

УДК 616.24-003.4 (056.7) : 577.21

Генная терапия муковисцидоза: достижения и перспективы

М. А. Ломунова*, П. М. Гершович

АО «БИОКАД», Санкт-Петербург, 198515 Россия

*E-mail: lomunova@biocad.ru

Поступила в редакцию 22.03.2023

Принята к печати 22.05.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11708

РЕФЕРАТ Одним из современных подходов к терапии наследственных заболеваний, вызванных дефицитом того или иного гена в организме, является заместительная генная терапия, которая заключается в том, что функциональную копию гена вводят в клетки и ткани с помощью различных систем доставки. С этой целью могут использоваться как вирусные частицы, несущие в себе целевой транскрипт, так и различные невирусные методы доставки генетического материала с помощью липосом, наночастиц и др. В представленном обзоре рассмотрены молекулярно-генетические механизмы и типы генетических мутаций, приводящие к возникновению муковисцидоза, а также описаны современные подходы к генной терапии муковисцидоза, которые потенциально могут применяться для коррекции этих мутаций и восстановления нормального функционирования белка-переносчика ионов натрия и хлора в клетках эпителия дыхательной системы. Восстановление экспрессии этого белка приведет к нормализации трансмембранного транспорта этих ионов и воды, а следовательно, и к снижению вязкости поверхностной жидкости дыхательных путей – одного из патологических проявлений этого заболевания. Также обсуждаются результаты доклинических и клинических исследований различных генотерапевтических препаратов, что позволяет сделать выводы о возможных перспективах применения генной терапии при муковисцидозе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА генная терапия, муковисцидоз, CFTR, вирусный вектор, наночастицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МВТР (CFTR) – трансмембранный регулятор муковисцидоза; НСД – нуклеотид-связывающий домен; ТМ – трансмембранный; МСС – мукоцилиарный клиренс; КИ – клинические исследования; Ad – аденовирус (Adenovirus); AAV – аденоассоциированный вирус (Adeno-Associated Virus); LV – лентивирус (Lentivirus); LNP – липосомные наночастицы (Liposomal NanoParticles); FDA – Food and Drug Administration.

ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз, или кистозный фиброз (CF, cystic fibrosis), – одно из наиболее распространенных моногенных заболеваний. Кистозный фиброз – системное врожденное заболевание, которое вызывается мутациями в гене, кодирующем белок-регулятор трансмембранной проводимости (МВТР) [1]. В основе молекулярного механизма патогенеза заболевания лежит дисфункция или полное отсутствие кодируемого геном CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) белка-переносчика ионов натрия и хлора. Этот ионный канал обеспечивает нормальное функционирование клеток эпителия в легких, кишечнике, поджелудочной железе и некоторых других органах. МВТР регулирует перенос ионов натрия и хлора через мембрану, а также водный обмен в клетках секреторного эпителия в различных системах организма: дыхательной, желудочно-кишечной, гепатобилиарной и репродуктивной

[2, 3]. Нарушение функций этого белка приводит к развитию тяжелой прогрессирующей патологии, которая клинически проявляется поражением легких (дыхательная недостаточность), поджелудочной железы и печени (в тяжелых случаях возможно развитие цирроза), а также повышением концентрации электролитов в потовом секрете.

Различают несколько форм муковисцидоза: в 75–80% случаев встречается смешанная (легочно-кишечная), в 15–20% случаев диагностируют легочную форму и в 5% случаев – кишечную. Наиболее тяжелой считается смешанная форма муковисцидоза, поскольку она включает в себя клинические проявления как легочной, так и кишечной форм. Помимо этого, относительно редко также могут наблюдаться мекониальная кишечная непроходимость (15–20% случаев), отечно-анемическая, цирротическая и другие формы. Тем не менее, необходимо учитывать, что о таком делении на раз-

личные формы муковисцидоза можно говорить только условно, поскольку при выраженном поражении респираторного тракта обычно имеются также и нарушения органов пищеварения. То же самое происходит и при кишечной форме муковисцидоза – наряду с поражением кишечника развивается и поражение бронхолегочной системы. Основные осложнения, к которым может приводить муковисцидоз: легочные и желудочные кровотечения, кишечная непроходимость, гиперактивность бронхов, отеки, абсцессы, пневмо- и пиопневмоторакс, «легочное сердце», гайморит, цирроз печени, выпадение прямой кишки, задержки в развитии, бесплодие, сахарный диабет и др. [2].

По статистике в России ежегодно рождается примерно 650 человек с диагнозом муковисцидоз [4], при этом в мире соотношение составляет один новорожденный с муковисцидозом на 2000–5000 здоровых детей. В США и Европе на данный момент насчитывается около 70000 больных муковисцидозом [5]. У мужчин и женщин заболевание встречается с одинаковой частотой. Диагноз муковисцидоз обычно ставится в первые годы жизни ребенка, поскольку поражение всех органов (особенно легких и кишечника) становится очевидным уже на ранних этапах развития. У больных наблюдаются множественные нарушения почти всех систем организма: дыхательной, пищеварительной, опорно-двигательной, нервной, сердечно-сосудистой и др. У 85–90% пациентов наблюдается экзокринная недостаточность поджелудочной железы (дисфункция протоков). Средняя продолжительность жизни больных может составлять 30–40 лет, при этом качество жизни напрямую зависит от объема специализированной помощи и симптоматического лечения. Несмотря на это, до 90% больных муковисцидозом умирают от легочных инфекций и связанных с ними осложнений [3].

Поскольку причиной муковисцидоза является мутация в гене *CFTR*, полностью вылечить эту болезнь имеющимися в арсенале современной медицины методами невозможно. До последнего времени лечение муковисцидоза было исключительно симптоматическим: разжижение слизи (муколитики), расширение бронхов, противовоспалительная терапия, антибактериальная терапия, а также заместительная терапия с помощью ферментов (при кишечной форме заболевания). Все эти меры не позволяли увеличить продолжительность жизни и лишь на какое-то время улучшали качество жизни пациентов [6]. Появление препаратов-модуляторов МВТР (Vertex Pharmaceuticals) для патогенетической терапии существенно увеличило продолжительность жизни больных муковисцидозом, однако этот подход также

не устраняет причину заболевания, обрекая пациентов на дорогостоящую пожизненную терапию.

В свою очередь, использование методов генной терапии, направленной на восстановление функционирования гена *CFTR* в эпителиальных клетках, открывает новые перспективы в лечении муковисцидоза наряду с другими тяжелыми наследственными заболеваниями, где генная терапия уже показала свою эффективность и безопасность. Быстрое развитие технологий геномного редактирования дает возможность надеяться на развитие этиотропной терапии, позволяющей скорректировать мутацию *CFTR*, которая является причиной заболевания, и тем самым улучшить качество и продолжительность жизни больных муковисцидозом.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

МВТР – трансмембранный белок, локализованный на апикальной поверхности эпителиальных клеток. Связывание этого белка с АТФ приводит к изменению его конформации внутри белка канала, позволяющего ионам Cl^- выходить из клетки наружу. Окончание гидролиза АТФ приводит, в свою очередь, к закрытию канала (рис. 1).

Известно, что для поддержания нормального осмотического давления и циркуляции жидкости в межклеточном пространстве вблизи внешней мембраны клеток должны находиться ионы натрия и хлора. При этом одним из условий, необходимых для функционирования клеток эпителия легких, кишечника, потовых желез и других органов, является постоянный контролируемый ток ионов хлора через мембрану. Нарушение переноса ионов хлора через мембрану клеток приводит к изменению ее проницаемости для молекул воды и, таким образом, к дегидратации, что вызывает повышение вязкости выделяемого секрета. Поэтому при муковисцидозе в первую очередь поражаются именно эти органы: на поверхности эпителия образуется густой вязкий секрет, который забивает бронхолегочные пути и протоки желез, нарушая таким образом нормальное функционирование органов [2].

