

DOI: <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2024-14-3-12-23>

Возможность терапии, направленной на пропуск экзонов, у российских пациентов с миодистрофией Дюшенна: настоящее и будущее

Е.В. Зинина, М.В. Булах, О.П. Рыжкова, О.А. Щагина, А.В. Поляков

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Елена Витальевна Зинина zininalen@yandex.ru

Введение. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является наиболее часто встречающейся формой мышечной дистрофии у детей, манифестирующей в возрасте от 1 до 3 лет. К причинам развития МДД относят патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *DMD*, приводящие к нарушению синтеза дистрофина – основного белка мышечного цитоскелета. В настоящее время по всему миру активно ведется разработка препаратов для замедления прогрессирования заболевания. Одним из перспективных подходов патогенетической терапии является терапия, направленная на пропуск определенных экзонов, в результате которой у больных будет синтезироваться укороченный, но функционально активный белок дистрофин.

Цель исследования – оценка применимости терапии, нацеленной на пропуск экзонов, у российских больных МДД.

Материалы и методы. Проанализирована применимость терапии, направленной на пропуск экзонов, для выборки из 1519 пациентов, поступивших в лабораторию ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра им. акад. Н.П. Бочкова с диагнозом мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера по программе селективного скрининга в период с 01.10.2018 по 01.09.2023.

Результаты. В результате проведенного исследования и анализа спектра мутаций в гене *DMD* среди пациентов с МДД в Российской Федерации была оценена теоретическая применимость терапии путем пропуска экзонов: для 29,3 % пациентов применим данный подход к лечению. Также были оценены доли пациентов, для которых доступна существующая терапия путем пропуска экзонов. Суммарно пропуск частых экзонов 51, 53, 45 применим для 14,6 % пациентов.

Выводы. В настоящее время одним из эффективных и доступных видов терапии МДД является подход, нацеленный на пропуск экзонов. Данный вид терапии является мутационно-специфическим. В связи с этим оценка применимости позволит определить доли пациентов, для которых будет доступен тот или иной пропуск экзонов.

Ключевые слова: мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера, ген *DMD*, патогенетическая терапия, пропуск экзонов

Для цитирования: Зинина Е.В., Булах М.В., Рыжкова О.П. и др. Возможность терапии, направленной на пропуск экзонов, у российских пациентов с миодистрофией Дюшенна: настоящее и будущее. Нервно-мышечные болезни 2024;14(3):12–23.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2024-14-3-12-23>

Possibility of exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy in Russian patients: present and future

E.V. Zinina, M.V. Bulakh, O.P. Ryzhkova, O.A. Shchagina, A.V. Polyakov

Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Elena Vitalyevna Zinina zininalen@yandex.ru

Background. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common form of muscular dystrophy in children, that occurs between one and three years of age. DMD is caused by pathogenic and likely pathogenic variants in the *DMD* gene, which lead to a deficit of various isoforms of the dystrophin protein, the main protein of the muscle cytoskeleton. Drugs aimed at slowing the progression of the disease are being actively developed around the world. One of the perspective approaches to pathogenetic therapy is therapy using exon skipping. As a result of this treatment, the reading frame is restored due to the exon skipping enabling the production of truncated dystrophin.

Aim. To evaluate the applicability of exon skipping therapy in Russian patients with DMD.

Materials and methods. The applicability of therapy aimed at exon skipping was analyzed for a sample of 1519 patients admitted to the laboratory of DNA diagnostics of the Research Centre for Medical Genetics with a referral diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy from October 1, 2018 to September 1, 2023.

Results. As a result of the study and analysis of the spectrum of mutations in the *DMD* gene among patients with DMD in the Russian Federation, the theoretical applicability of exon skipping therapy was assessed: for 29.3 % of patients this approach to treatment is applicable. The proportions of patients for whom existing exon skipping therapies are available were also estimated. In total, skipping of frequent exons 51, 53, 45 is applicable for 14.6 % of patients.

Conclusion. One of the effective and accessible types of therapy for DMD is exon skipping. This type of therapy is mutation-specific. In this regard, the assessment of applicability will allow us to estimate the proportion of patients for whom a particular exon skipping will be available.

Keywords: Duchenne/Becker muscular dystrophy, gene *DMD*, pathogenetic therapy, exon skipping

For citation: Zinina E.V., Bulakh M.V., Ryzhkova O.P. et al. Possibility of exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy in Russian patients: present and future. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2024;14(3):12–23. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2024-14-3-12-23>

Введение

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — X-сцепленное дегенеративное нервно-мышечное заболевание с предполагаемой частотой рождения больных мальчиков от 1:3500 до 1:6000 [1]. К основным симптомам МДД относят прогрессирующую слабость проксимальных мышц, а также задержку моторного развития в раннем возрасте [2]. Кроме того, в большинстве случаев первым лабораторным признаком МДД, позволяющим заподозрить заболевание, является бессимптомное повышение уровня креатинфосфокиназы (зачастую в сотни раз) [3]. Уже к подростковому возрасту большинство пораженных мальчиков становятся полностью прикованными к инвалидному креслу. При оптимальном уходе и правильно подобранной традиционной терапии пациенты с МДД умирают в возрасте от 20 до 30 лет от сердечной и/или дыхательной недостаточности [4]. Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) является мягкой аллельной формой заболевания, имеющей сходные, но менее выраженные симптомы. Для пациентов с МДБ характерны более поздний дебют заболевания и широкий диапазон клинических проявлений [5].

Причиной МДД/МДБ являются патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *DMD*, расположенном в регионе Xp21.2–p21.1. Ген дистрофина в настоящее время является одним из самых протяженных белок-кодирующих генов в геноме человека, содержащим 79 экзонов, размером около 2,6 млн пар оснований. Размер гена *DMD*, а также особенности его структуры (наличие траспозон-подобных элементов в интронах) обуславливают высокую частоту возникающих вариантов. Около 1/3 вариантов возникают *de novo*, тогда как в остальных случаях варианты наследуются от матерей-носительниц [6]. Белковым продуктом гена *DMD* является дистрофин — основной белок цитоскелета, являющийся составляющей частью дистрофин-ассоциированного гликопротеинового комплекса. Патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *DMD* приводят к полному или частичному пре-

крашению синтеза дистрофина, в результате чего нарушается нормальное функционирование дистрофин-ассоциированного гликопротеинового комплекса, что приводит к дестабилизации клеточных мембран и дегенерации мышечных клеток [7].

