

MODULACIJA POVEZOVANJA EKSONOV S PROTISMISELNIMI OLIGONUKLEOTIDI KOT TERAPEVTSKA STRATEGIJA

SPLICING MODULATION WITH ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AS A THERAPEUTIC STRATEGY

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Številne genske bolezni so posledica mutacij, ki vodijo v napake pri procesiranju primarnih genskih prepisov (pre-mRNA). Izrezovanje intronov in povezovanje eksonov katalizira ribonukleoproteinski kompleks, imenovan spajalno telesce, proces pa nadzirajo številni proteinski dejavniki, ki se vežejo na regulatorna zaporedja pre-mRNA in bodisi spodbujajo ali zavirajo vključevanje posameznih eksonov v zrelo mRNA. S sintezniimi oligonukleotidi, komplementarnimi regulatornim zaporedjem na pre-mRNA, lahko zelo specifično zaviramo vezavo proteinskih dejavnikov in posledično vplivamo na profil povezovanja eksonov (ter s tem na strukturo in funkcijo proteinskega produkta) s ciljem doseči terapevtski izid. Nedavno sta Evropska agencija za zdravila (EMA) in ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) odobrili uporabo prvih terapevtskih protismiselnih oligonukleotidov, ki modulirata proces povezovanja eksonov, za zdravljenje spinalne mišične atrofije in Duchennove mišične distrofije. V prispevku je podrobneje predstavljen terapevtski potencial te nove skupine učinkovin, njihovi mehanizmi delovanja ter omejitve, s katerimi se srečujejo pri razvoju.

KLJUČNE BESEDE:

Duchennova mišična distrofija, povezovanje eksonov, protismiselni oligonukleotidi, spinalna mišična atrofija

ABSTRACT

Many gene diseases arise from mutations responsible for incorrect primary transcript (pre-mRNA) processing. RNA splicing (exon joining and intron removal) is catalyzed by a ribonucleoprotein complex termed the spliceosome, and regulated by numerous protein factors binding to pre-mRNA regulatory sequences, thereby either promoting or suppressing specific exon inclusion. In order to achieve therapeutic results, the binding of protein factors to pre-mRNA can be blocked by synthetic complementary (antisense) oligonucleotides. In turn, the splicing profile (i.e. exon usage) is changed, leading to modified protein product structure and function. Recently, European Medicinal Agency (EMA) and the US Food and Drug Administration (FDA) have approved the first two antisense oligonu-



cleotide drugs that modulate splicing for the treatment of spinal muscular atrophy and Duchenne muscular dystrophy. Here, the therapeutic potential and mechanisms of action of antisense oligonucleotide splicing modulators are reviewed, and their limitations are discussed.

KEY WORDS:

antisense oligonucleotides, Duchenne muscular dystrophy, RNA splicing, spinal muscular atrophy

1 UVOD

V nasprotju s prokariotskimi (bakterijskimi in arhejskimi) je večina evkariontskih genov, ki kodirajo proteine, sestavljena iz izmenjujočih se eksonskih in intronskih nukleotidnih zaporedij. V procesu »zorenja« primarnega genskega prepisa (prekurzorske mRNA (pre-mRNA); molekule RNA, ki predstavlja neposreden prepis gena) se v jedru celic introni izrežejo, eksoni pa povežejo med seboj in tvorijo »zrelo« informacijsko RNA (mRNA). Ta proces, imenovan povezovanje (spajanje) eksonov (tudi izrezovanje intronov, *splicing*; slika 1A), katalizira dinamični ribonukleoproteinski izrezovalno-povezovalni kompleks oz. spajalno telesce (*spliceosome*), sestavljen iz malih jedrnih RNA (*small nuclear RNAs*, snRNAs) in številnih proteinov (1). Spajalno telesce prepozna kratke nukleotidne motive na meji med introni in eksoni, pri čemer njegovo interakcijo s pre-mRNA usmerjajo različni proteini z vezavo na cis-regulatorne elemente (specifična nukleotidna zaporedja) primarnega genskega prepisa (2, 3) (slika 1B). Zrela mRNA prenese informacijo za sintezo proteinov v citosol, kjer jo preda ribosomom.