Секреция и абсорбция – два противоположных процесса транспорта электролитов, которые регулируют вязкоупругие свойства жидкой составляющей секретов экзокринных органов. Согласно накопленным данным, нарушение транспорта электролитов при муковисцидозе происходит на обоих уровнях: как на уровне абсорбции соли, так и на уровне абсорбции жидкости и ее секреции, опосредованной анионами [8]. При понижении концентрации ионов хлора в межклеточном пространстве происходит активация эпителиального натриевого канала ENaC

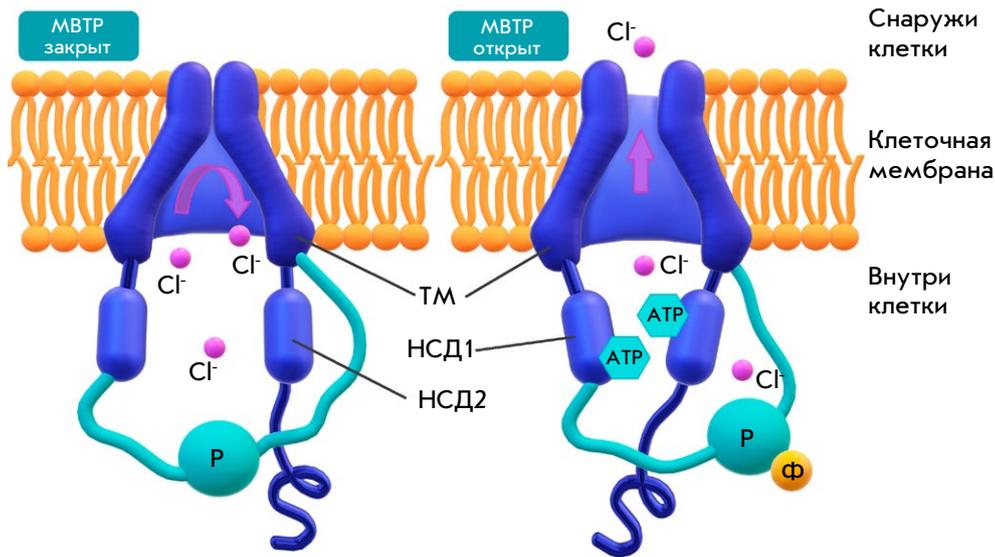


Рис. 1. Схематическое представление структуры белка МВТР в закрытом и открытом положениях. ТМ – трансмембранные домены, формирующие канал для транспорта ионов Cl⁻. НСД1 и НСД2 – нуклеотид-связывающие внутриклеточные домены 1 и 2. Р – регуляторный домен с сайтами фосфорилирования (Ф). Для активации канала необходим остаток фосфорной кислоты на регуляторном домене. Открытие канала происходит посредством взаимодействия с трансмембранными доменами при связывании и гидролизе АТФ внутриклеточными доменами НСД1 и НСД2 [7]

(epithelial sodium channel), что приводит к увеличению концентрации Na в клетке (рис. 2). Это, в свою очередь, приводит к усилению абсорбции ионов Cl⁻ и воды и нарушению трансэпителиальной электрической разности потенциалов. В результате уменьшается объем жидкости на поверхности дыхательных путей, существенно увеличивается ее вязкость и резко снижается уровень клиренса на поверхности реснитчатого эпителия (рис. 2). В легких такие процессы приводят к обезвоживанию дыхательных путей и, соответственно, к снижению очищающей активности ресничек и слизистой оболочки в целом. Помимо этого, застой слизи также способствует быстрому развитию инфекции [9].

Выделяемый секрет представляет собой полимерную сетку, состоящую из О-гликозилированных гликопротеинов (муцинов), секретируемых в виде нитей и формирующих пористую структуру [11, 12]. Вязкоупругие свойства секрета и его структура в нормальном физиологическом состоянии адаптированы таким образом, чтобы улавливать и удалять вдыхаемые частицы и бактерии. При муковисцидозе повышенная вязкость секрета приводит к формированию бляшек муцина и уменьшению размера пор. В норме диаметр пор в секрете составляет 0.2–1 мкм, а при патологии не превышает 0.1 мкм. Это приводит к тому, что нейтрофилы, обеспечивающие первую линию защиты иммунной системы бактерий, не могут мигрировать сквозь слой слизи. При этом на уплотненной слизи бактерии формируют макроколонии, которые особенно устойчивы к действию иммунной системы и антибиотиков, что еще больше осложняет терапию [13].

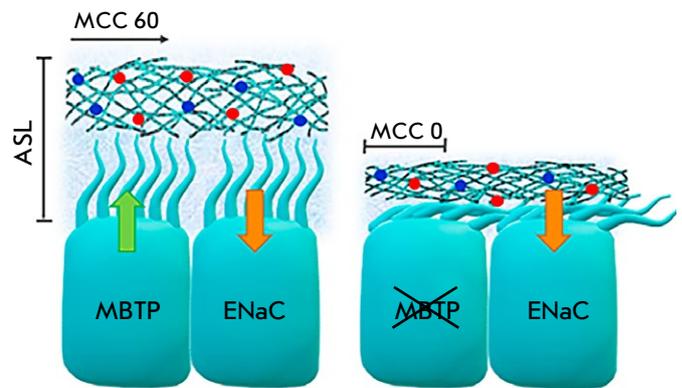
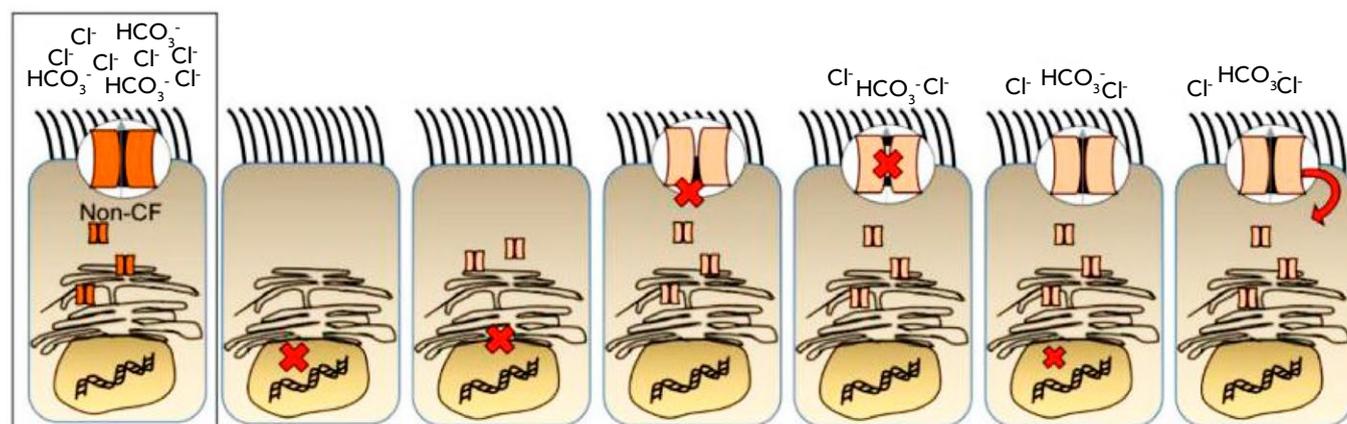


Рис. 2. Толщина слизистого слоя (ASL, airway surface liquid) в дыхательных путях в физиологическом состоянии (слева) зависит от нормального функционирования каналов МВТР и ENaC. MCC – мукоцилиарный клиренс или, другими словами, скорость очистки дыхательных путей посредством движения слизи по поверхности эпителия (в мкм/с). В случае нарушения работы МВТР при муковисцидозе (справа) из-за дефектного МВТР снижение количества ионов хлора приводит к избыточному транспорту ионов натрия, что приводит к осушению поверхности эпителия дыхательных путей, увеличению вязкости секрета и слипанию ресничек. При этом неподвижность секрета также вызывает воспалительную реакцию, вызванную размножением в нем патогенных микроорганизмов [9, 10]

Хронические инфекции, вызванные беспрепятственным размножением бактерий на поверхности дыхательных путей, считаются основной причиной смертности при муковисцидозе [14].