Согласно накопленным данным, спектр мутаций гена *DMD* включает практически все типы вариантов. Наиболее распространенными вариантами являются протяженные делеции и дупликации, затрагивающие от 1 до нескольких экзонов [8]; по данным литературы, на их долю приходится 55–65 и 6–11 % от числа всех вариантов в гене *DMD* соответственно [9]. Оставшиеся 20–30 % случаев МДД/МДБ обусловлены точковыми вариантами, к которым относятся миссенс-мутации (0,4 %), нонсенс-мутации (10,2 %), мутации сайтов сплайсинга (2,8 %), небольшие перестройки (инсерции/делеции) (6,9 %) [10]. Также у <1 % пациентов могут обнаруживаться глубоко интронные мутации, приводящие к значительным нарушениям сплайсинга [11]. Именно типом мутации и ее влиянием на открытую рамку считывания мРНК было объяснено различие в клинических проявлениях МДД и МДБ. Так, варианты, нарушающие рамку считывания, приводят к практически полному прекращению продукции белка дистрофина, что характерно для более тяжелого фенотипа — МДД, в то время как варианты без сдвига рамки считывания связаны с более легкой клинической формой — МДБ [12].

Представление о спектре мутаций в гене *DMD* постоянно меняется с расширением методических возможностей лабораторий по всему миру. В последние годы было высказано предположение о том, что спектр мутаций в гене *DMD* сильно варьирует в зависимости от популяции, что делает затруднительным определение доли пациентов, для которых доступна патогенетическая терапия [13]. В Российской Федерации (РФ) нами ранее был проанализирован спектр мутаций и выявлены его определенные различия по сравнению с мультиэтнической выборкой. В первую очередь доля

делений была существенно ниже общепринятой (65,0 %) [10] и составляла 49,0 %, в то время как на долю точковых вариантов пришлось 36,5 % всех вариантов в нашей когорте, что значительно выше 20,0–30,0 % в мире [14]. В зависимости от спектра мутаций меняется и представление о доле пациентов, для которых возможно применение доступных на сегодняшний день терапевтических подходов.

В настоящее время в РФ существуют 2 доступных подхода возможной мутационно-специфической терапии, направленные на коррекцию первичного белкового дефицита: пропуск преждевременно образующихся стоп-кодонов и пропуск определенных экзонов гена. В результате терапии, нацеленной на пропуск экзонов, происходит восстановление рамки считывания, что способствует синтезу частично функционального белка дистрофина [15]. Таким образом, данный подход позволяет перевести МДД в более легкую форму — МДБ. В этом подходе используют антисмысловые олионуклеотиды, которые связываются с соответствующими экзонами пре-мРНК гена *DMD* до сплайсинга, что приводит к пропуску этого экзона во время процессинга мРНК [16] (рис. 1). Ранее было высказано предположение о том, что для 70 % больных МДД с делециями будет доступна и применима терапия, направленная на пропуск 1 экзона [17]. Кроме того, ведутся разработки препаратов, нацеленных на пропуск 2 и более экзонов, и считается, что это также сможет повысить применимость данного подхода.

Прежде всего для данного вида лечения подходят экзоны, число нуклеотидов в которых не кратно 3, поскольку пропуск именно такого экзона может изменить рамку считывания [19]. Суммарно 38 (48 %) из 79 экзонов гена *DMD* содержат не кратное 3 число нуклеотидов, или 51 % всей кодирующей последовательности гена [20]. Согласно представленным ранее данным, терапия путем пропуска экзонов потенциально может помочь большинству пациентов с делециями. Но у данного подхода существует ограничение: каждый разработанный препарат для пропуска определенного экзона может использоваться только для конкретной доли больных МДД только с определенными делециями [21]. Ранее M.J.A. Wood и соавт. сообщили, что примерно 40 % пациентов с МДД в перспективе смогут получить лечение путем пропуска 1 экзона с использованием 10 наиболее многообещающих препаратов на основе антисмысловых олионуклеотидов [22]. Среди больных МДД в РФ до сих пор не определены доли пациентов, для которых теоретически применим данный подход. Кроме того, не определены доли пациентов, для которых доступны одобренные в РФ препараты, нацеленные на пропуск наиболее частых экзонов.

В настоящее время в мире, в том числе и в РФ, существует 4 препарата, одобренных к применению, для пропуска наиболее частых экзонов: 45, 51 и 53. Согласно данным литературы, общая доля пациентов, для которых возможно применение терапии путем пропуска этих экзонов, составляет 30 % [19]. Ожидается,

