии наследственных мышечных заболеваний.

Эффективность генной терапии во многом определяется уровнем экспрессии гена интереса в целевых тканях. С одной стороны, мышцы являются удобной мишенью для генной терапии из-за продолжительной жизни мышечных волокон, доступности для внутримышечного введения, а также высокой способности к синтезу белка [12]. С другой стороны, мышцы

Наследственные мышечные заболевания и разрабатываемые препараты генной терапии

| Заболевание | Ген, мутация | Тип наследования | Белок | Препараты генной терапии* в клинических и доклинических испытаниях |
|---|---------------|------------------|-------------------------------|---|
| Миодистрофия Дюшенна | <i>DMD</i> | ХР | Дистрофин | КИ: AAVrh74.MHCK7.miDMD NCT03769116 КИ: AAV9.CK8e.miDMD NCT03368742 КИ: AAV9.tMCK.miDMD NCT04281485 |
| Болезнь Данона | <i>LAMP2</i> | ХР | LAMP2 | ДИ: AAV9.CAG.LAMP2B [4] КИ: NCT03882437 |
| Синдром Барта | <i>TAZ</i> | ХР | Тафаззин | ДИ: AAV9.Des.TAZ [5] |
| Миотубулярная миопатия | <i>MTM1</i> | ХР | Миотубулярин | ДИ: AAV8.DES.hMTM1 [6] КИ: NCT03199469 |
| Первичный дефицит мерозина | <i>LAMA2</i> | АР | Мерозин | ДИ: AAV9.CB.mini-agrin [7] |
| Болезнь Помпе | <i>GAA</i> | АР | α -1,4- глюкозидаза | ДИ: AAV2/8.MHCK7.hGAA [8] КИ: AAV2/8.LSP.hGAA NCT03533673 КИ: rAAV9.DES.hGAA NCT02240407 |
| Конечностно-поясная мышечная дистрофия (КПМД), 2А | <i>CAPN3</i> | АР | Кальпаин 3 | ДИ: AAV9.desmin.hCAPN3 [9] |
| КПМД, 2В | <i>DYSF</i> | АР | Дисферлин | КИ: rAAVrh.74.MHCK7.DYSF NCT02710500 |
| КПМД, 2D | <i>SGCA</i> | АР | α -саркогликан | КИ: rAAV1.tMCK.haSG NCT00494195 КИ: scAAVrh74.tMCK.hSGCA NCT01976091 |
| КПМД, 2Е | <i>SGCB</i> | АР | β -саркогликан | КИ: scAAVrh74.MHCK7.hSGCB NCT03652259 |
| КПМД, 2I | <i>FKRP</i> | АР | Фукутин- подобный белок | ДИ: AAV9.Des.mFkrp [10] |
| Окулофарингеальная миодистрофия | <i>PABPN1</i> | АД | PABPN1 | ДИ: AAV9.spc512.PABPN1 [11] |

* В названии препаратов указан серотип вектора ААВ, промотор и ген интереса.

Примечание. АД – аутосомно-доминантный, АР – аутосомно-рецессивный, ХР – Х-сцепленный, рецессивный, ДИ – доклинические исследования, КИ – клинические исследования.

составляют до 30–40% массы тела, что требует высоких доз генотерапевтического препарата [13]. Кроме того, мышечная ткань разнородна по своей структуре и подразделяется на сердечную, скелетную и гладкую мускулатуру. Это затрудняет создание препаратов, способных одинаково эффективно работать в разных типах мышечной ткани [14].

Правильно выбранный промотор для регуляции экспрессии гена интереса – залог успешной генной терапии. Такой промотор должен обеспечивать стабильную, высокую экспрессию функциональной копии гена в пораженных мышцах в течение длительного периода и обладать при этом ограниченной активностью в других тканях. При использовании ААВ в качестве вектора для генной терапии также необходимо уменьшить размер промотора из-за небольшой емкости вируса (4.7 т.п.н.) [3]. Сильные и конститутивные промоторы, такие, как промоторы респираторно-синцитиального вируса (RSV), цитомегаловируса (CMV) или фактора элонгации

1a (EF1a), имеют небольшой размер и могут применяться для достижения высоких уровней экспрессии. Однако экспрессия в нецелевых клетках, особенно в антигенпрезентирующих, приводит к активации клеточного и гуморального иммунного ответа [15]. Кроме того, вирусные промоторы быстро метилируются в трансдуцированных клетках, что приводит к снижению их активности [16].

В нашем обзоре описаны принципы создания и совершенствования природных мышечно-специфических промоторов, современные подходы к дизайну синтетических промоторов, а также их применение в генотерапевтических конструкциях.

СТРУКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА

Транскрипция генов эукариот управляется регуляторными элементами двух классов: промоторами, в структуре которых можно выделить коровую и проксимальные части, и дистальными регуляторными элементами (рис. 1) [17].

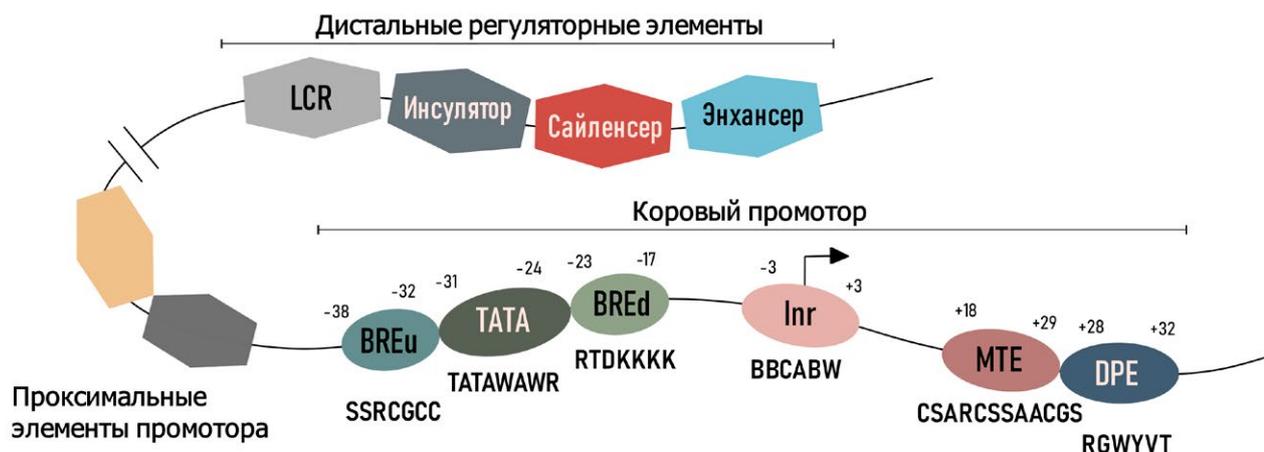


Рис. 1. Структура эукариотического промотора. Промотор эукариот представлен коровым промотором, проксимальными элементами, а также дистальными регуляторными элементами. Показаны консервативные элементы корового промотора, их последовательность и положение от сайта начала транскрипции

Коровый (базальный, минимальный) промотор – участок ДНК, который расположен в положении примерно -50... +50 нуклеотидов относительно начального сайта транскрипции (TSS) и отвечает за инициацию транскрипции [18]. Выделяют несколько типов коровых промоторов. В «сфокусированном» коровом промоторе присутствует один хорошо различимый TSS. Если в области 50–100 нуклеотидов присутствует большое количество близко расположенных TSS, то такой коровый промотор называют «дисперсным» [19]. Промоторы сфокусированного типа встречаются преимущественно в генах с тканеспецифичной экспрессией, тогда как дисперсные коровые промоторы характерны для повсеместно экспрессирующихся генов [18].