Класс мутации	I	II	III	IV	V	VI
Дефект белка	Нарушен синтез белка	Нарушен транспорт белка на мембрану	Нарушено открытие канала	Снижена проводимость канала	Снижено количество белка	Белок не стабилен
Наиболее частая мутация	G542X	F508del	G551D	R117H	3489+10kb C>T	4326delTC
% больных с хотя бы одной мутацией	22	88	6	6	5	5
Терапия	–	VX-809, VX-661	VX-770	–	–	–

Рис. 3. Типы мутаций МВТР и терапевтические препараты, одобренные FDA, для коррекции состояний, обусловленных этими мутациями. Больные муковисцидозом могут иметь более одной мутации. Адаптировано из [23]

МУТАЦИИ ГЕНА *CFTR*

Муковисцидоз – это ауточномное рецессивное заболевание, вызванное мутациями в гене *CFTR*, идентифицированном в 1989 году группой исследователей под руководством Lap-Chee Tsui [15, 16]. Ген *CFTR* расположен на хромосоме 7, он состоит из 27 экзонов и кодирует белок из 1480 аминокислотных остатков. На данный момент описано более 2000 мутаций в гене *CFTR*, и список мутаций постоянно пополняется, но только 250–300 из них приводят к развитию патологии, причем только 20 из этих мутаций встречаются достаточно часто (более чем у 0.1% больных) [17]. Выделяют пять классов мутаций (некоторые ученые выделяют семь) в соответствии с типом дефекта, который они вызывают (рис. 3). Мутации I–III классов (так называемые тяжелые) ассоциированы с более глубоким нарушением функций МВТР, IV–V классы (мягкие) ассоции-

рованы с сохранением остаточной функции белка МВТР [18]. Разные мутации гена *CFTR* могут приводить к нарушению синтеза, процессинга, стабильности и функционирования белка МВТР, а также его внутриклеточного транспорта из эндоплазматического ретикулума до комплекса Гольджи и деградации, что приводит к разнообразным фенотипическим проявлениям [19].

Мутации класса I

Мутации класса I (G542X, W1282X, R553X, 2143delT, 1677delTA) обнаруживают примерно у 10% пациентов с муковисцидозом. Если ген содержит мутацию этого класса, то белок МВТР не синтезируется или синтезируется его укороченный вариант, который подвергается деградации. К мутациям этого класса относятся нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания и мутации участка сплайсинга,

приводящие к образованию стоп-кодона, преждевременной терминации синтеза белка и образованию фрагмента, который не может выполнять функции изначально синтезируемого белка [19].

Мутации класса II

Миссенс-мутации класса II считаются наиболее распространенными у пациентов с муковисцидозом (del F508, del I 507, N1303 K, S541 I, S549 R). Среди мутаций II класса самой частой является F508del – делеция остатка фенилаланина в положении 508. Примерно 70% пациентов содержат мутацию в обеих копиях гена *CFTR* (гомозиготы), у 90% пациентов присутствует хотя бы один мутантный аллель [20]. Наиболее тяжелое течение заболевания наблюдается у гомозиготных пациентов, при этом у гетерозигот *CFTR*-F508del с одной нормальной копией гена отсутствуют признаки заболевания.

Мутация F508del вызывает неправильное сворачивание (фолдинг) белка и последующий его процессинг, в результате чего большинство мутантных молекул не достигает клеточной мембраны и уничтожается. Необходимо отметить, что около 1% таких молекул все же способны достигать клеточной поверхности, но, поскольку мутация нарушает подвижность доменов, необходимых для открывания и закрывания канала, эффективность функционирования белка остается очень низкой [21]. Кроме того, в течение нескольких минут белок удаляется с поверхности и уничтожается [22].

Мутации класса III

Примерно у 4–5% пациентов с муковисцидозом встречаются также миссенс-мутации III класса (G551 D, G1224 E, S1255 P), которые приводят к нарушению регуляции открытия ионного канала. Белок с такой мутацией достигает апикальной мембраны, но проводимость и проницаемость канала нарушаются. Среди мутаций этого класса наиболее распространена замена остатка глицина в положении 551 домена NBD1 на аспарагиновую кислоту (G551D). Эта мутация приводит к тому, что канал остается преимущественно закрытым [19, 21].

Мутации IV класса

Мутации класса IV встречаются наиболее редко (около 1.7%). Эти мутации (R117H, R334W, R347P) снижают транспорт ионов хлора через открытый канал МВТР [9]. Эти мутации приводят к замене положительно заряженных остатков аргинина в канале МВТР на незаряженные остатки (предполагается, что для транспорта через канал ионов Cl⁻ необходимо наличие в нем положительных зарядов). У пациентов с мутациями этого класса наблюдает-

ся, как правило, легкое течение болезни, чаще всего без легочных и панкреатических проявлений.

Мутации класса V–VI

В некоторых случаях клиницисты также выделяют мутации классов V–VI, при которых функциональный белок МВТР продуцируется, однако наблюдается замедление синтеза этого белка и его быстрое удаление с поверхности клеток, в результате чего клетки содержат недостаточное количество белка. Мутации этого класса приводят к сравнительно легкому течению заболевания [17].

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

На сегодняшний день FDA (*Food and Drug Administration*) одобрена схема терапии муковисцидоза с использованием малых молекул, которые способствуют поддержанию нормального функционирования хлорных каналов (модуляторы МВТР). Препараты под торговыми марками Kalydeco (VX-770), Orkambi (VX-809), Symdeco (VX-661) разработаны американской компанией Vertex Pharmaceuticals (рис. 3). Препарат Калидеко /Kalydeco (ивакафтор / ivacaftor) одобрен в США, Канаде и ЕС для лечения муковисцидоза у пациентов старше 6–12 месяцев, содержащих одну из 10 мутаций в гене *CFTR* (G551D, S1255P, G178R, S549N, G1244E, S1251N, G1349D, S549R, G551S или R117H). Препарат Оркамби/ Orkambi (лумакафтор + ивакафтор / lumacaftor + ivacaftor) применяется для лечения пациентов старше 12 лет с двумя копиями мутации F508del в гене *CFTR*. Симдеко/ Symdeco (тезакафтор + ивакафтор / tezacaftor + ivacaftor) предназначен для лечения пациентов старше 6 лет. В ходе скрининга на клетках эпителия бронхов пациентов, гомозиготных по мутации *CFTR*-F508del, установлено, что Симдеко в сочетании с ивакафтором повышает транспорт хлорида до уровня 15.7% от нормы. Это очень дорогие препараты (от 1 млн рублей за 1 упаковку), которые не обеспечивают полного излечения, т.е. оказывают только поддерживающий эффект. Тем не менее, благодаря этой терапии за последнее время достигнут значительный прогресс: средняя продолжительность жизни больных с муковисцидозом возросла более чем в 2 раза.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

Открытие модуляторов МВТР, корректирующих работу дефектного белка, улучшило качество и продолжительность жизни, а также дало надежду большому количеству больных муковисцидозом. Однако примерно 10% пациентов к модуляторам МВТР невосприимчивы, поскольку у них МВТР

Таблица 1. Некоторые КИ генной терапии муковисцидоза*

Способ доставки гена <i>CFTR</i>	Метод	Клинические исследования	Ссылка
Аденовирус (Ad)	Назальное введение, эндобронхиальное введение	NCT00004779 NCT00004287	[26–29]
Аденоассоциированный вирус (AAV)	Введение в гайморовы пазухи, назальное введение, эндобронхиальное введение	NCT00073463 NCT00004533	[30–32]
Лентивирус (LV)	Интраназальное введение (перфузия)	Подготовка КИ	[33]
Наночастицы (липосомы), синтетические полимеры	Аэрозольное посредством небулайзера, интраназальное	NCT01621867 NCT00789867 NCT00004471 NCT00004806	[34–38]
Одноцепочечный антисмысловый РНК-олигонуклеотид (QR-010)	Интраназально	NCT02564354 NCT02532764	[39]

*Все КИ завершены.