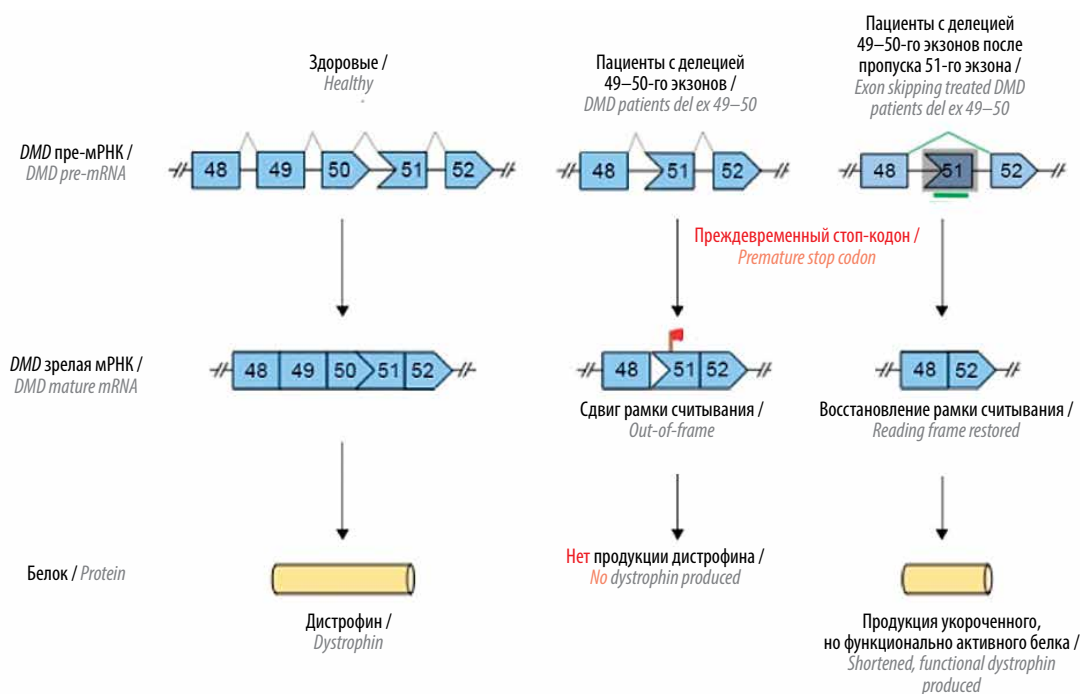


Рис. 1. Схема терапии, направленной на пропуск экзона, на примере 51-го экзона (модифицировано по K.R.Q. Lim и соавт.) [18]

Fig. 1. Scheme of a therapy aimed at exon skipping using the example of exon 51 (modified from K.R.Q. Lim et al.) [18]

Рис. 2. Определение экзона для пропуска с использованием интернет-ресурса (на примере делеции экзонов 48–50)

Fig. 2. Determination of an exon to skip using an Internet resource (using the example of deletion of exons 48–50)

что доля пациентов в РФ, для которых доступна эта терапия, значительно меньше в связи со сниженной долей делеций в выборке российских пациентов. Кроме того, поскольку пропуск экзонов — подход, специфичный для определенных мутаций, понимание распределения делеций и спектра мутаций среди пациентов в РФ позволит в перспективе оценить применимость терапии, нацеленной на пропуск экзонов.

Цель исследования — оценка доли российских больных МДБ, для которых может быть применена терапия, направленная на пропуск экзонов в гене дистрофина.

Материалы и методы

Исследуемая выборка включала образцы ДНК 1519 пациентов из 1448 неродственных семей, поступивших в лабораторию ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра им. акад. Н.П. Бочкова с направляющим диагнозом МДД/МДБ по программе селективного скрининга в период с 01.10.2018 по 01.09.2023. На 2023 г. пациенты поступают из 79 из 85 субъектов РФ, а также из Казахстана, Белоруссии, Армении и Грузии. Основными критериями включения пациентов в программу являлись мужской пол, клинически установленный диагноз МДД/МДБ или значительное повышение уровня креатинфосфокиназы (>1000 Ед/л), возраст до 29 лет включительно. Медиана срока обращения больных за молекулярной диагностикой составила 7 лет 7 мес.

Забор биологического материала проводился в лабораторных кабинетах медико-генетических консультаций разных регионов РФ. От всех пациентов получено информированное согласие на проведение исследования, в случае несовершеннолетия пациентов — от их родителей или законных представителей. Для исследования использовали цельную венозную кровь, собранную в одноразовые пластиковые пробирки с консервантом (ЭДТА). Выделение ДНК из лейкоцитов периферичес-

кой крови выполняли с помощью готового набора реактивов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколу производителя [23].

Первым этапом скрининга являлся поиск протяженных делеций и дупликаций 1 или нескольких экзонов гена *DMD* при помощи мультиплексной лигазозависимой амплификации проб с использованием коммерчески доступных наборов MLPA SALSA P034 и P035 *DMD* Probemix (MRC-Holland, Нидерланды). Реакции проводились в соответствии с рекомендациями производителя [24]. Продукт реакции детектировался методом фрагментарного анализа на приборе ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems, США). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Coffalyser.Net™. Вторым этапом являлся поиск малых мутаций с использованием кастомной NGS-панели, включающей 31 ген.

Оценка наличия сдвига рамки считывания при делеции и определение экзона для пропуска в настоящем исследовании проводились при помощи интернет-ресурса <https://www.duchenne.com/exon-deletion-tool>. На рис. 2 на примере делеции экзонов 48–50 представлена работа данного ресурса. Кроме того, узнать, какие делеции гена *DMD* поддаются терапии путем пропуска определенных экзонов, возможно с использованием таблиц, представленных в публикациях, а также на официальных сайтах пациентских организаций [25].

Результаты

В результате селективного скрининга у 74,5 % (1131 из 1519) пациентов с направляющим диагнозом МДД/МДБ были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *DMD*, среди которых у 47,1 % (533 из 1131) обнаружены протяженные делеции. Согласно полученным данным о распределении делеций, нами также подтверждено, что делеции чаще

всего локализируются в 2 «горячих точках»: медиально-дистальной области центрального домена (экзоны 45–55) и на 5'-конце N-домена (экзоны 2–19) [26]. Наибольшая концентрация делеций наблюдалась в регионе экзонов 45–55 – у 66,8 % (356 из 533) пациентов. Кроме того, у 4,3 % (23 из 533) пациентов была обнаружена делеция 48–50, которая в настоящее время является самой распространенной среди пациентов в российской выборке и для которой доступна терапия путем пропуска 51-го экзона. В регионе экзонов 2–19 делеции имели 24,8 % (132 из 533) пробандов, наиболее часто встречаемая из них – делеция, затрагивающая экзоны 3–7 (у 8 из 533 пациентов). Наименее подверженные делециям области находятся в регионе с 62-го по 79-й экзон. На долю делеций в этих областях приходится всего 3,0 % (16 из 533) всех обнаруженных пациентов с делециями.

Оценка применимости терапии путем пропуска экзонов у российских больных в исследованной группе. Терапевтический подход, нацеленный на пропуск экзонов, является мутационно-специфическим, поскольку разные виды делеций требуют пропуска разных экзонов для восстановления рамки считывания. Среди обследованных пациентов у 47,1 % (533 из 1131) больных были обнаружены протяженные делеции 1 или нескольких экзонов, среди которых 66,8 % кластеризуются между экзонами 45 и 55. Данные экзоны несут число нуклеотидов, не кратное 3, и их пропуск может восстановить рамку считывания. Таким образом, пропуск определенных экзонов в этой области гена может быть применим к большим группам российских пациентов.