На коровом промоторе происходит сборка преинициаторного комплекса, который состоит из РНК-полимеразы II и базальных факторов транскрипции (ТФ). Коровые промоторы содержат различные консервативные мотивы, которые определяют их свойства (рис. 1). Наиболее распространенным элементом коровых промоторов является инициатор (Inr) – последовательность нуклеотидов, которая окружает TSS и узнается мультисубъединичным транскрипционным фактором IID (TFIID) [20]. Другой распространенный элемент корового промотора – TATA-бокс. TATA-подобную последовательность содержит 28% сфокусированных промоторов человека [19]. TATA-бокс узнается субъединицей TBP транскрипционного фактора TFIID [21]. В промоторах без TATA-бокса Inr часто сопровождается мотивом DPE (downstream promoter element), который расположен после инициатора и также распознается субъединицами TFIID [22]. MTE (motif ten element) располагается близко или перекрывается с DPE-элементом [23]. В коровых промоторах также часто встречаются такие элемен-

ты, как BREu (upstream TFIIB recognition element) и BREd (downstream TFIIB recognition element) [24].

Проксимальная часть промотора составляет ~50–1000 п.н. и содержит множество сайтов связывания транскрипционных факторов (TFBS, transcription factor binding site) [25]. Именно уникальные сочетания таких сайтов связывания для каждого промотора позволяют всего ~1600 ТФ управлять экспрессией ~25000 генов человека, контролируя время, место и продолжительность экспрессии каждого из них [26].

К дистальным регуляторным элементам генов эукариот относятся энхансеры, сайленсеры, инсуляторы и области контроля локуса (LCR) (рис. 1). Наибольший интерес для данного обзора представляют энхансерные элементы – последовательности ДНК длиной ~100–1000 п.н., которые могут усиливать транскрипцию генов независимо от ориентации и расстояния до целевого промотора [27]. Эти элементы могут быть найдены в 5'- и 3'-нетранслируемых областях (НТО) генов, в пределах экзонов и интронов, и даже на расстоянии до 1 млн п.н. от TSS [28]. Многие из энхансеров являются высококонсервативными последовательностями, активность которых может быть ограничена конкретным типом ткани или клеток, этапом развития или определенными физиологическими условиями [25].

ПРИРОДНЫЕ ПРОМОТОРЫ

Простой путь создания мышечно-специфического промотора основан на использовании природного промотора гена, активно экспрессирующегося в мышцах. Полноразмерный природный промотор укорачивают, оставляя коровый и проксимальный промоторы, добавляя дистальные энхансеры [29]. Вносимые делеции обычно затрагивают низкоконсервативные последовательности. Значимость остав-



Рис. 2. Промоторы на основе гена *ACTA1/HSA*. **A** – полноразмерный HSA-промотор содержит дистальный регион, проксимальный регион (ПР) и базальный, который состоит из некодирующего экзона (+1...+90) и фрагмента первого интрона (+91...+239); **Б** – HSA-промотор с внесенными делециями; **В** – химерный HSA/CMV-промотор, состоящий из фрагмента промотора HSA и CMV-промотора

ленных последовательностей для экспрессии подтверждают мутационным анализом [29]. В других случаях создают гибридные/химерные промоторы, добавляя энхансеры других генов [30]. Варьируя количество копий энхансеров и отдельных TFBS, рационально комбинируя эти последовательности, можно добиться значительного увеличения уровня экспрессии и тканеспецифичности промотора [31].

Промоторы на основе гена α -скелетного актина

Для создания мышечно-специфических промоторов исследователи в первую очередь обратились к изучению промоторных областей генов, экспрессирующихся в миоцитах. Актин является одним из основных белков саркомера – базовой сократительной единицы поперечно-полосатых мышц. У высших позвоночных выделяют шесть основных изоформ актина, кодируемых шестью разными генами: α -скелетный, α -сердечный актин, α -гладкомышечный, γ -гладкомышечный, а также две повсеместно экспрессирующиеся немышечные изоформы – β -цитоплазматический и γ -цитоплазматический актин [32]. Наибольший интерес вызывал промотор гена α -скелетного актина человека (*HSA*, human α -skeletal actin), так как во взрослых мышцах среди актиновых белков преобладает эта изоформа [33].

Первые работы показали, что область размером 2000 п.н. перед геном *HSA*, а также первый экзон и фрагмент первого интрона необходимы и достаточны для мышечно-специфической экспрессии в культуре клеток (рис. 2А) [34]. В промоторе выделили три главных региона: дистальный (–1300...–626 п.н. от TSS), проксимальный (–153...–87) и базальный (–87...+239), которые обеспечивали тканеспецифическую экспрессию, если разместить их (вместе или по отдельности) перед промотором SV40 [34].

Фрагмент –2000...+7500 п.н. гена *HSA* (промоторный регион –2000...+239) использовали для создания трансгенной линии мышей (рис. 2А) [35]. С исполь-

зованием данного промотора впервые было показано, что уровни экспрессии трансгена и эндогенного α -скелетного актина в поперечно-полосатых мышцах мыши сопоставимы. Промотор HSA стал довольно популярным, его использовали в большом числе исследований. Так, этот промотор применяли для создания трансгенных мышечей с делециями гена дистрофина [36], мышечей со сверхэкспрессией дисферлина [37], моделей мышечей со спинальной мышечной атрофией [38], а также для доставки микродистрофина в мышцы мышечей с помощью лентивирусных векторов [39].

Укороченную модификацию промотора HSA человека использовали в векторе AAV для лечения миодистрофии Дюшенна [40]. Высокий уровень экспрессии трансгена в мышцах обеспечивали с помощью фрагмента длиной 1542 п.н., состоящего из дистального региона, промотора, а также части первого интрона (рис. 2Б). Трансген активно экспрессировался в скелетных мышцах и сердце, но отсутствовал в печени.

Химерный промотор HSA/CMV использовали для продукции в мышцах фактора свертываемости крови IX при гемофилии В [41]. Этот промотор представлял собой фрагмент промотора HSA (–1281...–84), сшитого с CMV-промотором (рис. 2В). В культуре клеток миобластов химерный промотор превосходил по уровню экспрессии CMV-промотор и полноразмерный промотор HSA, однако был столь же активен, как и CMV-промотор в немышечных культурах клеток. По-видимому, добавление повсеместно экспрессирующегося CMV-промотора хотя и увеличило активность химерного промотора, однако лишило его тканевой специфичности.

Для создания мышечно-специфических промоторов по аналогии с промотором HSA были модифицированы регуляторные области гомологичных генов курицы [42], крысы [43] и быка [44]. Полученные конструкции успешно применяли в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также для создания трансгенных мышечей.