либо вовсе не синтезируется, либо синтезируется на слишком низком уровне. Кроме того, по данным клинических исследований (КИ), 10–20% больных муковисцидозом обладают индивидуальной непереносимостью препаратов-модуляторов [24].

Поэтому в настоящее время разрабатываются новые подходы к лечению муковисцидоза, в частности, основанные на методах генной терапии, с помощью которых нуклеиновые кислоты доставляют в клетки больного с целью воздействия на первичную (генетическую) причину патологии и, таким образом, на течение болезни. Несмотря на то что муковисцидоз поражает многие органы, основным объектом генной терапии этого заболевания являются легкие, поскольку летальный исход в 90–95% случаев связан именно с тяжелым поражением легких. Основная стратегия генной терапии муковисцидоза предполагает доставку гена *CFTR* в эпителиальные клетки дыхательных путей больных. При этом при выборе способа доставки гена в клетки необходимо учитывать, что присутствие густого секрета в бронхиолах значительно снижает эффективность введения гена с помощью аэрозоля. Этот секрет накладывает дополнительные ограничения на проведение генной терапии, поскольку используемый вектор должен не только приводить к эффективной экспрессии функционального белка *CFTR*, но и обладать способностью проникать в клетки подслизистых желез и в поверхностный эпителий слизистой оболочки, покрытой плотным слоем секрета [2].

Начиная с 1993 года, проводятся КИ генотерапевтических препаратов, в которых целевые гены доставляют в эпителий носовых и бронхиальных дыхательных путей больных муковисцидозом с использованием как вирусных, так и невирусных систем. На сегодняшний день всего проведено более 27 КИ генной терапии муковисцидоза, в которые

были вовлечены более 600 пациентов, однако все они по той или иной причине пока не имели значительных успехов (табл. 1).

Необходимо отметить, что постоянное обновление эпителия дыхательных путей делает необходимой повторную доставку целевого трансгена в клетки. Это ограничивает использование систем на основе вирусных векторов, так как их повторное введение часто вызывает иммунный ответ и элиминацию векторов. Кроме того, недостаток подходящих *in vivo* моделей для тестирования эффективности новых векторов также сдерживает развитие исследований в данном направлении. Поэтому, несмотря на первоначальный энтузиазм, до сих пор нет ни одного одобренного FDA метода генной терапии муковисцидоза [25]. Тем не менее, усовершенствование технологий создания новых векторов, понимание особенностей разных серотипов векторов и создание новых *in vivo* моделей муковисцидоза дают надежду на разработку более эффективных способов генной терапии муковисцидоза [5].

Доставка трансгена с помощью векторов на основе аденовируса (Ad)

Первые КИ генной терапии муковисцидоза были направлены на использование Ad для доставки нормальной копии гена в клетки эпителия дыхательных путей (табл. 1). С использованием первого поколения Ad проведено два КИ [26–28, 40, 41], однако, несмотря на эффективность данного подхода на клеточных моделях и *in vivo*, результаты КИ поставили под вопрос безопасность применения этих векторов у человека. Врожденный и клеточный иммунитет препятствовали достижению долгосрочного эффекта при использовании векторов на основе аденовируса: наблюдалось увеличение альвеолярного воспаления наряду с повышением содержания

серотип-специфических нейтрализующих антител, что делало неэффективным повторное введение вирусных частиц [23].

Впоследствии для доставки трансгена использовали улучшенную Ad-платформу – хелперзависимый аденовирус (HD-Ad) с удаленными вирусными генами, что позволило устранить Т-клеточный ответ на вирусный белок, который наблюдался у Ad-векторов первого поколения. Тем не менее, оставалось присутствие адаптивного иммунного ответа CD8⁺ Т-клеток через презентацию HD-Ad-эпитопов дендритными клетками [42].

В легких HD-Ad использовали с применением лизофосфатидилхолина (LPC) для разрушения толстого слоя секрета и улучшения доступа к базолатеральной поверхности клеток, необходимой для инфекции. Посредством этой стратегии достигнута более длительная экспрессия трансгена *in vivo* по сравнению с первым поколением Ad, а также продемонстрирован эффективный перенос гена в дыхательные пути мышей, свиней и хорьков [43, 44].

Один из вариантов модификации Ad-платформы – использование транспозонов piggyBac, которые обеспечивают перенос гена посредством механизма «cut and paste» («вырезание и вставка»). Опосредованная транспозазой piggyBac-вставка в рекомбинантный Ad привела к созданию гибридного вектора piggyBac/Ad, использование которого позволило эффективно экспрессировать трансген в легких свиней [45].

Еще один подход к терапии муковисцидоза, который еще только предстоит подробно исследовать, – использование таких инструментов геномного редактирования, как TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9. Эти появившиеся относительно недавно молекулярные методы редактирования генома уже показали свою эффективность и надежность [46]. Относительная безопасность и значительная емкость капсида векторов HD-Ad (36 т.п.н.) позволяют доставлять одновременно несколько конструкций, что дает возможность использования сайт-специфических нуклеаз для прицельного встраивания доставляемого гена строго в необходимый локус. Такая специфическая вставка нормальной копии гена в конкретный локус вместо коррекции мутированного белка дает преимущество с точки зрения возможности терапии муковисцидоза независимо от типа мутации гена *CFTR*. Один из примеров использования этого подхода приведен в работе Emily Xia и соавт. [47], в которой экспрессионную кассету с геном *CFTR* встроили в локус *AAVS1 in vitro* с помощью вектора HD-Ad, несущего также нуклеазу TALEN.

В клетках, трансдуцированных вектором с этой кассетой, детектировали экспрессию мРНК белка МВТР и восстановление функций этого белка [47]. Похожий подход применен *in vitro* и *in vivo* с использованием HD-Ad-вектора для точной доставки CRISPR/Cas9 и копии ДНК в локус GGTA1 генома эпителиальных клеток дыхательных путей свиньи. Показано, что трансдуцированные клетки экспрессировали функциональный МВТР на уровне мРНК и на уровне белка как *in vitro*, так и в моделях *in vivo*. Также для оценки экспрессии белка МВТР после трансдукции с помощью CRISPR/Cas9 создана генно-инженерная клеточная линия *CFTR*^{-/-} эпителия свиней. Измерение активности канала МВТР в трансдуцированных *CFTR*^{-/-} клетках показало восстановление функции анионного транспорта [48, 49]. Эти данные предполагают появление нового подхода к генной терапии муковисцидоза с использованием нуклеаз уже в ближайшем будущем.