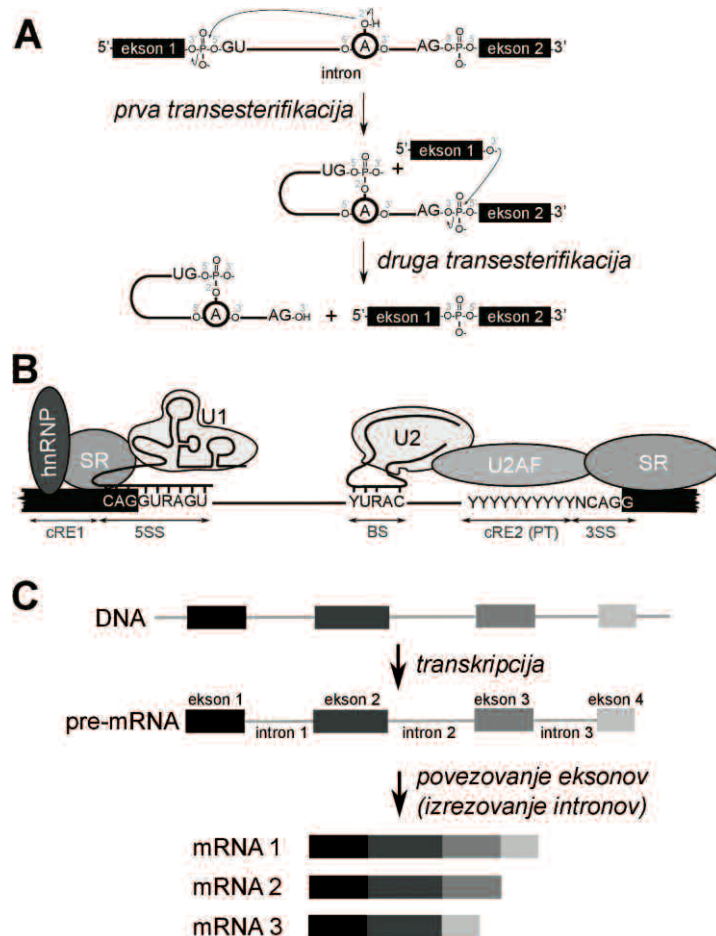
Analize transkriptoma (sekvenciranje mRNA (4)) so razkrile, da v različnih tkivih pogosto s prepisovanjem istih genov na račun alternativnega povezovanja eksonov (slika 1C) poteka sinteza proteinskih izooblik z nekoliko različnimi funkcijami. Različna raba genske informacije je v nekaterih primerih povezana tudi z razvojno stopnjo organizma ali z odzivom na fiziološke dražljaje (5). Mehanizmi, ki uravnavajo nastajanje posamezne spojivitvene različice, so zapleteni in še ne povsem pojasnjeni, nedvomno pa igrajo pri tem osrednjo vlogo RNA-vezavni proteini kot trans-delujoči dejavniki. Ti se vežejo na cis-regulatorne elemente v eksonih ali intronih pre-mRNA in bodisi spodbudijo vključitev (rabo) določenega eksona (z vezavo na ojačevalna zaporedja) ali pa jo zavrejo (z vezavo

na utiševalna zaporedja; slika 2A). Alternativno povezovanje eksonov prispeva k učinkovitejši izrabi sicer omejene genske informacije. Tako (vsaj deloma) pojasnjujemo tudi razlike med posameznimi vrstami celic ter zapletenost organizmov (6). Ocenjujejo, da alternativno spajanje eksonov poteka pri več kot 95 % človeških genov (4).

Številne genske bolezni so posledica mutacij v cis-regulatornih elementih, ki spremenijo profil povezovanja eksonov (7, 8). Nekatere mutacije prek izključitve določenega eksona (ali zaviranja izrezovanja introna) vodijo v premik bralnega okvirja in s tem onemogočajo tvorbo funkcionalnih proteinov. Tako tudi mutacije oz. polimorfizmi posameznih nukleotidov v intronih ali eksonske sinonimne mutacije (točkovne mutacije, ki sicer spremenijo kodon, a ta še vedno zapisuje isti aminokislinski ostanek) lahko vodijo v napačno procesiranje pre-mRNA, ki je vzrok bolezenskemu stanju (9). S kratkimi sintezni oligonukleotidi, komplementarnimi cis-regulatornim elementom na pre-mRNA (t. i. protismislnimi oligonukleotidi, ASO, *antisense oligonucleotide*), je mogoče ovirati vezavo endogenih trans-delujočih RNA in proteinov ter s tem modulirati proces izrezovanja intronov in povezovanja eksonov (slika 2B) z namenom doseči terapevtski učinek (10). Podoben endogeni način uravnavanja procesa zorenja so, zanimivo, opisali tudi za mRNA serotonininskega receptorja 2c, kjer nekodirajoča RNA SNORD115 z vezavo na utiševalno zaporedje v alternativnem eksonu 5b spodbudi nastanek daljše proteinske spojivitvene izooblike, ki ima sposobnost prenosa signala, medtem ko krajša ne doseže celične membrane (11, 12).