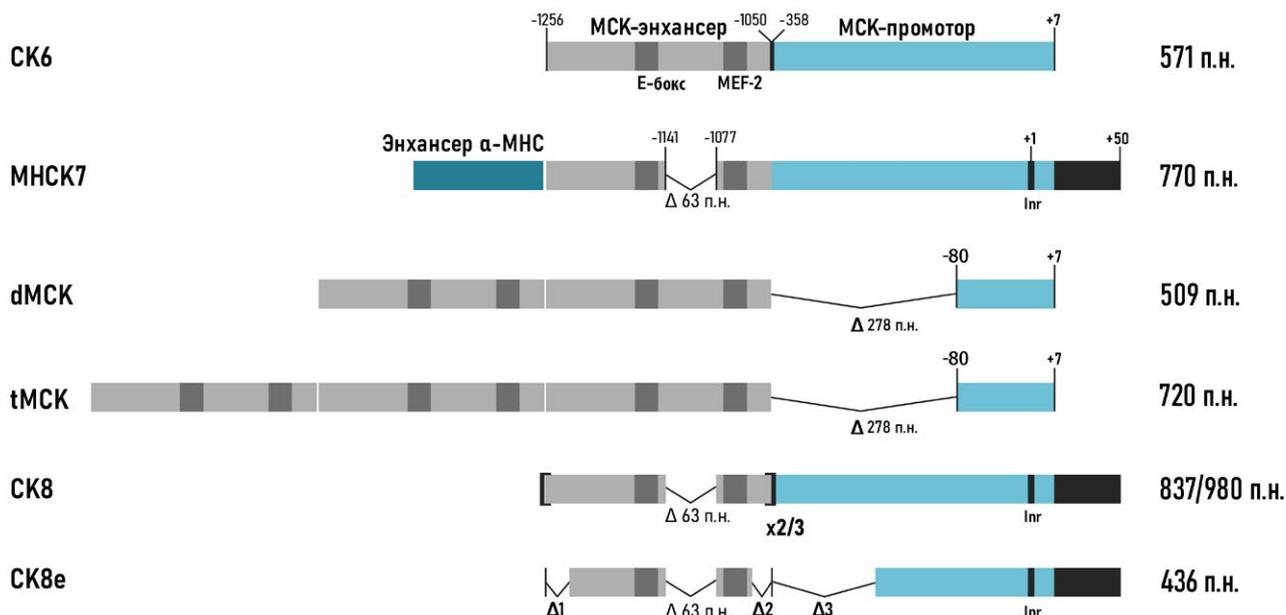


Рис. 3. Промоторы на основе гена *Msk*. Все конструкции содержат в себе энхансер *MCK* и промотор *MCK* с различными внесенными изменениями

В целом, промоторы α-скелетного актина проявляют высокий уровень и специфичность экспрессии в мышечных клетках, однако из-за большого размера они реже используются в настоящее время.

Промоторы на основе гена мышечной креатинкиназы

Второй наиболее часто встречающейся мРНК в скелетных мышцах является транскрипт гена мышечной креатинкиназы (*MCK/CKM*, creatine kinase, M-type) [45]. Мышечная креатинкиназа катализирует обратимый перенос фосфорильного остатка с АТФ на креатин и с креатинфосфата на ADP, обеспечивая тем самым энергией мышечные сокращения. Ген *MCK* также проявляет высокую активность в сердечной мышце, и его транскрипция активируется в ходе дифференцировки миообластов в миоциты [46].

Промотор гена *MCK* хорошо охарактеризован *in vitro* и *in vivo*. В число основных регуляторных областей гена *Msk* мышцы входит мышечно-специфический (206 п.н.) энхансер, расположенный в регионе -1256...-1050 [47]. Этот энхансер функционирует независимо от ориентации и содержит ряд мотивов для связывания миогенных ТФ, а именно, E-боксы, CarG, MEF-2-сайты. Мутационный анализ этих мотивов подтвердил их значение для мышечно-специфической экспрессии [48].

Другой ключевой регуляторный элемент этого гена – проксимальный промотор 358 п.н. [47]. Так, один этот промотор обеспечивал высокий уровень экспрессии трансгена в мышцах конечностей

и брюшных скелетных мышцах мышей, но был неактивен в мышцах сердца и языка. Тем не менее, когда соединили энхансер (206 п.н.) и промотор (358 п.н.), то экспрессия восстановилась во всех типах мышц [47]. Данные, полученные на трансгенных мышцах, подтвердили необходимость энхансера для запуска экспрессии в сердце [49].

На основе перечисленных регуляторных последовательностей созданы и протестированы серии небольших *MCK*-кассет для аденовирусных векторов [50]. Так, **СК6-конструкция**, которая состояла из энхансера 206 п.н. и проксимального промотора 358 п.н. (рис. 3), обеспечивала высокую мышечную специфичность. Однако уровень экспрессии в мышцах не превышал 12% по сравнению с аналогичной конструкцией с CMV-промотором, экспрессия в сердце оставалась низкой [50].

Чтобы добиться высокого уровня экспрессии трансгена в сердечной мышце, был сконструирован химерный промотор **МНСК7** (рис. 3) [29]. Он также состоял из энхансера (206 п.н.) и проксимального промотора, но содержал четыре важные модификации. Так, из 206 п.н. энхансера был удален регион между правым E-боксом и MEF-2-сайтом, представленный низкоконсервативной последовательностью. К промотору были добавлены высококонсервативные 50 п.н. из первого некодирующего экзона *MCK*. Последовательность, содержащую TSS, заменили на консенсусную последовательность Inr. Главная модификация состояла в том, что к описанной кассете был добавлен энхансер 188 п.н. гена тяжелой цепи

α -миозина мышцы (α -Mhc), обеспечивающий высокий уровень экспрессии в сердце [51]. Новый промотор МНСК7 протестировали в контексте ААВ-векторов. Этот промотор обеспечивал экспрессию трансгена, сопоставимую со значениями экспрессии, направляемой промоторами CMV и RSV, в скелетных и сердечных мышцах. При этом при внутривенном введении мышам ААВ6 наблюдалась низкая экспрессия трансгена в печени, легких и селезенке. Интересно, что МНСК7 был в 400 раз более активен в сердце и в 50 раз – в диафрагме по сравнению с промотором СК6.

Почти одновременно с промотором МНСК7 были созданы промоторы **dMCK** и **tMCK** (рис. 3) [52]. В этих конструкциях проксимальный промотор (358 п.н.) был сокращен до размеров базального промотора 87 п.н. (-80...+7), к которому добавлены две (**dMCK**) или три (**tMCK**) копии энхансера MCK (206 п.н.). В экспериментах по доставке трансгена с помощью векторов ААВ tMCK показал себя как наиболее эффективный промотор, опередив по уровню мышечно-специфической экспрессии промоторы CMV, dMCK и СК6. Промотор dMCK не приводил к экспрессии трансгена в сердце и диафрагме.

На этом поиск эффективных мышечно-специфических промоторов не закончился. В лаборатории, создавшей промоторы СК6 и МНСК7, были разработаны конструкции, названные **СК8** (рис. 3). Так, при внутримышечной ААВ8-опосредованной доставке гена гормона роста использовали промотор СК8, который представлял собой МНСК7 с двумя копиями энхансера MCK вместо энхансера тяжелой цепи α -миозина [53]. У мышей, получавших препарат, длина и масса тела были значительно больше по сравнению с мышами без лечения. В другой работе промотор СК8 был аналогичен вышеописанной конструкции, но содержал уже три копии энхансера MCK [31]. Отмечено, что использование трех копий энхансера вместо двух обеспечивает увеличение уровня экспрессии в 4 и 3 раза в скелетных миоцитах и сердце соответственно [31]. Конструкция **СК8e** (436 п.н.), содержащая ряд делеций в энхансере и проксимальном промоторе мышечной креатинкиназы (рис. 3), была активнее CMV-промотора в культуре дифференцированных миобластов человека [54]. Удаление низкоконсервативных областей из промотора не только способствовало уменьшению его длины, но также увеличивало его активность [31].

Благодаря высокой специфичности и активности в мышечных тканях, промоторы на основе гена MCK активно используются в векторах, проходящих клинические и доклинические испытания (таблица). МНСК7-промотор входит в состав векторов для генной терапии болезни Помпе, которые проходят доклинические исследования (ДИ) [8].

Уже ведутся клинические испытания (КИ) по лечению КПМД типа E (NCT03652259), при которой пациентам доставляют функциональную копию гена β -саркогликана под МНСК7-промотором [55]. Этот промотор также применяют в КИ в составе конструкции для доставки гена дисферлина (NCT02710500) [56]. Проводятся КИ препарата на основе ААВrh74 для лечения миодистрофии Дюшенна с МНСК7-промотором (NCT03769116) [57]. Опосредованная ААВ9 доставка гена микродистрофина с СК8e-промотором (NCT03368742) [58] и tMCK-промотором использованы в других КИ (NCT04281485) [57]. Проходят также КИ доставки гена α -саркогликана под tMCK-промотором в терапии КПМД типа 2D (NCT01976091).