В табл. 1 представлены сводные данные применимости терапии путем пропуска экзонов. Данный расчет применимости терапии среди исследуемой группы

Таблица 1. Российские пациенты в исследуемой выборке, теоретически подходящие для терапии путем пропуска экзонов в гене DMD

Table 1. Russian patients in the study sample theoretically suitable for exon skipping therapy in the DMD gene

Экзон для скиппинга Exon for skipping	Доля всех больных с вариантами в гене DMD (n = 1131), % Rate among all patients with DMD mutations (n = 1131), %	Доля всех больных с делециями (n = 533), % Rate among all patients with deletions (n = 533), %	Доля всех больных с вариантами в гене DMD (данные LOVD), % Rate among all patients with DMD mutations (data from LOVD), %	Доля всех больных с делециями (данные LOVD), % Rate among all patients with deletions (data from LOVD), %
51	5,0	10,7	13,0	19,1
53	4,0	8,4	7,7	11,4
45	2,8	6,0	8,1	11,8
44 или 46 44 or 46	1,9	3,9	—	—
43 или 45 43 or 45	1,5	3,2	3,8	5,3
44	1,3	2,8	6,2	8,8
55	1,3	2,8	2,0	2,7
50	1,2	2,6	4,0	5,6
52	0,9	2,1	4,1	5,7
50 или 52 50 or 52	0,9	2,1	—	—
51 или 53 51 or 53	0,9	1,9	—	—
12	0,8	1,7	0,8	1,0
2 или 8 2 or 8	0,7	1,5	—	—
17	0,6	1,3	1,0	1,1
44 или 55 44 or 55	0,5	1,1	—	—
7	0,4	0,9	1,0	1,4
11	0,4	0,9	0,4	0,3
20	0,4	0,9	0,8	1,0

Окончание табл. 1
End of table 1

Экзон для скиппинга Exon for skipping	Доля всех больных с вариантами в гене <i>DMD</i> (<i>n</i> = 1131), % Rate among all patients with <i>DMD</i> mutations (<i>n</i> = 1131), %	Доля всех больных с делециями (<i>n</i> = 533), % Rate among all patients with deletions (<i>n</i> = 533), %	Доля всех больных с вариантами в гене <i>DMD</i> (данные LOVD), % Rate among all patients with <i>DMD</i> mutations (data from LOVD), %	Доля всех больных с делециями (данные LOVD), % Rate among all patients with deletions (data from LOVD), %
43	0,4	0,9	—	—
45 или 56 45 or 56	0,4	0,9	—	—
8	0,3	0,7	2,3	2,3
18	0,3	0,7	0,9	1,0
46	0,3	0,7	—	—
21	0,3	0,6	0,8	0,5
19	0,2	0,4	0,6	0,5
22	0,2	0,4	0,6	0,6
20 или 22 20 or 22	0,2	0,4	—	—
54 или 56 54 or 56	0,2	0,4	—	—
63	0,1	0,2	0,1	0,1
69	0,1	0,2	—	—
75	0,1	0,2	0,02	0,03
12 или 44 12 or 44	0,1	0,2	—	—
2 или 20 2 or 20	0,1	0,2	—	—
46	—	—	4,3	6,2
6 и 7 6 or 7	—	—	3,0	3,6
2	—	—	1,9	1,3
54	—	—	0,5	0,6
56	—	—	0,6	0,6
6	—	—	0,4	0,3
57	—	—	0,3	0,2
61	—	—	0,2	0,3
66	—	—	0,1	0,03
58	—	—	0,1	0,1
62	—	—	0,1	0,03
59	—	—	0,04	0,03
Всего <i>Total</i>	29,3	62,1	54,0	79,0

Примечание. Жирным шрифтом отмечены экзоны, для которых в настоящее время существуют доступные препараты.
Note. Exons for which there are currently available drugs are indicated in bold.

российских пациентов сделан по аналогии с представленной ранее работой А. Aartsma-Rus и соавт. [20], где была проведена оценка теоретической применимости на основании случаев МДД, зарегистрированных в базе данных LOVD. Данная работа является единственным обширным исследованием теоретической применимости терапии. Сверху таблицы представлены экзоны для скиппинга, которые применимы для большей доли пациентов.

При сравнении с мировыми данными в выборке российских пациентов наблюдаются схожие результаты. Отличие заключается только в определенных делециях, которые не встречались в исследуемой выборке, но для которых теоретически применим подход, направленный на пропуск экзона.

В исследуемой выборке российских пациентов было определено, что терапия, направленная на пропуск 1 экзона, суммарно применима для 29,3 % (331 из 1131) пациентов с вариантами в гене *DMD*. Относительно всех пациентов с протяженными делециями эта доля составила 62,1 % (331 из 533).

Применимость доступной терапии путем пропуска экзона. В настоящее время существует 4 препарата, одобренных к применению в РФ для пропуска наиболее частых экзона: препарат для пропуска экзона 45, препарат для пропуска экзона 51 и 2 препарата для пропуска экзона 53. Известно, что терапия путем пропуска экзона 51 применяется в самой большой группе пациентов [27]. В проанализированной выборке, как и в мире, терапия, направленная на пропуск экзона 51, доступна для большой группы пациентов – 5,9 % (67 из 1131). Делеции, поддающиеся пропуску экзона 45 и 53, наблюдаются у 4,7 % (54 из 1131) и 4,0 % (45 из 1131) больных мальчиков соответственно. Объединенные данные о применимости одобренных препаратов представлены в табл. 2. Подводя итоги, согласно данным, полученным за время селективного скрининга МДД в Медико-генетическом научном центре им. акад. Н.П. Бочкова, общая доля пациентов, подходящих для существующей терапии путем пропуска наиболее частых экзона 45, 51, 53, составляет 14,6 % (166 из 1131).