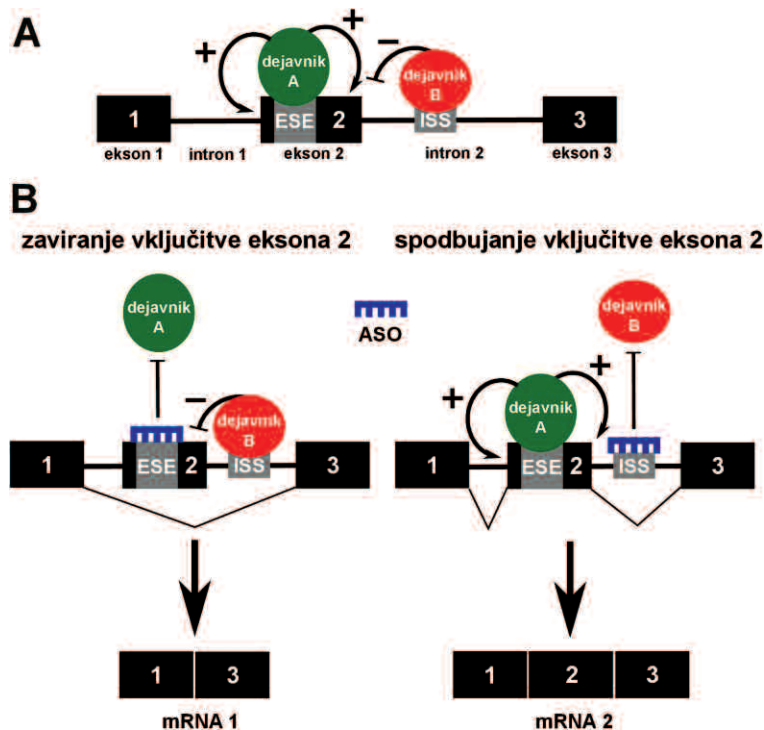
2 KEMIZEM, MEHANIZMI DELOVANJ IN FARMAKOKINETIKA PROTISMISLNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Protismislni oligonukleotidi (ASO) so sintezne spojine, zgrajene iz 15 do 30 nukleotidov ali njihovih analogov, katerih zaporedje je načrtovano tako, da so komplementarni (pre-)mRNA (15). Učinkujejo po več mehanizmi, kar je primarno povezano z njihovo strukturo (tj. z modifikacijami nukleotidnih gradnikov; slika 3) (16). Ker so RNA-oligonukleotidi neobstojni *in vivo* (občutljivi so na razgradnjo z RNazami), uporabljamo pri sintezi terapevtskih ASO nenaravne nukleotide s spremenjenim sladkorno-fosfatnim ogrodjem. Fosforotioatni analogi (kjer je en kisikov atom fosfatne skupine zamenjan za žveplovega) so sicer odporni