Доставка с помощью аденоассоциированных (AAV) векторов

Замена мутированного варианта гена белка МВТР его функциональной копией оказалась довольно сложной задачей, поэтому после неудачи с Ad-векторами первого поколения начался поиск альтернативных вариантов системы доставки трансгена в целевые клетки. Отчеты о проведенных КИ с использованием вектора AAV2 (табл. 1) показывают, что введение вектора в легкие больных муковисцидозом не вызывало значимых побочных эффектов, однако эффективность вызывала разочарование: ни одно из КИ не показало значимой экспрессии МВТР или коррекции патологических проявлений муковисцидоза. Причинами отсутствия положительного результата могли стать недостаточная эффективность встройки трансгена (что может быть связано с невозможностью проникновения вирусных частиц через плотный слой секрета в дыхательных путях), недостаточная сила промотора в составе экспрессионной кассеты или иммунный ответ хозяина на введение вирусного вектора [50]. Поэтому в последние годы велись работы, направленные на улучшение тропизма AAV-векторов, поиска новых серотипов, новых промоторов, путей усиления экспрессии целевого белка и персистенции в легких, также подходов к снижению иммуногенности. Одновременно с этим шло развитие релевантных *in vivo* моделей, включающих свиней [51], овец [52], хорьков [53] и мышей [54], которые, наряду с традиционными *in vitro* тестами на эпителиальных клетках человека, позволили бы проводить более эффективные доклинические исследования генной терапии муковисцидоза.

Например, с помощью *in vivo* селекции был отобран AAV-вирус с высоким тропизмом к эпителию дыхательных путей свиней [51]. Усовершенствованный капсид AAV2H22 на основе AAV2 с пятью точечными мутациями приводил к 240-кратному увеличению эффективности специфического инфицирования эпителия дыхательных путей свиней. Одним из основных параметров оценки фенотипической эффективности терапии является транспорт Cl⁻. Введение AAV2H22-MBTP в дыхательные пути CFTR-null свиней, у которых отсутствовал функциональный ген *CFTR*, обеспечивало экспрессию MBTP в клетках эпителия, восстановление анионного транспорта, нормализацию pH секрета на поверхности дыхательных путей и его бактерицидных свойств [51].

Эффективность экспрессии трансгена повышали также с использованием AAV-вектора, содержащего ген укороченного белка CFTRDR под коротким цитомегаловирусным промотором CMV173. Трансдукция клеточных органоидов препаратом AAV-CFTRDR приводила к восстановлению функции MBTP. При этом также регистрировались изменения разности потенциалов на мембране клеток эпителия носовых дыхательных путей, что свидетельствовало о восстановлении нормального фенотипа у мышей, несущих самую распространенную при муковисцидозе мутацию ΔF508 [54]. Другой вариант решения проблемы ограниченного размера генетической конструкции, которая может быть упакована в AAV2, – создание короткого синтетического промотора [55] или получение гена *CFTR* с частичной делецией регуляторного домена [56].

Помимо этого, протестирован новый химерный вектор AAV2/HBoV1, полученный путем псевдотипирования: переноса генома AAV2 в капсид HBoV1 – респираторного бокавируса человека, который инфицирует дыхательные пути человека и обладает высоким тропизмом к апикальной поверхности клеток эпителия дыхательных путей человека [57]. Также это привело к увеличению емкости капсида, что позволило использовать более сильный промотор и полноценный ген *CFTR* [58]. Способность rAAV2/HBoV1 трансдуцировать клетки легочного эпителия хорьков (*Mustela putorius furo*) позволила создать *in vivo* модели для проведения доклинических исследований [53].

Тестирование девяти охарактеризованных серотипов AAV-векторов на эпителиальных клетках и на легких мышей привело к идентификации вектора AAV6 с наибольшим тропизмом к клеткам легочного эпителия мыши и человека [59, 60]. Показано, что эффективность трансдукции эпителиальных клеток дыхательных путей мыши AAV6

достигала 80%, при этом данный серотип обладал меньшей иммуногенностью по сравнению с AAV2-векторами, что делает AAV6 одним из наиболее предпочтительных векторов для генной терапии муковисцидоза и других легочных заболеваний [61]. Кроме того, с целью дальнейшего повышения эффективности трансдукции эпителиальных клеток вектором AAV6 ввели точечную мутацию в гене, кодирующем один из атипичных аминокислотных остатков F129, который обычно присутствует в составе белка капсида. Результирующий вектор AAV6.2 показал более высокую эффективность трансдукции как в клетках дыхательных путей мыши, так и в культурах клеток НАЕС (human airway epithelial cells). Выявлена стабильная экспрессия интраназально введенного макакам трансгена (2×10^{11} вирусных частиц) в течение 72 дней [59]. Преимущество проникновения AAV6-вектора через слизь, полученную от пациентов с муковисцидозом, показано также в новой мышинной модели, которая наиболее точно мимикрирует легочную патофизиологию при обструктивных легочных заболеваниях. Точечная мутация белка капсида предполагает потенциальный механизм, посредством которого AAV6 избегает адгезии к полимерной сетке, которую представляет из себя слизь при муковисцидозе и которая приводит к агрегации AAV-векторов других серотипов [62].

Нужно отметить, что на данный момент разработкой генной терапии муковисцидоза на основе AAV занимаются несколько фармацевтических компаний. По данным компании Abeona Therapeutics [63], доклинические исследования продукта ABO401, представляющего собой разработанный в компании капсид нового поколения AAV204, несущий функциональную копию mini-MBTP гена человека, позволяет эффективно восстанавливать основной фенотипический признак муковисцидоза – работу хлорных каналов – в *in vitro* и *in vivo* моделях. При этом AAV204 более специфично направлен на клетки легких, он трансдуцирует также бронхиальные и клетки назального эпителия больных муковисцидозом (уровень экспрессии MBTP в 3–5 раз выше в сравнении с AAV6-вектором).

Кроме того, в 2020 году препарат Spiro-2101 компании Spirovant Sciences, предназначенный для терапии муковисцидоза, получил от FDA статус «Орфанного лекарственного препарата», что позволит компании ускорить проведение клинических исследований и вывести препарат на рынок. В препарате Spiro-2101 также используется новый AAV-капсид с улучшенным тропизмом к клеткам эпителия дыхательных путей для доставки функциональной копии гена *CFTR*.

Доставка с помощью лентивирусных векторов

В генной терапии также широко применяются векторы на основе лентивирусов. Привлекательным аспектом их применения является тот факт, что они обладают низкой иммуногенностью, инфицируют различные типы клеток и способны стабильно интегрироваться в геном, что обеспечивает долговременную экспрессию и сохранение трансгена при делении клетки. Тем не менее, стоит учитывать, что стабильная интеграция в геном может приводить к инсерционному мутагенезу и, соответственно, к риску опухолевой трансформации (онкогенезу) [64]. На данный момент все разрабатываемые подходы к терапии муковисцидоза с использованием лентивирусных векторов (LV) находятся на стадии доклинических исследований, однако недавние успехи применения усовершенствованных лентивирусных векторов в различных КИ показали возможность и безопасность их использования и в терапии муковисцидоза [65].

Исследования на первичных культурах эпителия больных муковисцидозом и животных моделях показали длительную коррекцию фенотипа и низкую иммуногенность лентивирусных векторов. В частности, в экспериментах *in vivo* установлено восстановление функций МВТР-каналов в дыхательных путях свиней после трансдукции вирусом иммунодефицита кошек (FIV, feline immunodeficiency virus), псевдотипированным белком GP64, который обеспечивает апикальный тропизм к клеткам НАЕ-ALI (human airway epithelium cultured at an air-liquid interface). Спустя 2 недели после введения FIV-МВТР в виде аэрозоля в нос и легкие наблюдалось значительное увеличение трансэпителиального транспорта Cl⁻, а также восстановление рН трахеальной поверхностной жидкости и ее бактерицидных свойств [66].