Промоторы на основе гена десмина

Десмин – мышечно-специфический белок семейства промежуточных филаментов цитоскелета [59]. Десмин кодируется геном *DES* и является одним из самых ранних маркеров миогенеза [59]. Этот ген уникален тем, что экспрессируется в сателлитных клетках и делящихся миообластах, при этом он в несколько раз более активен в дифференцированных мышечных клетках [60].

Функциональный анализ 5'-фланкирующей области гена десмина человека выявил в ней энхансер (-973...-693), который отвечает за мышечно-специфическую экспрессию [60]. 5'-Область энхансера содержит сайты связывания MEF-2, E-бокс и элемент Mt, она необходима для активации экспрессии в мышечных волокнах; 3'-половина энхансера ответственна за транскрипцию десмина в миообластах за счет связывания факторов SP1 и KROX-20 [60]. Регион -692...-228 является сайленсером, снижающим в 3–7 раз экспрессию в миообластах и мышечных волокнах, а область -228...+75 достаточна для запуска мышечно-специфической экспрессии на низком уровне [61, 62].

Полноразмерный ген дистрофина под промотором десмина человека (9546 п.н., регион -18662...+60) использовали в плазмидном векторе для внутриартериального введения мышам (рис. 4А) [63]. Промотор десмина обеспечивал на протяжении не менее 6 месяцев такой же уровень экспрессии дистрофина, как и промотор CMV.

Вариант промотора десмина человека (715 п.н.) с удаленным сайленсером использовали в сравнительном исследовании мышечно-специфических промоторов при опосредованной ААВ9 внутривенной доставке трансгена мышам (рис. 4Б) [64]. В этой работе десминовый промотор превзошел CMV-промотор и другие мышечно-специфические промоторы по уровню экспрессии трансгена в скелетных мыш-

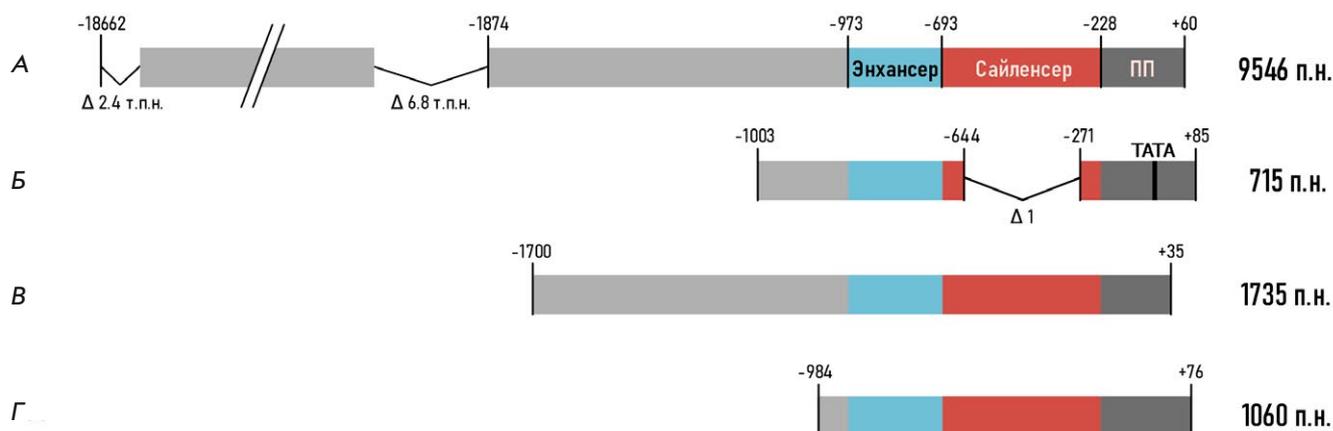


Рис. 4. Промоторы на основе гена *DES* человека. Промотор (А) содержит область контроля локуса гена десмина (18.7 т.п.н.) с внесенными делециями, энхансер, сайленсер и проксимальный промотор (ПП). Промотор (Б) с делецией сайленсера и ТАТА-боксом, внесенным в коровый промотор. Промоторы (В) и (Г) с делециями дистальных регионов

цах и диафрагме. По уровню экспрессии в сердце он уступал только CMV-промотору, однако обеспечивал высокий уровень экспрессии трансгена в мозге [64].

Другой вариант промотора десмина человека использовали для доставки трансгена в мышцы мышей с помощью лентивирусных векторов [65]. Использован регион (-1700...+35), включающий промотор, сайленсер и энхансер (рис. 4В). По активности такой промотор соответствовал CMV-промотору *in vitro* и *in vivo* и даже превосходил в 6–8 раз по уровню экспрессии промотор человека MCK (-1061...+28).

Десминовые промоторы применяли в целом ряде работ (таблица), посвященных болезни Помпе [66]. В настоящий момент препарат rAAV9.DES.hGAA для лечения данного заболевания успешно проходит КИ (NCT02240407). Вариант промотора [64] использовали в ДИ при разработке генной терапии синдрома Барта [5]. Также промотор десмина применяли в ДИ в составе вектора для генной терапии КПМД 2А, характеризующейся нехваткой кальпаина 3 [9], и КПМД 2I с дефицитом фукутин-подобного белка [10]. Промотор гена десмина человека (-984...+76) (рис. 4Г) использовали в ДИ генной терапии миотубулярной миопатии, заболевания, обусловленного мутациями в гене *MTM1* [6]. В настоящий момент этот препарат успешно завершает КИ (NCT03199469).

Промоторы на основе других генов

Регуляторные области множества других генов, демонстрирующих мышечно-специфическую экспрессию, также были использованы для создания промоторов. Работы по поиску эффективного промотора велись параллельно во многих лабораториях, но только некоторые из них завершились успешно.

Так, были созданы лентивирусные конструкции, призванные обеспечить кардиоспецифическую экс-

прессию трансгена для заместительной терапии сердечного варианта болезни Фабри [67]. Среди них был промотор гена α -цепи миозина человека (α -MHC), представленный участком -1198...+1, промотор легкой цепи миозина (MLC2v, -250...+13) и сердечного тропонина Т (сTnT, -300...+1). Все три промотора превосходили повсеместно активный промотор EF1 α по уровню экспрессии трансгена в сердце мышей. Промоторы сTnT и MLC2v экспрессировались не только в сердце, они были активны в печени и селезенке, тогда как под контролем α -MHC трансген экспрессировался строго в сердце [67]. Однако в другом исследовании промоторы на основе этих генов уступали десминовому промотору по уровню экспрессии в скелетных мышцах и сердце [64].

Для доставки микродистрофина в сердце мышей с помощью AAV9 применяли также химерный промотор, который включал CMV-IE-энхансер, присоединенный к фрагменту (1.5 т.п.н.) промотора MLC крысы [68]. Такой промотор был в 4 раза более активным в сердце, чем CMV-промотор, где обеспечивал устойчивую экспрессию трансгена на протяжении 10 месяцев, но был неактивен в скелетных мышцах и печени [69].

На основе гена медленного тропонина I человека (*TNNI1*) создан промотор Δ USEx3, который включал три копии энхансера этого гена (-1036...-873) и минимальный промотор гена *TNNI1* с частью первого экзона (-95...+56) [70]. Промотор Δ USEx3 слабо активен в неммышечных клетках и тканях в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Стоит отметить, что промотор Δ USEx3 при доставке с помощью аденовирусов обеспечивал сопоставимый уровень экспрессии трансгена с синтетическим промотором SPc Δ 5-12 [71], однако при лентивирусной доставке Δ USEx3 был в 5 раз менее активен, чем промотор SPc Δ 5-

12, что, вероятно, связано с эффектами интеграции конструкции в геном.