Обсуждение

Впервые терапевтический подход, нацеленный на пропуск экзона, с использованием антисмысловых олигонуклеотидов был предложен Z. Dominiski и соавт. в 1993 г. для восстановления процессов сплайсинга у пациентов с вариантами в генах *HBB* и *CFTR* [28]. И уже впоследствии было рассмотрено применение данного метода как потенциальной терапии при МДД [29]. В настоящее время пропуск экзона является одним из успешных терапевтических подходов при МДД. Целью данного лечения является восстановление нарушенной в результате делеции рамки считывания за счет пропуска экзона, несущего число нуклеотидов, не кратное 3. В результате этого вырабатывается укороченный, но функционально активный белок дистрофин и происходит изменение фенотипа МДД на менее тяжелый – МДБ. Ранее было сообщено о том, что восстановление рамки считывания при помощи пропуска экзона будет возможно не только для пациентов с протяженными делециями 1 или нескольких экзона, но и для пациентов с нонсенс-вариантами и протяженными дупликациями [30]. В настоящее время данный терапевтический подход в первую очередь доступен для пациентов с делециями гена *DMD*, приводящими к сдвигу рамки считывания.

Известно, что делеции, затрагивающие 1 или несколько экзона гена *DMD*, являются наиболее распространенными вариантами. Согласно данным литературы, на их долю приходится 55–65 % всех вариантов в гене [9]. В связи с этим теоретически пропуск экзона применим к большой доле пациентов с МДД. Исключением являются делеции, расположенные между экзонами 62 и 70. Такие делеции встречаются редко и составляют <10 % всех вариантов в гене [12]. Ранее было показано, что терапия, направленная на пропуск 1 экзона, теоретически применима для 79 % всех пациентов с делециями в гене *DMD*. Эта оценка была проведена на основании сведений обо всех вариантах в гене *DMD*, зарегистрированных в базе данных LOVD, которая в настоящее время является самой объемной и содержит наибольшее количество описанных вариантов в гене *DMD*. Согласно исследованию, для 54,0 % пациентов с МДД доступна терапия, направленная на пропуск экзона, причем среди пациентов с делециями эта доля составила 79,0 % [20]. В проанализированной нами выборке среди российских пациентов доля больных, для которых применима терапия путем пропуска экзона, составляет 29,3 % (331 из 1131) всех пациентов с вариантами в гене *DMD* и 62,1 % (331 из 533) пациентов с делециями (см. табл. 1). Такое отличие от мультиэтнической выборки можно объяснить различиями в спектре мутаций. У больных МДД/МДБ в РФ реже встречаются крупные делеции (47,1 %) по сравнению с исследованиями в других странах (65–70 %), что, скорее всего, связано с этническими различиями между популяциями [31]. В связи с этим доля пациентов, для которых применима терапия путем пропуска экзона, в РФ также снижена.

Доля пациентов с делециями в исследуемой выборке, для которых терапия путем пропуска экзона недоступна, составила 37,9 %. Часть больных имели либо делеции, не приводящие к сдвигу рамки считывания, либо протяженные делеции, затрагивающие >20 экзона. При большинстве таких делеций в первую очередь повреждаются актин-связывающий и С-концевой домены, являющиеся основными функциональными доменами белка дистрофина, при отсутствии которых нарушается работа дистрофин-ассоциированного гликопротеинового комплекса. Таким образом, восстановление рамки считывания при протяженных деле-

циях не приведет к синтезу даже частично функционального белка. Кроме того, есть группа пациентов, для которых необходим пропуск нескольких экзонов, так как пропуск первого до делеции экзона и последнего после нее могут не менять рамку считывания. Но в настоящее время такая методика в практику не внедрена.

Необходимо отметить, что для некоторых делеций возможно восстановление рамки считывания с использованием на выбор 2 антисмысловых олигонуклеотидов. Например, при делеции экзона 52, которая встречается в выборке пациентов РФ у 0,9 % (10 из 1131) пациентов, восстановление рамки считывания возможно при помощи пропуска как 51-го экзона, так и 53-го. Объединенные данные о применимости доступной в настоящее время терапии представлены в табл. 2.

Ранее было показано, что наиболее редко делеции локализируются в области цистеин-богатого и С-концевого доменов (экзоны 62–79) [21]. Суммарно доля пациентов с такими делециями составляет около 3,0 %. При оценке применимости терапии было выявлено, что только для 3 (0,3 %) больных пропуск экзонов теоретически доступен. В связи с этим разработка препаратов, направленных на пропуск этих экзонов, нецелесообразна и практически никак не скажется на оценке общей применимости данной терапии.

Среди российских пациентов доля больных, для которых применима терапия путем пропуска экзонов, составляет 29,30 % (331 из 1131). Среди всех выявленных пациентов только 14,7 % (166 из 1131) могут получить лечение существующими в настоящее время 4 препаратами, направленными на пропуск наиболее частых экзонов (препарат для пропуска 45-го экзона, препарат для пропуска 51-го экзона и 2 препарата для пропуска 53-го экзона) (табл. 3). Для оставшихся 14,6 % (165 из 1131) данная возможность пока является только теоретической. Сейчас разрабатываются потенциальные методы лечения МДД путем пропуска многих экзонов гена, и некоторые из них уже проходят ранние

клинические испытания [32]. Одним из примеров является терапия, направленная на пропуск 44-го экзона гена *DMD*, поскольку данный экзон является следующим по доле пациентов, для которых подходит терапия путем его пропуска. Этот экзон был выбран потому, что соседний 45-й экзон является часто делетируемым. В исследуемой выборке одиночная делеция 45-го экзона встречалась у 1,8 % (21 из 1131) пациентов. Таким образом, пропуск 44-го экзона у таких пациентов должен восстановить открытую рамку считывания, в результате чего будет синтезироваться частично функциональный дистрофин, что приведет к менее тяжелому течению заболевания. По предварительным оценкам, терапия может стать доступной для 7–11 % больных МДД [32, 33]. В исследуемой выборке предположительно 3,8 % (43 из 1131) больных с делециями подлежат терапии путем пропуска 44-го экзона. Также в настоящее время существует стратегия пропуска экзонов, направленная на 50-й и 52-й экзоны, которая проходит доклинические испытания [34]. Такой вид возможной терапии подходит для 2,2 и 1,9 % российских пациентов соответственно (см. табл. 1). Конечно, такое таргетное лечение является пока только теоретическим и подходит для относительно небольших групп больных МДД, однако это перспективное направление, поскольку для таких пациентов пока не существует альтернативного лечения.