В другом формате эксперимента использовали вирус иммунодефицита обезьян (SIV, simian immunodeficiency virus), псевдотипированный белком слияния вируса Сендай (Sendai virus fusion protein – F), геммагглютинином и нейраминидазой (HN). В доклинических исследованиях показано, что перенос гена МВТР в легкие с использованием этого вектора обеспечивал более эффективную трансдукцию клеток эпителия бронхов человека и эпителия легких мышей *in vivo*, чем невирусная доставка, и не вызывал какого-либо иммунного ответа [33].

В 2017 году Alton и соавт. проанализировали результаты нескольких доклинических исследований с целью выбора наиболее перспективного типа вектора для инициации и планирования первого КИ с использованием лентивирусной доставки трансгена МВТР. Лучшим кандидатом был признан

rSIV.F/HN, обеспечивающий экспрессию функционального МВТР, с эффективностью 90–100% при использовании клинически релевантных устройств для введения. Эти данные позволяют предположить возможность использования этого вектора в первом КИ у больных муковисцидозом [33]. Тем не менее, КИ так и не было начато, что наводит на мысль о том, что данный вектор нуждается в дополнительных доклинических исследованиях и в доказательствах его эффективности для генной терапии муковисцидоза.

Невирусная доставка с помощью липосом и полимерных наночастиц

Преимуществом липосом является простота масштабирования конечной формуляции препарата и емкость, подходящая для больших молекул ДНК. В 2015 году в одном из самых больших КИ, в котором липосомы рGM169/GL67A использовали для доставки МВТР, была показана безопасность применения этого препарата при муковисцидозе [67]. Безопасность многократного введения препарата подтверждена в следующем КИ с использованием липосом рGM169/GL67A. Впервые показали, что генная терапия смогла замедлить снижение функций легких больных муковисцидозом, однако эффект оставался недостаточным для признания терапии эффективной [34].

В последние несколько лет исследования были направлены на улучшение эффективности доставки с помощью липосом (рис. 4). В частности, установ-

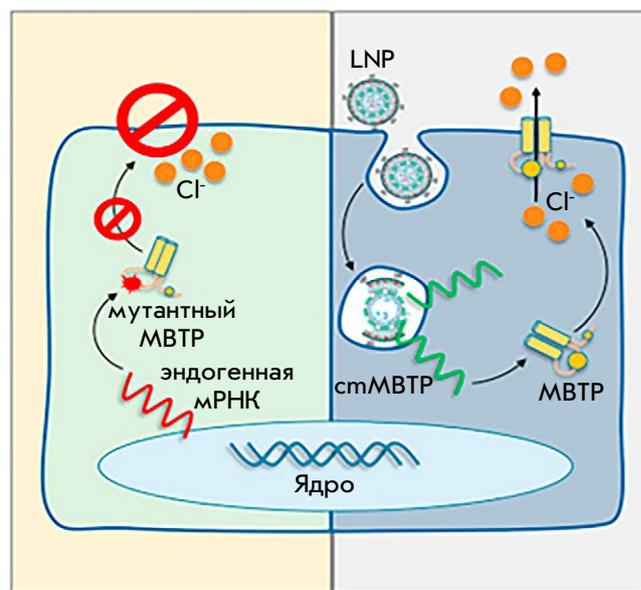


Рис. 4. Доставка LNP-cmМВТР. Адаптировано на основе [68]

лено, что использование клинически релевантных липосомных наночастиц (LNP) для упаковки и доставки химически модифицированной мРНК МВТР (смМВТР) в бронхиальные эпителиальные клетки от пациентов с муковисцидозом приводило к увеличению количества локализованного на мембране МВТР и восстановлению функционирования хлорных каналов [68].

Кроме того, интраназальное введение LNP-смМВТР приводило к восстановлению транспорта Cl^- в эпителии дыхательных путей у мышей МВТР-КО, которое продолжалось в течение 14 дней. Функциональная активность МВТР достигала пика на 3-й день после трансфекции, что проявлялось в восстановлении потока Cl^- до 55% от уровня у здоровых мышей. По эффективности эти результаты сравнимы с результатами использования ивакафтора (модулятор МВТР) и подтверждают возможность использования LNP-смМВТР для коррекции муковисцидоза и других моногенных заболеваний [68].

Известны также различные варианты использования полимеров, в частности, покрытие частиц плотным слоем полиэтиленгликоля (PEG), который обеспечивал проникновение частиц через толстый слой слизи *in vitro* и таким образом увеличивал эффективность трансфекции в легких мышей *in vivo* [69]. Интерес представляет также использование биodeградируемых триплексоформирующих пептидно-нуклеиновых кислот (PNA, Peptide nucleic acid), которые связываются с геномной ДНК и формируют триплексы PNA/ДНК/PNA, стимулирующие восстановление эндогенной ДНК. Доставка таких комплексов вместе с корректирующим геном приводит к сайт-специфическому исправлению гена [70]. В этом случае введение донорской ДНК *in vivo* в носовые пазухи и легкие гомозиготных мышей $\Delta F508del$ приводило к существенной коррекции мутации в эпителии дыхательных путей и облегчало течение заболевания [71].

Кроме того, описана первая попытка системного введения усовершенствованных полимерных наночастиц PNA LNP, несущих ДНК-редактирующие агенты и обладающие более высокой способностью попадать в клетки и более эффективно исправлять мутации. Внутривенное введение таких частиц приводило к их «правильному» биораспределению: частицы накапливались в дыхательных и желудочно-кишечных путях мышей, а функции МВТР в эпителиальных клетках полностью восстанавливались. Это первый случай успешного системного введения наночастиц для генной терапии муковисцидоза [72].

Антисмысловые олигонуклеотиды

Известно, что олигонуклеотиды и их комплексы применялись в качестве терапевтических молекул для восстановления ДНК-модификаций (ДНК-репарации) [73]. Эти олигомеры, содержащие РНК- и/или ДНК-нуклеотиды, используются для осуществления сайт-специфической репарации дефектной ДНК.

Недавно компания ProQR Therapeutics завершила два КИ возможности коррекции гена *CFTR*, опосредованной РНК. В этих КИ использовали интраназальное введение одноцепочечной антисмысловой РНК (eluforsen, QR-010), разработанной для специфического связывания с областью F508del в мРНК и восстановления функции МВТР в эпителии дыхательных путей. В предварительных исследованиях *in vitro* и *in vivo* на мышах было показано, что QR-010 способен быстро диффундировать через муковисцидоз-подобный секрет, что, по-видимому, обусловлено его небольшим размером и отрицательным зарядом. При этом QR-010 оставался стабильным в условиях одновременного применения стандартных терапевтических препаратов для муковисцидоза и в условиях бактериального инфицирования, а также наблюдались положительные изменения в транспорте хлоридов [74–77]. По результатам КИ показано, что QR-010 восстанавливает функцию МВТР у пациентов, гомозиготных по мутации *CFTR*-F508del: отмечено клинически значимое улучшение функционирования МВТР после трех интраназальных введений в течение 4 недель, которое проявлялось стабилизацией параметров транспорта Cl^- и Na^+ [78].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени, как показано с использованием доклинических моделей и в КИ муковисцидоза, уже достигнуты некоторые успехи в применении генно-терапевтических методов доставки функциональной копии гена *CFTR*. Тем не менее до сих пор существует проблема неэффективной доставки гена *CFTR* в эпителиальные клетки бронхолегочных путей. До сих пор не найден оптимальный подход, обеспечивающий экспрессию белка в эпителиальных клетках в количестве, необходимом для выраженного терапевтического эффекта. При этом необходимо учитывать, что вирусная доставка генетического материала при повторном использовании может закономерно вызывать иммунный ответ организма на вирусный капсид, что приведет к снижению эффективности терапии, а невирусные носители обладают недостаточно высокой проникающей способностью, чтобы преодолеть густой слой плотной слизи. Несмотря на то что в настоящее время отсутствует