Ген *unc45b*, кодирующий мышечно-специфический шаперон миозина у рыб, также использовали для создания мышечно-специфического промотора [72]. Так, фрагмент промотора 195 п.н. (-505...-310) был способен запускать экспрессию в скелетных и сердечных мышцах рыб, а также обеспечивал экспрессию репортерного белка в мышцах мышей при доставке плазмид с помощью электропорации.

Стоит отметить, что описанные выше промоторы обеспечивали мышечно-специфическую экспрессию, но были менее активными, чем промоторы на основе генов актина, мышечной креатинкиназы или десмина.

Синтетические промоторы

В настоящий момент наиболее перспективным и многообещающим подходом представляется создание гибридных или синтетических промоторов. Данная стратегия позволяет конструировать промоторы необходимого размера, задавать время, место и уровень экспрессии целевого гена.

В основе создания синтетических промоторов лежат биоинформатические методы выявления регуляторных областей генома, TFBS, предсказания промоторных областей [73–75]. Сайты связывания миогенных ТФ, как правило, меньше 10 п.н. [73], что позволяет создавать библиотеки конструкций, представленные комбинациями из мышечно-специфических TFBS. При этом подходе проводится трудоемкий анализ множества новых синтетических конструкций. Экспериментальным путем необходимо выяснить количество копий нужного мотива, расстояния между TFBS для успешного связывания фактора транскрипции, мотивы, которые работают синергично, и TFBS, вносящие наибольший вклад в усиление экспрессии. Чтобы обойти подобные трудности, можно вернуться к анализу природных промоторов, извлекая уже готовые работающие комбинации мышечно-специфических TFBS, и конструировать промоторы из подобных кластеров. *In silico* анализ может существенно упростить выявление регуляторных областей.

В одной из первых работ по созданию синтетического мышечно-специфического промотора проанализировали организацию сильных мышечных промоторов и вычленили в их структуре распространенные сайты связывания миогенных факторов транскрипции: SRE, MEF2, MEF1 и TEF1, которые случайно лигировали друг с другом в прямой и обратной ориентации. Полученные фрагменты поместили перед минимальным промотором гена α -скелетного актина курицы (рис. 5) с целью создания библиотеки из более чем 1000 вариантов промоторов. Активность по-

лученных конструкций проанализировали на первичных миобластах и отобрали промотор **SPc5-12** (рис. 5), который был в 6 раз более активным в мышечных волокнах по сравнению с CMV-промотором. При этом промотор был неактивен в недифференцированных миобластах, а также в различных немускульных клеточных линиях, что подтвердилось в экспериментах *in vivo*.

Промотор SPc5-12 использовали для экспрессии трансгена в экспериментах на животных моделях миодистрофии Дюшенна [76], болезни Помпе [77], дисферлинопатии [78], а также для обеспечения экспрессии гормона роста [79]. SPc5-12-промотор применяли также в ДИ в составе генотерапевтического препарата для коррекции окулофарингеальной мышечной дистрофии [11].

Сходным подходом воспользовались при создании синтетического промотора [80] с использованием 19 элементов, среди которых было восемь мышечно-специфических TFBS, шесть вирусных элементов из CMV и SV40-промоторов, а также пять консервативных *cis*-действующих элементов промоторов эукариот (ТАТА-бокс и др.). Эти мотивы были произвольным образом лигированы друг с другом для создания библиотеки из 1200 первичных клонов, которые тестировали *in vitro* и *in vivo*. Наилучшие результаты показал промотор **SP-301** (рис. 5), который был активнее CMV-промотора в 6.6 раза спустя 2 дня после введения конструкции мышцам и сохранял активность на протяжении минимум месяца. Многие промоторы, более активные, чем CMV *in vitro*, имели меньшую активность по сравнению с этим промотором *in vivo*. Промотор SP-301 подтвердил свою тканевую специфичность в трансгенных мышцах. Проведенное исследование подтвердило успешность стратегии создания синтетических промоторов из комбинации TFBS, а также потенциальную важность использования не только мышечно-специфических TFBS, но и вирусных мотивов, способных значительно увеличить показатели экспрессии.

Другой успешный подход, который мы уже частично рассмотрели на примере промотора МНСК7 [29], предполагает создание гибридных промоторов. В работе, использующей эту стратегию, был проведен *in silico* анализ различных мышечно-специфических генов [30]. Выявлены четыре кластера, состоящие из комбинации сайтов связывания миогенных ТФ. Первым кластером был ранее рассмотренный энхансер гена десмина человека (-970...-826) [81], а остальные три были регионами энхансера (-1262... -1060), проксимального промотора (-358...+7) и первого интрона (+901...+995) гена *Skm* мышцы. **МН-промотор**, включающий в себя все четыре элемента, показал наилучшие результаты в культурах клеток, опередив

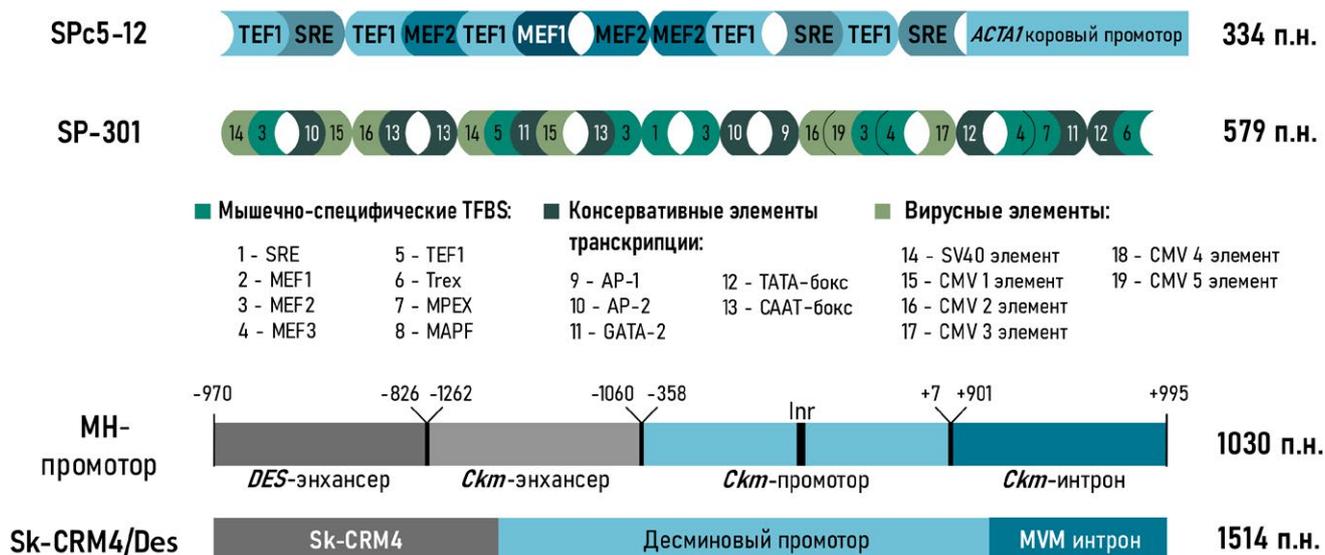


Рис. 5. Синтетические промоторы. Промотор SPc5-12 состоит из комбинации четырех мышечно-специфических TFBS: TEF1, SRE, MEF1 и MEF2, а также корового промотора – фрагмента промотора скелетного α -актина курицы. SP-301-промотор представляет комбинацию мышечно-специфических TFBS, вирусных элементов и консервативных *cis*-действующих элементов, сшитых в прямой и обратной ориентации. МН-промотор состоит из энхансера гена десмина человека, а также энхансера, корового промотора и первого интрона гена *Ckm* мыши. Sk-CRM4/Des представляет собой регуляторный модуль Sk-CRM4, сшитый с десминовым промотором, а также с интроном MVM

по уровню экспрессии в мышечных культурах клеток десминовый и CMV-промоторы, а также остальные гибридные промоторы. Интересно, что наибольший вклад в уровень экспрессии вносил интрон, в то время как удаление одного или двух энхансеров или даже корового промотора не приводило к значительному изменению уровня экспрессии. Для проверки активности гибридного промотора *in vivo* мышам внутривенно вводили AAV9, несущий репортерный ген под данным промотором. МН-промотор оказался более активным в сердце и скелетных мышцах, чем промоторы гена десмина и CMV, и при этом не приводил к экспрессии трансгена в печени [30].