Недостатком терапии, направленной на пропуск экзона, является то, что данный метод мутационно-специфический, поскольку разные варианты делеций требуют пропуска различных экзонов для восстановления рамки считывания. И для определения приоритетности разработки наиболее применимых препаратов необходимо знать долю пациентов, которым будет подходить данный препарат. Ранее было отмечено, что существует 2 «горячие точки», где наиболее часто локализируются протяженные делеции. Большинство патогенных вариантов (по оценкам, около 75 %) возникают

Таблица 2. Сравнение применимости терапии путем пропуска экзонов гена *DMD* существующими препаратами у больных мышечной дистрофией Дюшенна/Беккера в исследуемых выборках больных из Российской Федерации и выборках в других странах, %

Table 2. Comparison of the applicability of therapy by skipping exons of the *DMD* gene with existing drugs in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy in the studied samples of patients from the Russian Federation and samples in other countries, %

Экзон для пропуска Exon for skipping	Российская Федерация (n = 1131) Russian Federation (n = 1131)	C.L. Bladen et al. [10] (n = 7145)	M. Neri et al. [13], Италия (n = 1902) M. Neri et al. [13], Italy (n = 1902)	K.M. Flanigan et al. [35], США (n = 1111) K.M. Flanigan et al. [35], USA (n = 1111)	L. Luce et al. [34], Аргентина (n = 359) L. Luce et al. [34], Argentina (n = 359)
51	5,9	19,1	17,0	8,2	12,9
53	4,0	11,4	17,8	4,5	11,6
45	4,7	11,8	16,6	6,3	5,8
Всего Total	14,6	42,3	51,4	19,0	30,3

Таблица 3. Доступные и разрабатываемые препараты, направленные на пропуск экзона
Table 3. Exon skipping therapy available and in development

Экзон Exon	Препарат Drug	Статус Status	Эффект (в процентах от нормы) Effect (percentage of normal)	Возраст начала терапии Age at start of therapy
51	Этеплирсен (Эксондис 51) Eteplirsen (Exondys 51)	Одобен FDA 2016 FDA approved, 2016	Увеличение выработки дистрофина до 0,44 % (в 2,8 раза) Increase in dystrophin production up to 0.44 % (2.8 times)	От момента установления молекулярного диагноза From the moment of molecular diagnosis
45	Касимерсен (Амондис 45) Casimersen (Amondys 45)	Одобен FDA 2021 FDA approved, 2021	Увеличение выработки дистрофина до 1,74 % Increase in dystrophin production up to 1.74 %	До потери способности двигать руками Until lose the ability to move arms
53	Голодирсен (Виондис 53) Golodirsen (Vyondys 53)	Одобен FDA 2019 FDA approved, 2019	Увеличение выработки дистрофина до 1,019 % (в 16 раз) Increase in dystrophin production up to 1.019 % (16 times)	0–18 лет 0–18 years
53	Вилтоларсен (Вилтепсо) Viltolarsen (Viltepso)	Одобен Японией 2020 и FDA 2019 Japan 2020 and FDA 2019 approved	Увеличение выработки дистрофина до 1,92 % Increase in dystrophin production up to 1.92 %	4–10 лет 4–10 years
44	AOC 1044-CS1 (EXPLORE44)	Фаза I/IIa Phase I/IIa	—	7–27 лет 7–27 years
2	AAV9 U7snRNA	Фаза I/IIa Phase I/IIa	—	6 мес — 14 лет, подтвержденная дупликация экзона 2 6 months — 14 years, confirmed duplication of exon 2

между экзонами 45–55, многие из которых поддаются терапии путем пропуска экзона [27]. Так, например, 21 % делеций затрагивают 51-й экзон, 15 % — 53-й экзон, 13 % — 45-й экзон [10]. Именно поэтому эти экзоны являются перспективными мишенями для разработки патогенетической терапии. В проанализированной выборке также было выявлено, что большинство делеций локализованы между экзонами 45–55, таким образом, среди российских пациентов, как и во всем мире, это наиболее частые экзоны, пригодные для терапии путем их пропуска. Помимо этого, среди пациентов с делециями в РФ не было выявлено частых экзонов для пропуска, отличных от представленных в мультиэтнической выборке. Это доказывает и ранее представленное нами распределение делеций по гену *DMD* [14].

Первым одобренным препаратом для терапии в 2016 г. был препарат, направленный на пропуск 51-го экзона. Предполагалось, что наиболее распространенные делеции поддаются пропуску 51-го экзона — доля таких пациентов с МДД в мире составляет 13 % [35]. Такое же количество делеций наблюдалось в выборках пациентов из разных стран: 12,9 % в Аргентине и странах Латинской Америки [34], 8,2 % в США [36], 17 % в Италии [13]. В проанализированной нами выборке таких больных всего 5,9 %, и они также составляют самую большую группу среди российских пациентов (см. табл. 2). Применение данного препарата

приводит к увеличению экспрессии дистрофина и замедлению прогрессирования заболевания [36]. Также наблюдалось положительное влияние препарата на функцию легких у больных МДД [37].

Далее были разработаны и одобрены препараты, нацеленные на пропуск 45-го и 53-го экзона. По оценкам, доли пациентов в мире, для которых подходят данные препараты, составили 8,1 и 7,7 % соответственно [30, 31]. Среди пациентов РФ применимость данных препаратов оценивается в 4,7 и 4,0 % для терапии, направленной на пропуск 45-го и 53-го экзона соответственно (см. табл. 1).