одобренный FDA метод генной терапии муковисцидоза, основные критические условия, ограничивающие эффективность этой терапии, уже известны и ведется работа по их преодолению. Основываясь на уже имеющихся данных, необходимо разрабатывать более эффективные способы доставки, повышать эффективность проникновения препара-

рата через слой плотного секрета и минимизировать иммунный ответ организма на его введение. Стремительное развитие технологий генной инженерии в последние годы внушает уверенность в том, что этиотропная терапия муковисцидоза может стать реальностью уже в ближайшем будущем. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report of a Joint Working Group of WHO/ICF (M)/ECFS/ECFTN. World Health Organization. // *J. Cyst. Fibros.* 2002. V. 1. P. 5–8.
- Орлов А.В., Симонова О.И., Рославцева Е.А., Шадрин Д.И. Муковисцидоз (клиническая картина, диагностика, лечение, реабилитация, диспансеризация): Учебное пособие для врачей. СПб.: Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 2014. 160 с.
- Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Симонова О.И., Каширская Н.Ю., Рославцева Е.А., Горинова Ю.В., Красовский С.А., Селимзянова Л.Р. // *Педиатрическая фармакология.* 2015. Т. 12. № 5. С. 589–604.
- Клинические рекомендации. Кистозный фиброз (муковисцидоз): микробиологическая диагностика хронической респираторной инфекции. Минздрав РФ, 2020.
- Yan Z., McCray P.B., Engelhardt J.F. // *Hum. Mol. Genet.* 2019. V. 28. № R1. P. R88–R94.
- Смирнихина С.А., Лавров А.В. // *Гены & клетки.* 2018. Т. 13. № 3. С. 23–31.
- Bradley S.Q., Steven M.R. // *BMJ.* 2016. V. 352. i859.
- Гембицкая Т.Е., Черменский А.Г. // *Пульмонология и аллергология.* 2011. Т. 4. С. 35–39.
- Clunes M.T., Boucher R.C. // *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 2007. V. 4. P. 63–72.
- Красовский С.А., Самойленко В.А., Амелина Е.Л. // *Практическая пульмонология.* 2013. Т. 1. С. 42–46.
- Rubin B.K. // *Paediatric Respir. Rev.* 2007. V. 8. № 1. P. 4–7.
- Ostedgaard L.S., Moninger T.O., McMenimen J.D., Sawin N.M., Parker C.P., Thornell I.M., Powers L.S., Gansmer N.D., Bouzek D.C., Cook D.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 26. P. 6842–6847.
- Boucher R.C. // *Trends Mol. Med.* 2007. V. 13. P. 231–240.
- Matsui H., Verghese M.W., Kesimer M., Schwab U.E., Randell S.H., Sheehan J.K., Grubb B.R., Boucher R.C. // *J. Immunol.* 2005. V. 175. № 2. P. 1090–1099.
- Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C. // *Science.* 1989. V. 245. № 4922. P. 1073–1080.
- Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., et al. // *Science.* 1989. V. 245. № 4922. P. 1059–1065.
- Fajac I., Wainwright C.E. // *Presse Med.* 2017. V. 46. № 6. Pt 2. P. e165–e175.
- Welsh M.J., Smith A.E. // *Cell.* 1993. V. 73. № 7. P. 1251–1254.
- Maiuri L., Raia V., Kroemer G. // *Cell Death Differ.* 2017. V. 24. № 11. P. 1825–1844.
- Ameen N., Silvis M., Bradbury N.A. // *J. Cyst. Fibros.* 2007. V. 6. № 1. P. 1–14.
- Meng X., Clews J., Martin E.R., Ciuta A.D., Ford R.C. // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46. № 5. P. 1093–1098.
- Meng X., Clews J., Kargas V., Wang X., Ford R.C. // *Cell Mol. Life Sci.* 2017. V. 74. № 1. P. 23–38.
- Cooney A.L., McCray P.B., Sinn P.L. // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 11. P. 538.
- Burgener E.B., Moss R.B. // *Curr. Opin. Pediatr.* 2018. V. 30. № 3. P. 372–377.
- Burney T.J., Davies J.C. // *Appl. Clin. Genet.* 2012. V. 5. P. 29–36.
- Zabner J., Couture L.A., Gregory R.J., Graham S.M., Smith A.E., Welsh M.J. // *Cell.* 1993. V. 75. P. 207–216.
- Crystal R.G., McElvaney N.G., Rosenfeld M.A., Chu C.S., Mastrangeli A., Hay J.G., Brody S.L., Jaffe H.A., Eissa N.T., Danel C. // *Nat. Genet.* 1994. V. 8. P. 42–51.
- Boucher R.C., Knowles M.R., Johnson L.G., Olsen J.C., Pickles R., Wilson J.M., Engelhardt J., Yang Y., Grossman M. // *Hum. Gene Ther.* 1994. V. 5. P. 615–639.
- Zuckerman J.B., Robinson C.B., McCoy K.S., Shell R., Sferra T.J., Chirmule N., Magosin S.A., Probert K.J., Brown-Parr E.C., Hughes J.V., et al. // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. № 18. P. 2973–2985.
- Wagner J.A., Nepomuceno I.B., Messner A.H., Moran M.L., Batson E.P., Dimiceli S., Brown B.W., Desch J.K., Norbash A.M., Conrad C.K., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2002. V. 13. № 11. P. 1349–1359.
- Moss R.B., Milla C., Colombo J., Accurso F., Zeitlin P.L., Clancy J.P., Spencer L.T., Pilewski J., Waltz D.A., Dorkin H.L., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2007. V. 18. № 8. P. 726–732.
- Flotte T.R., Zeitlin P.L., Reynolds T.C., Heald A.E., Pedersen P., Beck S., Conrad C.K., Brass-Ernst L., Humphries M., Sullivan K., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2003. V. 14. № 11. P. 1079–1088.
- Alton E.W., Beekman J.M., Boyd A.C., Brand J., Carlson M.S., Connolly M.M., Chan M., Conlon S., Davidson H.E., Davies J.C., et al. // *Thorax.* 2017. V. 72. № 2. P. 137–147.
- Alton E.W., Armstrong D.K., Ashby D., Bayfield K.J., Bilton D., Bloomfield E.V., Boyd A.C., Brand J., Buchan R., Calcedo R., et al. // *Lancet Respir. Med.* 2015. V. 3. № 9. P. 684–691.
- Alton E.W., Stern M., Farley R., Jaffe A., Chadwick S.L., Phillips J., Davies J., Smith S.N., Browning J., Davies M.G., et al. // *Lancet.* 1999. V. 353. № 9157. P. 947–954.
- Caplen N.J., Alton E.W., Middleton P.G., Dorin J.R., Stevenson B.J., Gao X., Durham S.R., Jeffery P.K., Hodson M.E., Coutelle C., et al. // *Nat. Med.* 1995. V. 1. № 1. P. 39–46.
- Yoshimura K., Rosenfeld M.A., Nakamura H., Scherer E.M., Pavirani A., Lecocq J.P., Crystal R.G. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 3233–3240.
- Ruiz F.E., Clancy J.P., Perricone M.A., Bebok Z., Hong J.S., Cheng S.H., Meeker D.P., Young K.R., Schoumacher R.A., Weatherly M.R., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2001. V. 12. № 7. P. 751–761.
- Sermet-Gaudelus I., Clancy J.P., Nichols D.P., Nick J.A., De Boeck K., Solomon G.M., Mall M.A., Bolognese J., Bouisset F., den Hollander W., et al. // *J. Cyst. Fibros.* 2019. V. 18. № 4. P. 536–542.