Стратегию использования мышечно-специфических *cis*-регуляторных модулей (Sk-CRM) использовали в следующей статье [82]. В данной работе разметили TFBS на промоторах генов человека, активно экспрессирующихся в мышцах, и проанализировали, склонны ли они к образованию кластеров. Были сделаны множественные выравнивания таких кластеров разных видов животных с целью поиска консервативных фрагментов. Подразумевалось, что более консервативная комбинация регуляторных элементов наиболее эффективна для обеспечения высокой мышечно-специфической экспрессии. Было также проверено, относятся ли выбранные кластеры к открытым участкам хроматина, и по итогам всех манипуляций отобрано семь вариантов. По результатам анализа биолюминесценции выбран модуль

Sk-CRM4 (рис. 5), который в 200–400 раз усиливал работу промотора десмина в различных скелетных мышцах, диафрагме и сердце через 6 недель после системной доставки с помощью AAV9. При этом Sk-CRM4 был неактивен в немускельных органах. Позднее показали, что Sk-CRM4/Des в 25–173 раза эффективнее CMV-промотора в различных мышцах, а также эффективнее Sk-CRM4/SPc5-12 и SPc5-12. По итогам работы был создан чрезвычайно сильный промотор Sk-CRM4/Des, единственным недостатком которого была большая длина – около 1500 п.н.

Создание синтетических промоторов – очень перспективное направление, успешность которого определяется качеством биоинформатической работы и эффективным скринингом предложенных вариантов. Пополнение баз данных регуляторных элементов, обнаружение новых ТФ, совершенствование программ выявления промоторов безусловно будут способствовать развитию этого направления [73–75].

ДРУГИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКУЮ ЭКСПРЕССИЮ

Экспрессия генов интереса в нужном месте и в нужное время при разработке генотерапевтических препаратов рассматривается комплексно и зависит не только от активности промотора. На посттранскрипционном уровне многие факторы также оказывают влияние на экспрессию доставляемого гена.

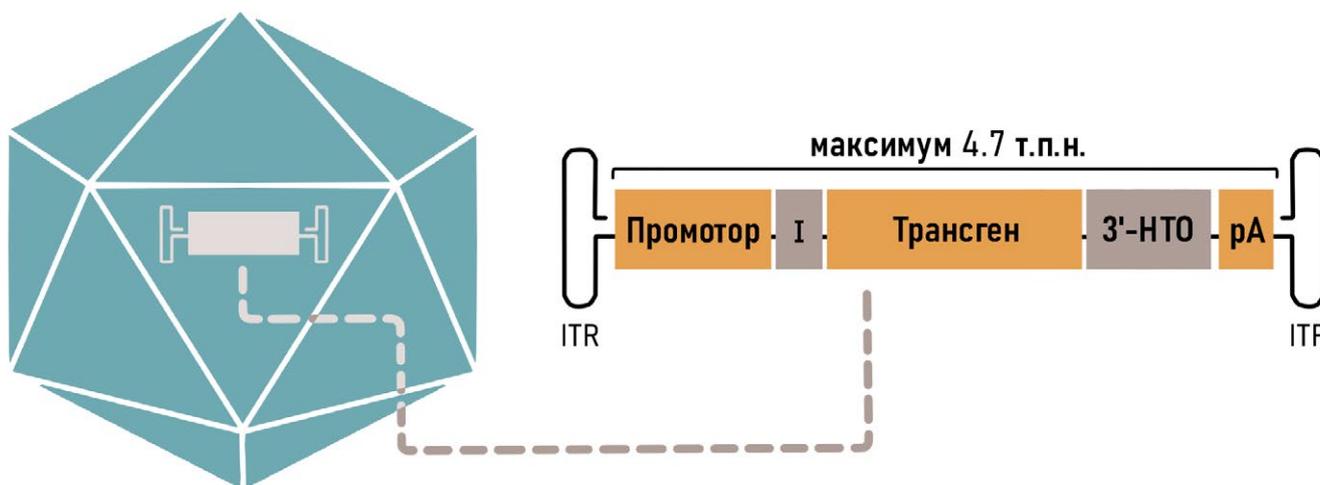


Рис. 6. Компоненты типичной кассеты AAV-вектора. Оранжевые блоки (промотор, трансген и сигнал полиаденилирования (pA)) являются обязательными компонентами кассеты. Для повышения эффективности экспрессии могут быть включены необязательные *cis*-регуляторные элементы, такие, как интрон (I), WPRE и сайты связывания микроРНК (3'-НТО). Кассета фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR)

Наличие интрона в векторе, который обычно помещают между промотором и кодирующей последовательностью, способно улучшить экспрессию целевого гена (рис. 6). Интрон повышает стабильность РНК в ядре благодаря включению в сплайсому [74], а также способствует эффективному экспорту сплайсированной мРНК из ядра в цитоплазму [83]. Интроны также могут содержать регуляторные последовательности, влияющие на тканевую специфичность экспрессии и ее уровень. Так, именно наличие интрона из гена *Skt* внесло наибольший вклад в уровень экспрессии трансгена, направляемой сконструированным химерным промотором [30]. При AAV-опосредованной доставке трансгена фактора свертывания крови IX MVM-интрон обеспечил повышение экспрессии более чем в 80 раз по сравнению с конструкцией без интрона [84].

Помимо промоторов к кассете в 3'-НТО для повышения экспрессии могут быть добавлены другие *cis*-регуляторные элементы (рис. 6). Так, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) длиной 600 п.н. в несколько раз улучшал экспрессию трансгена, доставленного с использованием AAV, в печени, мозге и мышцах мышей и крыс [85]. WPRE способствует экспорту мРНК из ядра, а также предотвращает сайленсинг на посттранскрипционном уровне [86].

К обеспечению тканевой специфичности можно подойти и с другой стороны, не только стимулируя экспрессию в целевых тканях, но и подавляя ее в нежелательных органах с помощью механизмов РНК-интерференции [74]. С этой целью в 3'-НТО-кассеты добавляют сайты связывания микроРНК, присутствующих строго в нецелевых органах (рис. 6) [87].

Если мРНК трансгена оказывается в нежелательном органе, то микроРНК связывается с комплементарными сайтами в транскрипте и запускает его деградацию [87].

Большую роль в доставке генетических конструкций в определенные органы и ткани играет также правильный выбор вирусного вектора. Помимо использования природных серотипов AAV, для улучшения целевой доставки модифицируют капсиды, создавая новые геноинженерные векторы [88]. Ведется поиск новых натуральных капсидов с улучшенным тропизмом к сердцу и скелетным мышцам [89]. В зависимости от способа введения препарата (внутривенный, внутримышечный и др.) паттерны экспрессии также будут отличаться [90].