Необходимо отметить, что применимость доступной и существующей в настоящее время терапии путем пропуска экзона в РФ практически в 2 раза ниже, чем в мультиэтнической выборке, а также в конкретных странах. Сравнение применимости терапии представлено в табл. 2. Такие отличия могут быть связаны как с тем, что среди российских пациентов доля всех больных с делециями значительно ниже, чем в ранее описанных исследованиях, так и с особенностями самого спектра делеций в РФ. Согласно представленным мировым данным, на делеции 1 или нескольких экзона приходится в среднем 60–70 % всех вариантов в гене *DMD* в зависимости от географического региона [38]. Ранее С. Нари Мбакан и соавт. было отмечено, что доля делеций широко варьирует. Так, в Океании она

составляет 64 %, в Европе — 66 %, в США — 70 %, в странах Африки — 72 % [39]. В РФ же доля протяженных делеций, затрагивающих 1 или несколько экзонов, составляет 47,1 % всех вариантов в гене *DMD*. Ранее было предположено, что такие различия в спектре мутаций в первую очередь связаны с этническими особенностями и различиями в мутагенных факторах и структуре хроматина в разных популяциях. Именно поэтому среди российских пациентов можно наблюдать снижение применимости терапии, направленной на пропуск экзонов, как теоретической, так и доступной на данный момент. Суммарно в настоящее время терапия доступна 14,6 % российских больных МДД, в то время как в мультиэтнической выборке — 42,3 % пациентов.

Кроме того, при сравнении применимости терапии, направленной на пропуск экзона, было отмечено, что в выборке пациентов, представленной исследователями из США, как и среди российских пациентов, отмечается снижение доли больных, для которых доступна терапия [35]. К.М. Flanigan и соавт. в первую очередь связывают это с предвзятостью отбора пациентов и недоступностью методов массового параллельного секвенирования длительное время, в связи с чем спектр мутаций является смещенным [35]. Но ранее нами было показано, что различие в спектре мутаций никак не связано с процессом отбора пациентов в проведенном исследовании [14].

Выводы

Терапия путем пропуска экзонов является новым и перспективным методом лечения МДД, позволяющим восстановить рамку считывания, в результате чего у пациентов будет синтезироваться усеченный, но

функционально активный белок дистрофин. Такой терапевтический подход позволяет замедлить прогрессирование заболевания, улучшить мышечную функцию у пациентов, а также отсрочить период до наступления утраты функций верхних конечностей. Данный вид терапии является мутационно-специфическим и имеет ограничения в применимости. Каждая группа препаратов будет актуальна только для определенной группы пациентов, в связи с чем сохраняется необходимость в разработке большего количества лекарственных агентов.

В результате проведенного исследования и анализа спектра мутаций в гене *DMD* среди пациентов с МДД в РФ была оценена теоретическая применимость терапии путем пропуска экзонов: для 29,3 % (331 из 1131) пациентов применим данный подход к лечению. Проведенное исследование применимости пропуска экзонов показало, что в российской выборке имеются достоверные различия по сравнению с мультиэтнической выборкой. В первую очередь это может быть связано с особенностями спектра мутаций в гене *DMD*, а именно небольшим количеством делеций в выборке российских пациентов (47,1 %) относительно мирового показателя (55–65 %). Также были оценены доли пациентов, для которых доступна существующая терапия путем пропуска экзонов. В настоящее время к применению одобрены 4 препарата, нацеленные на пропуск наиболее частых экзонов: 51, 53, 45, все они доступны в РФ. Суммарно пропуск частых экзонов применим для 14,6 % (166 из 1131) пациентов, среди которых терапия путем пропуска экзона 51 применима для 5,9 % (67 из 1131), терапия путем пропуска экзона 53 — 4,0 % (45 из 1131), терапия путем пропуска экзона 45 — 4,7 % (53 из 1131) пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Annexstad E.J., Lund-Petersen I., Rasmussen M. Duchenne muscular dystrophy. Tidsskr Nor Laegeforen 2014;134(14):1361–4. DOI: 10.4045/tidsskr.13.0836
2. Duan D., Goemans N., Takeda S. et al. Duchenne muscular dystrophy. Nat Rev Dis Primers 2021;7(1):13. DOI: 10.1038/s41572-021-00248-3
3. Wang L., Chen M., He R. et al. Serum creatinine distinguishes duchenne muscular dystrophy from becker muscular dystrophy in patients aged ≤3 years: A retrospective study. Front Neurol 2017;8:196. DOI: 10.3389/fneur.2017.00196
4. Porteous D., Davies B., English C. et al. An integrative review exploring psycho-social impacts and therapeutic interventions for parent caregivers of young people living with Duchenne's muscular dystrophy. Children (Basel) 2021;8(3):212. DOI: 10.3390/children8030212
5. Tuffery-Giraud S., Saquet C., Thorel D. et al. Mutation spectrum leading to an attenuated phenotype in dystrophinopathies. Eur J Hum Genet 2005;13(12):1254–60. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201478
6. Fortunato F., Farnè M., Ferlini A. The *DMD* gene and therapeutic approaches to restore dystrophin. Neuromuscul Disord 2021;31(10):1013–20. DOI: 10.1016/j.nmd.2021.08.004
7. Gao Q.Q., McNally E.M. The dystrophin complex: Structure, function, and implications for therapy. Compr Physiol 2015;5(3):1223–39. DOI: 10.1002/cphy.c140048
8. Elangkovan N., Dickson G. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. J Neuromuscul Dis 2021;8(s2):S303–16. DOI: 10.3233/JND-210678
9. Falzarano M.S., Scotton C., Passarelli C. et al. Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy. Molecules 2015;20(10):18168–84. DOI: 10.3390/molecules201018168
10. Bladen C.L., Salgado D., Monges S. et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. Hum Mutat 2015;36(4):395–402. DOI: 10.1002/humu.22758
11. Aartsma-Rus A., Ginjaar I.B., Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. J Med Genet 2016;53(3):145–51. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103387
12. Aartsma-Rus A., Van Deutekom J.C., Fokkema I.F. et al. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. Muscle Nerve 2006;34(2):135–44. DOI: 10.1002/mus.20586