40. Knowles M.R., Hohneker K.W., Zhou Z., Olsen J.C., Noah T.L., Hu P.C., Leigh M.W., Engelhardt J.F., Edwards L.J., Jones K.R., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1995. V. 333. P. 823–831.
41. Crystal R.G., Jaffe A., Brody S., Mastrangeli A., McElvaney N.G., Rosenfeld M., Chu C.S., Danel C., Hay J., Eissa T. // *Hum. Gene Ther.* 1995. V. 6. P. 643–666.
42. Kushwah R., Cao H., Hu J. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 6. P. 4098–4108.
43. Yan Z., Stewart Z.A., Sinn P.L., Olsen J.C., Hu J., McCray P.B., Engelhardt J.F. // *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2015. V. 26. P. 38–49.
44. Cao H., Ouyang H., Grasemann H., Bartlett C., Du K., Duan R., Shi F., Estrada M., Seigel K.E., Coates A.L., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. P. 643–652.
45. Cooney A.L., Singh B.K., Loza L.M., Thornell I.M., Hippee C.E., Powers L.S., Ostedgaard L.S., Meyerholz D.K., Wohlford-Lenane C., Stoltz D.A., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. 9591–9600.
46. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. // *Acta Naturae.* 2014. Т. 6. № 3. С. 20–42.
47. Xia E., Zhang Y., Cao H., Li J., Duan R., Hu J. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. № 1. P. 39.
48. Zhou Z.P., Yang L.L., Cao H., Chen Z.R., Zhang Y., Wen X.-Y., Hu J. // *Hum. Gene Ther.* 2019. V. 30. № 9. P. 1101–1116.
49. Zhou Z.P., Yang L.L., Cao H., Wen X.-Y., Hu J. // *ASGCT meeting 2019. Mol. Therapy. V. 27. № 4S1.*
50. Guggino W.B., Cebotaru L. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017. V. 17. № 10. P. 1265–1273.
51. Steines B., Dickey D.D., Bergen J., Excoffon K.J., Weinstein J.R., Li X., Yan Z., Abou Alaiwa M.H., Shah V.S., Bouzek D.C., et al. // *JCI Insight.* 2016. V. 1. № 14. P. e88728.
52. McClain L.E., Davey M.G., Zoltick P.W., Limberis M.P., Flake A.W., Peranteau W.H. // *J. Pediatr. Surg.* 2016. V. 51. P. 879–884.
53. Yan Z., Feng Z., Sun X., Zhang Y., Zou W., Wang Z., Jensen-Cody C., Liang B., Park S.Y., Qiu J., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2017. V. 28. P. 612–625.
54. Vidovic D., Carlon M.S., da Cunha M.F., Dekkers J.F., Hollenhorst M.I., Bijvelds M.J., Ramalho A.S., van den Haute C., Ferrante M., Baekelandt V., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2016. V. 193. P. 288–298.
55. Yan Z., Sun X., Feng Z., Li G., Fisher J.T., Stewart Z.A., Engelhardt J.F. // *Hum. Gene Ther.* 2015. V. 26. P. 334–346.
56. Ostedgaard L.S., Rokhlina T., Karp P.H., Lashmit P., Afione S., Schmidt M., Zabner J., Stinski M.F., Chiorini J.A., Welsh M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 2952–2957.
57. Yan Z., Keiser N.W., Song Y., Deng X., Cheng F., Qiu J., Engelhardt J.F. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. P. 2181–2194.
58. Yan Z., Zou W., Feng Z., Shen W., Park S.Y., Deng X., Qiu J., Engelhardt J.F. // *Hum. Gene Ther.* 2019. V. 30. P. 556–570.
59. Limberis M.P., Vandenberghe L.H., Zhang L., Pickles R.J., Wilson J.M. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 1. P. S160. doi: 10.1016/S1525-0016(16)44621-6
60. Kurosaki F., Uchibori R., Mato N., Sehara Y., Saga Y., Urabe M., Mizukami H., Sugiyama Y., Kume A. // *Gene Ther.* 2017. V. 24. P. 290–297.
61. Halbert C.L., Allen J.M., Miller A.D. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 14. P. 6615–6624.
62. Duncan G.A., Kim N., Colon-Cortes Y., Rodriguez J., Mazur M., Birket S.E., Rowe S.M., West N.E., Livraghi-Butrico A., Boucher R.C., et al. // *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 2018. V. 9. P. 296–304.
63. Wille P.T., Rosenjack J., Cotton C., Kelley T., Padegimas L., Miller T.J. // *J. Cyst. Fibros.* 2019. V. 18. P. S39. doi: 10.1016/S1569-1993(19)30241-3
64. Черенкова Е.Е., Исламов Р.Р., Ризванов А.А. // *Международный журн. прикладных и фундаментальных исследований.* 2013. Т. 11. № 2. С. 57–58.
65. Marquez Loza L.I., Yuen E.C., McCray P.B. Jr. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. № 3. P. 218.
66. Cooney A.L., Abou Alaiwa M.H., Shah V.S., Bouzek D.C., Stroik M.R., Powers L.S., Gansemer N.D., Meyerholz D.K., Welsh M.J., Stoltz D.A., et al. // *JCI Insight.* 2016. V. 1. № 14. P. e88730.
67. Alton E.W., Boyd A.C., Porteous D.J., Davies G., Davies J.C., Griesenbach U., Higgins T.E., Gill D.R., Hyde S.C., Innes J.A., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. V. 192. P. 1389–1392.
68. Robinson E., MacDonald K.D., Slaughter K., McKinney M., Patel S., Sun C., Sahay G. // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 8. P. 2034–2046.
69. Mastorakos P., da Silva A.L., Chisholm J., Song E., Choi W.K., Boyle M.P., Morales M.M., Hanes J., Suk J.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 8720–8725.
70. Quijano E., Bahal R., Ricciardi A., Saltzman W.M., Glazer P.M. // *J. Biol. Med.* 2017. V. 90. № 4. P. 583–598.
71. McNeer N.A., Anandalingam K., Fields R.J., Caputo C., Kopic S., Gupta A., Quijano E., Polikoff L., Kong Y., Bahal R., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6952.
72. Piotrowski-Daspit A.S., Barone C., Kauffman A.C., Lin C.Y., Nguyen R., Gupta A., Glazer P.M., Saltzman W.M., Egan M.E. // *J. Cyst. Fibros.* 2021. V. 20. P. S277. doi: 10.1016/S1569-1993(21)02005-1
73. Papaioannou I., Simons J.P., Owen J.S. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012. V. 12. № 3. P. 329–342.
74. Beumer W., Swildens J., Henig N., Anthonijsz H., Biasutto P., Teresinha L., Ritsema T. // *J. Cyst. Fibros.* 2015. V. 14. P. S1. doi: 10.1016/S1569-1993(15)30002-3
75. Brinks V., Lipinska K., Koppelaar M., Matthee B., Button B.M., Livraghi-Butrico A., Henig N. // *J. Cyst. Fibros.* 2016. V. 15. № 1. P. S31. doi: 10.1016/S1569-1993(16)30168-0
76. Beumer W., Swildens J., Leal T., Noel S., Anthonijsz H., van der Horst G., Kuiperij-Boersma H., Potman M., van Putten C., Biasutto P., et al. // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 6. P. e0219182.
77. Brinks V., Lipinska K., Jager M., Beumer W., Button B., Livraghi A., Henig N., Matthee B. // *J. Aerosol Med. Pulmonary Drug Delivery.* 2019. V. 32. № 5. P. 303–316.
78. Sermet-Gaudelus I., Clancy J.P., Nichols D.P., Nick J.A., De Boeck K., Solomon G.M., Mall M.A., Bolognese J., Bouisset F., den Hollander W., et al. // *J. Cyst. Fibros.* 2019. V. 18. № 4. P. 536–542.