Продуманная комбинация вышеперечисленных элементов в кассете, правильный выбор вектора и оптимальный способ введения генотерапевтического препарата могут существенно повысить экспрессию гена интереса, сохраняя при этом тканеспецифичность экспрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История поиска и создания мышечно-специфических промоторов для генной терапии насчитывает уже более 30 лет, и до сих пор работы в этом направлении не окончены. Так, размеры первых мышечно-специфических промоторов, представляющих собой фрагменты генов актина, десмина или мышечной креатинкиназы, превышали 1 т.п.н. Созданные позднее синтетические варианты, содержащие наиболее представленные TFBS из промоторов этих генов, были в несколько раз короче, но не уступали естественным аналогам по эффективности экспрессии [30, 71].

Факторы транскрипции позвоночных и их сайты связывания довольно консервативны, что показано в многочисленных работах [42, 72]. Благодаря такому консервативному составу промоторов в доклинических исследованиях для демонстрации эффективности генотерапевтических препаратов можно использовать различных модельных животных. Однако следует учесть, что активность промотора *in vitro* не всегда будет совпадать с его активностью *in vivo* [80].

Принимая во внимание гетерогенность генетических мышечных заболеваний, невозможно говорить об одном универсальном промоторе, который

можно использовать для разработки всех терапевтических векторов. Это связано, в первую очередь, с особенностями патогенеза, разными функциями белков, дефицит или дисфункция которых вызывают то или иное заболевание (таблица). При разных заболеваниях в большей степени поражаются разные группы мышц и типы мышечных волокон [14]. Накопленный опыт создания синтетических мышечных промоторов дает надежду на то, что исследователям удастся создать идеальные конструкции, чтобы симитировать уникальный профиль экспрессии мышечно-специфических белков и полностью восстановить утраченные функции. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Theadom A., Rodrigues M., Poke G., O'Grady G., Love D., Hammond-Tooke G., Parmar P., Baker R., Feigin V., Jones K., et al. // *Neuroepidemiology*. 2019. V. 52. № 3–4. P. 128–135.
- Shieh P.B. // *Neurol. Clin.* 2013. V. 31. № 4. P. 1009–1029.
- Anguela X.M., High K.A. // *Annu. Rev. Med.* 2019. V. 70. P. 273–288.
- Manso A., Hashem S., Nelson B., Gault E., Soto-Hermida A., Villarruel E., Brambatti M., Bogomolovas J., Bushway P., Chen C., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. P. eaax1744.
- Suzuki-Hatano S., Saha M., Soustek M.S., Kang P.B., Byrne B.J., Cade W.T., Pacak C.A. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 13. P. 167–179.
- Childers M.K., Joubert R., Poulard K., Moal C., Grange R.W., Doering J.A., Lawlor M.W., Rider B.E., Jamet T., Danièle N., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. № 220. P. 220ra10.
- Qiao C., Dai Y., Nikolova V.D., Jin Q., Li J., Xiao B., Li J., Moy S.S., Xiao X. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2018. V. 9. P. 47–56.
- Han S., Li S., Bird A., Koeberl D. // *Hum. Gene Ther.* 2015. V. 26. № 11. P. 743–750.
- Lostal W., Roudaut C., Faivre M., Karine C., Suel L., Bourg N., Best H., Smith J., Gohlke J., Corre G., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11. P. eaat6072.
- Gicquel E., Maizonnier N., Foltz S.J., Martin W.J., Bourg N., Svinartchouk F., Charton K., Beedle A.M., Richard I. // *Hum. Mol. Genet.* 2017. V. 26. № 10. P. 1952–1965.
- Malerba A., Klein P., Bachtarzi H., Jarmin S.A., Cordova G., Ferry A., Strings V., Espinoza M.P., Mamchaoui K., Blumen S.C., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14848.
- Marshall D.J., Leiden J.M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998. V. 8. № 3. P. 360–365.
- Janssen I., Heymsfield S.B., Wang Z.M., Ross R. // *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 2000. V. 89. № 1. P. 81–88.
- Gaina G., Budisteanu M., Manole E., Ionica E. // *Muscular Dystrophies*. 2019. doi: 10.5772/intechopen.85339
- Shirley J.L., de Jong Y.P., Terhorst C., Herzog R.W. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2020. V. 28. № 3. P. 709–722.
- Duan B., Cheng L., Gao Y., Yin F.X., Su G.H., Shen Q.Y., Liu K., Hu X., Liu X., Li G.P. // *Therigenology*. 2012. V. 78. № 4. P. 793–802.
- Разин С.В., Гаврилов А.А., Ульянов С.В. // *Молекуляр. биол.* 2015. Т. 49. № 2. С. 212.
- Haberle V., Stark A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 10. P. 621–637.
- Vo Ngoc L., Wang Y.-L., Kassavetis G.A., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 13. P. 1289–1301.
- Vo Ngoc L., Cassidy C.J., Huang C.Y., Duttke S.H.C., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 1. P. 6–11.
- Sainsbury S., Bernecky C., Cramer P. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 3. P. 129–143.
- Burke T.W., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. № 22. P. 3020–3031.
- Lim C.Y., Santos B., Boulay T., Dong E., Ohler U., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 13. P. 1606–1617.
- Deng W., Roberts S.G.E. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. № 20. P. 2418–2423.
- Maston G.A., Evans S.K., Green M.R. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006. V. 7. P. 29–59.
- Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R., Weirauch M.T. // *Cell*. 2018. V. 172. № 4. P. 650–665.
- Long H.K., Prescott S.L., Wysocka J. // *Cell*. 2016. V. 167. № 5. P. 1170–1187.
- Riethoven J.-J.M. // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*. 2010. V. 674. P. 33–42.
- Salva M.Z., Himeda C.L., Tai P.W., Nishiuchi E., Gregorevic P., Allen J.M., Finn E.E., Nguyen Q.G., Blankinship M.J., Meuse L., et al. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2007. V. 15. № 2. P. 320–329.
- Piekarczyk K., Bertrand A.T., Azibani F., Beuvin M., Julien L., Machowska M., Bonne G., Rzepecki R. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 15. P. 157–169.
- Himeda C.L., Chen X., Hauschka S.D. // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*. 2011. V. 709. P. 3–19.
- Somlyo A.V., Siegman M.J. // *Muscle*. Elsevier. 2012. V. 2. P. 1117–1132. doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00083-1
- Gunning P., Ponte P., Blau H., Kedes L. // *Mol. Cell. Biol.* 1983. V. 3. № 11. P. 1985–1995.
- Muscat G.E., Kedes L. // *Mol. Cell. Biol.* 1987. V. 7. № 11. P. 4089–4099.
- Brennan K.J., Hardeman E.C. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 1. P. 719–725.
- Crawford G.E., Faulkner J.A., Crosbie R.H., Campbell K.P., Froehner S.C., Chamberlain J.S. // *J. Cell Biol.* 2000. V. 150. № 6. P. 1399–1410.
- Glover L.E., Newton K., Krishnan G., Bronson R., Boyle A., Krivickas L.S., Brown R.H. // *Ann. Neurol.* 2010. V. 67. № 3. P. 384–393.
- Miniou P., Tiziano D., Frugier T., Roblot N., Le Meur M., Melki J. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 19. P. e27.
- Kimura E., Li S., Gregorevic P., Fall B.M., Chamberlain J.S. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 1. P. 206–213.
- Strimpakos G., Corbi N., Pisani C., Di Certo M.G., Onori A.,