13. Neri M., Rossi R., Trabanello C. et al. The genetic landscape of dystrophin mutations in Italy: A nationwide study. *Front Genet* 2020;11:131. DOI: 10.3389/fgene.2020.00131
14. Zinina E., Bulakh M., Chukhrova A. et al. Specificities of the *DMD* gene mutation spectrum in Russian patients. *Int J Mol Sci* 2022;23(21):12710. DOI: 10.3390/ijms232112710
15. Schneider A.E., Aartsma-Rus A. Developments in reading frame restoring therapy approaches for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther* 2021;21(3):343–59. DOI: 10.1080/14712598.2021.1832462
16. Takeda S., Clemens P.R., Hoffman E.P. Exon-skipping in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuromuscul Dis* 2021;8(s2):S343–58. DOI: 10.3233/JND-210682
17. Yokota T., Duddy W., Partridge T. Optimizing exon skipping therapies for DMD. *Acta Myol* 2007;26(3):179–84.
18. Lim K.R., Maruyama R., Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther* 2017;11:533–45. DOI: 10.2147/DDDT.S97635
19. Eser G., Topaloglu H. Current Outline of exon skipping trials in Duchenne muscular dystrophy. *Genes (Basel)* 2022;13(7):1241. DOI: 10.3390/genes13071241
20. Aartsma-Rus A., Fokkema I., Verschuuren J. et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 2009;30(3):293–9. DOI: 10.1002/humu.20918
21. Brolin C., Shiraishi T. Antisense mediated exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Artif DNA PNA XNA* 2011;2(1):6–15. DOI: 10.4161/adna.2.1.15425
22. Wood M.J., Gait M.J., Yin H. RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain* 2010;133(Pt 4):957–72. DOI: 10.1093/brain/awq002
23. Wizard Genomic DNA Purification Kit Quick Protocol. Available at: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf?rev=4cc2e14ff84c4281a97eb50b32755c33&sc_lang=en.
24. MRC Holland. Available at: <https://www.mrcholland.com>.
25. Variant-specific Therapies. Available at: <https://www.parentprojectmd.org/about-duchenne/what-is-duchenne/types-of-mutations/mutation-specific-therapies/>.
26. Hapfi Mbakam C., Roustant J., Rousseau J. et al. Prime editing strategies to mediate exon skipping in *DMD* gene. *Front Med (Lausanne)* 2023;10:1128557. DOI: 10.3389/fmed.2023
27. Aartsma-Rus A., de Waele L., Houwen-Opstal S. et al. The dilemma of choice for Duchenne patients eligible for exon 51 skipping: The European experience. *J Neuromuscul Dis* 2023;10(3):315–25. DOI: 10.3233/JND-221648
28. Dominski Z., Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(18):8673–7. DOI: 10.1073/pnas.90.18.8673
29. Aartsma-Rus A., van Ommen G.J. Antisense-mediated exon skipping: A versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* 2007;13(10):1609–24. DOI: 10.1261/rna.653607
30. Niks E.H., Aartsma-Rus A. Exon skipping: A first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17(2):225–36. DOI: 10.1080/14712598.2017.1271872
31. Juan-Mateu J., Gonzalez-Quereda L., Rodriguez M.J. et al. *DMD* mutations in 576 dystrophinopathy families: A step forward in genotype-phenotype correlations. *PLoS One* 2015;10(8):e0135189. DOI: 10.1371/journal.pone.0135189
32. Ishizuka T., Komaki H., Asahina Y. et al. Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-089/NCNP-02 for skipping of exon 44 in patients with Duchenne muscular dystrophy: Study protocol for a phase I/II clinical trial. *Neuropsychopharmacol Rep* 2023;43(2):277–86. DOI: 10.1002/npr2.12335
33. Barthélémy F., Wang R.T., Hsu C. et al. Targeting RyR Activity boosts antisense exon 44 and 45 skipping in human *DMD* skeletal or cardiac muscle culture models. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;18:580–9. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.09.020
34. Luce L., Carcione M., Mazzanti C. et al. Theragnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Front Pharmacol* 2021;12:648390. DOI: 10.3389/fphar.2021.648390
35. Flanigan K.M., Dunn D.M., von Niederhausern A. et al. Mutational spectrum of *DMD* mutations in dystrophinopathy patients: Application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat* 2009;30(12):1657–66. DOI: 10.1002/humu.21114
36. Waldrop M.A., Yaou R.B., Lucas K.K. et al. Clinical phenotypes of *DMD* exon 51 Skip equivalent deletions: A systematic review. *J Neuromuscul Dis* 2020;7(3):217–29. DOI: 10.3233/JND-200483
37. Lim K.R., Maruyama R., Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther* 2017;11:533–45. DOI: 10.2147/DDDT.S97635
38. Frank D.E., Schnell F.J., Akana C. et al. Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2020;94(21):e2270–82. DOI: 10.1212/WNL.00000000000009233
39. Hapfi Mbakam C., Lamothe G., Tremblay J.P. Therapeutic strategies for dystrophin replacement in Duchenne muscular dystrophy. *Front Med (Lausanne)* 2022;9:859930. DOI: 10.3389/fmed.2022.859930

Вклад авторов

А.В. Поляков, О.А. Шагина, О.П. Рыжкова: разработка дизайна и концепции исследования, редактирование статьи;
Е.В. Зинина, М.В. Булах: проведение лабораторной молекулярно-генетической диагностики, обработка материала, анализ полученных данных, написание и редактирование статьи.

Authors' contributions

A.V. Polyakov, O.A. Shchagina, O.P. Ryzhkova: development of research design and concept, editing the article;
E.V. Zinina, M.V. Bulakh: conducting laboratory molecular genetic diagnostics, analysis of results obtained, writing and editing the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Зинина / E.V. Zinina: <https://orcid.org/0000-0001-5017-7996>
М.В. Булах / M.V. Bulakh: <https://orcid.org/0000-0002-8674-7230>
О.П. Рыжкова / O.P. Ryzhkova: <https://orcid.org/0000-0003-1285-9093>
О.А. Шагина / O.A. Shchagina: <https://orcid.org/0000-0003-4905-1303>
А.В. Поляков / A.V. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0002-0105-1833>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Государственное бюджетное финансирование.

Funding. State budget financing.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Исследование проведено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации, протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» (протокол № 2021-3 от 12.03.2021). Законные представители пациентов дали письменное информированное согласие на проведение молекулярно-генетического тестирования образцов крови и разрешение на анонимную публикацию результатов исследования.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, the study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 2021-3 dated 12 March, 2021). Legal representatives of patients signed written informed consent to molecular-genetic testing and publication of patients' anonymized data.