- Luvisetto S., Severini C., Gabanella F., Monaco L., Mattei E., et al. // *J. Cell. Physiol.* 2014. V. 229. № 9. P. 1283–1291.
41. Hagstrom J.N., Couto L.B., Scallan C., Burton M., McClelland M.L., Fields P.A., Arruda V.R., Herzog R.W., High K.A. // *Blood.* 2000. V. 95. № 8. P. 2536–2542.
42. Petropoulos C.J., Rosenberg M.P., Jenkins N.A., Copeland N.G., Hughes S.H. // *Mol. Cell. Biol.* 1989. V. 9. № 9. P. 3785–3792.
43. Asante E.A., Boswell J.M., Burt D.W., Bulfield G. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. № 1. P. 59–66.
44. Hu Q., Tong H., Zhao D., Cao Y., Zhang W., Chang S., Yang Y., Yan Y. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2015. V. 20. № 1. P. 160–176.
45. Welle S., Bhatt K., Thornton C.A. // *Genome Res.* 1999. V. 9. № 5. P. 506–513.
46. Jaynes J.B., Chamberlain J.S., Buskin J.N., Johnson J.E., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1986. V. 6. № 8. P. 2855–2864.
47. Shield M.A., Haugen H.S., Clegg C.H., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 9. P. 5058–5068.
48. Amacher S.L., Buskin J.N., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 13. № 5. P. 2753–2764.
49. Donoviel D.B., Shield M.A., Buskin J.N., Haugen H.S., Clegg C.H., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 4. P. 1649–1658.
50. Hauser M.A., Robinson A., Hartigan-O'Connor D., Williams-Gregory D.A., Buskin J.N., Apone S., Kirk C.J., Hardy S., Hauschka S.D., Chamberlain J.S. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2000. V. 2. № 1. P. 16–25.
51. Molkentin J.D., Jobe S.M., Markham B.E. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996. V. 28. № 6. P. 1211–1225.
52. Wang B., Li J., Fu F.H., Chen C., Zhu X., Zhou L., Jiang X., Xiao X. // *Gene Ther.* 2008. V. 15. № 22. P. 1489–1499.
53. Martari M., Sagazio A., Mohamadi A., Nguyen Q., Hauschka S.D., Kim E., Salvatori R. // *Hum. Gene Ther.* 2009. V. 20. № 7. P. 759–766.
54. Gonçalves M.A., Janssen J.M., Nguyen Q.G., Athanasopoulos T., Hauschka S.D., Dickson G., de Vries A.A. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 7. P. 1331–1341.
55. Pozsgai E.R., Griffin D.A., Heller K.N., Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2017. V. 25. № 4. P. 855–869.
56. Potter R.A., Griffin D.A., Sondergaard P.C., Johnson R.W., Pozsgai E.R., Heller K.N., Peterson E.L., Lehtimäki K.K., Windish H.P., Mittal P.J., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. № 7. P. 749–762.
57. Duan D. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2018. V. 26. № 10. P. 2337–2356.
58. Hakim C.H., Wasala N.B., Pan X., Kodippili K., Yue Y., Zhang K., Yao G., Haffner B., Duan S.X., Ramos J., et al. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017. V. 6. P. 216–230.
59. Buckingham M. // *Trends Genet.* 1992. V. 8. № 4. P. 144–148.
60. Raguz S., Hobbs C., Yagüe E., Ioannou P.A., Walsh F.S., Antoniou M. // *Dev. Biol.* 1998. V. 201. № 1. P. 26–42.
61. Li Z.L., Paulin D. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 10. P. 6562–6570.
62. Li Z., Colucci E., Babinet C., Paulin D. // *Neuromuscul. Disord. NMD.* 1993. V. 3. № 5–6. P. 423–427.
63. Zhang G., Ludtke J.J., Thioudellet C., Kleinpeter P., Antoniou M., Herweijer H., Braun S., Wolff J.A. // *Hum. Gene Ther.* 2004. V. 15. № 8. P. 770–782.
64. Pacak C.A., Sakai Y., Thattaliyath B.D., Mah C.S., Byrne B.J. // *Genet. Vaccines Ther.* 2008. V. 6. P. 13.
65. Talbot G.E., Waddington S.N., Bales O., Tchen R.C., Antoniou M.N. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 3. P. 601–608.
66. Salabarria S.M., Nair J., Clement N., Smith B.K., Raben N., Fuller D.D., Byrne B.J., Corti M. // *J. Neuromuscul. Dis.* 2020. V. 7. № 1. P. 15–31.
67. Lee C.-J., Fan X., Guo X., Medin J.A. // *J. Cardiol.* 2011. V. 57. № 1. P. 115–122.
68. Müller O.J., Leuchs B., Pleger S.T., Grimm D., Franz W.-M., Katus H.A., Kleinschmidt J.A. // *Cardiovasc. Res.* 2006. V. 70. № 1. P. 70–78.
69. Schinkel S., Bauer R., Bekeredjian R., Stucka R., Rutschow D., Lochmüller H., Kleinschmidt J.A., Katus H.A., Müller O.J. // *Hum. Gene Ther.* 2012. V. 23. № 6. P. 566–575.
70. Robert M.-A., Lin Y., Bendjelloul M., Zeng Y., Dessolin S., Broussau S., Larochelle N., Nalbantoglu J., Massie B., Gilbert R. // *J. Gene Med.* 2012. V. 14. P. 746–760.
71. Li X., Eastman E.M., Schwartz R.J., Draghia-Akli R. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 3. P. 241–245.
72. Rudeck S., Etard C., Khan M.M., Rottbauer W., Rudolf R., Strähle U., Just S. // *Genesis.* 2016. V. 54. № 8. P. 431–438. doi: 10.1002/dvg.22953
73. Aysha J., Noman M., Wang F., Liu W., Zhou Y., Li H., Li X. // *Mol. Biotechnol.* 2018. V. 60. № 8. P. 608–620.
74. Domenger C., Grimm D. // *Hum. Mol. Genet.* 2019. V. 28. № R1. P. R3–R14.
75. Boeva V. // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 24.
76. Le Guiner C., Servais L., Montus M., Larcher T., Fraysse B., Moulec S., Allais M., François V., Dutilleul M., Malerba A., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 16105.
77. Colella P., Sellier P., Costa Verdera H., Puzzo F., van Wittenbergh L., Guerchet N., Daniele N., Gjata B., Marmier S., Charles S., et al. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 12. P. 85–101.
78. Escobar H., Schöwel V., Spuler S., Marg A., Izsvák Z. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2016. V. 5. P. e277.
79. Khan A.S., Draghia-Akli R., Shypailo R.J., Ellis K.I., Mersmann H., Fiorotto M.L. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 2. P. 327–333.
80. Liu Y., He Y., Wang Y., Liu M., Jiang M., Gao R., Wang G. // *Plasmid.* 2019. V. 106. P. 102441.
81. Li H., Capetanaki Y. // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 15. P. 3580–3589.
82. Sarcar S., Tulalamba W., Rincon M.Y., Tipanee J., Pham H.Q., Evens H., Boon D., Samara-Kuko E., Keyaerts M., Loperfido M., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 492–510.
83. Crane M.M., Sands B., Battaglia C., Johnson B., Yun S., Kaeberlein M., Brent R., Mendenhall A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 9192. doi: 10.1038/s41598-019-45517-0
84. Wu Z., Sun J., Zhang T., Yin C., Yin F., van Dyke T., Samulski R.J., Monahan P.E. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2008. V. 16. № 2. P. 280–289.
85. Wang L., Wang Z., Zhang F., Zhu R., Bi J., Wu J., Zhang H., Wu H., Kong W., Yu B., et al. // *Int. J. Med. Sci.* 2016. V. 13. № 4. P. 286–291.
86. Powell S.K., Rivera-Soto R., Gray S.J. // *Discov. Med.* 2015. V. 19. № 102. P. 49–57.
87. Geisler A., Fechner H. // *World J. Exp. Med.* 2016. V. 6. № 2. P. 37–54.
88. Büning H., Srivastava A. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 12. P. 248–265.
89. Bello A., Chand A., Aviles J., Soule G., Auricchio A., Kobinger G.P. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. № 1. P. 1–11.
90. Fumoto S., Kawakami S., Hashida M., Nishida K. // *Nov. Gene Ther. Approaches.* 2013. V. 1. P. 5–12.