Slika 1: Shematska ponazoritev izrezovanja intronov (predstavljeni kot črte) in povezovanja eksonov (pravokotniki; prirejeno po (13, 14)). **A.** Mehanizem povezovanja eksonov: eksona, ki ju loči intronsko zaporedje, se spojeta v dveh zaporednih reakcijah transesterifikacije, pri tem izstopi intron v obliki zanke. Donorsko mesto introna (na 5'-koncu) ima ohranjeno dinukleotidno zaporedje GU, akceptorsko (na 3'-koncu) se zaključuje z AG. V bližini slednjega se nahaja t. i. razvejitevno mesto z adenozinom (obkrožen), katerega 2'-OH skupina riboze napade fosfatno skupino donorskega gvanozinskega ostanka. **B.** Podrobnejša ponazoritev regulatornih elementov, ki uravnavajo proces povezovanja eksonov. Ohranjeno zaporedje 5'-spojitvenega mesta (5SS) prepozna mala jedrna RNA (snRNA) U1, razvejitevno mesto pa snRNA U2 (obe sta del ribonukleoproteinskih kompleksov (snRNP), ki skupaj z drugimi komponentami (niso prikazane) tvorita spajalno telesce). Pri vezavi snRNP na pre-mRNA sodelujejo številni trans-delujoči dejavniki, kot so heterogeni jedrni ribonukleoproteini (hnRNP), proteini, bogati s serini in arginini (SR), ter pomožni dejavnik U2 (U2AF). cRE1 in cRE2 – cis-regulatorna elementa, BS – razvejitevno mesto, PT – polipirimidinski trakt, 3SS – 3'-spojitveno mesto, Y – pirimidinski nukleotid (C ali U), R – purinski nukleotid (A ali G), N – poljubni nukleotid. **C.** Alternativno povezovanje eksonov, ki vodi do treh spojitvenih različic mRNA.

Figure 1: Schematic representation of pre-mRNA splicing. Exons are depicted as boxes, while introns are shown as thin lines (adapted from refs. (13, 14)). **A.** Splicing mechanism: exons separated by an intron are joined in two subsequent transesterification reactions. The intron is released in the form of lariat. Intron donor site (at the 5' end of intron) and acceptor site (at the 3' end) harbour conserved GU and AG dinucleotide sequences, respectively. Upstream of the AG motif there is a branch site (BS) containing adenosine (circled), whose 2'-ribose OH-group attacks the phosphate group of the donor site guanosine residue. **B.** Detailed depiction of regulatory elements governing splicing. The conserved motif of 5' splice site (5SS) is recognized by small nuclear RNA (snRNA) U1, while that of 3' splice site (3SS) is bound by snRNA U2 (both snRNAs are an integral part of ribonucleoprotein complexes (snRNP) that, together with other components (not shown), form the spliceosome. The binding of snRNPs to pre-mRNA is guided by numerous trans-acting factors, such as heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), serine/arginine-rich proteins (SR), and U2 auxiliary factor (U2AF). cRE1 and cRE2 – cis-regulatory elements, PT – polypyrimidine tract, Y – pyrimidine nucleotide (i.e., C or U), R – purine nucleotide (i.e., A or G), N – polypurine nucleotide. **C.** Alternative splicing resulting in three different mRNA splice variants being produced from a single gene.



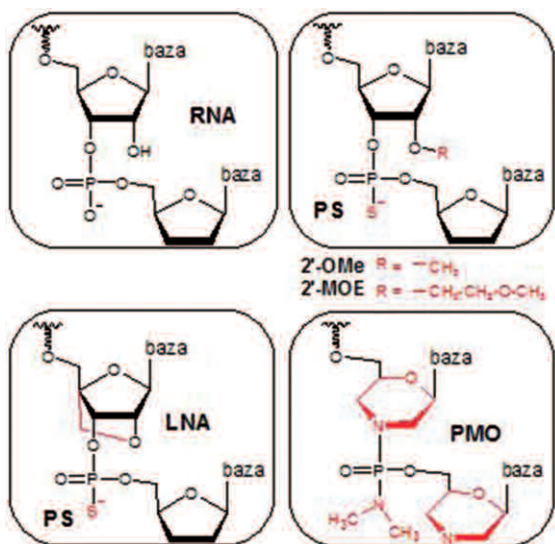
Slika 2: Modulacija povezovanja eksonov s protismiselnimi oligonukleotidi (prirejeno po (10)). **A.** Shematična ponazoritev pre-mRNA z eksoni (črni pravokotniki) in introni (tanke črte). Na intronski utiševalen (ISS) in eksonski ojačevalen regulatorni element (ESE; siva pravokotnika) sta vezana trans-delujoča dejavnika (elipsi), ki bodisi zavirata (-) ali spodbujata (+) vključitev eksona 2. **B.** Protismiselni oligonukleotid (ASO), komplementaren ESE (levo), prepreči vezavo dejavnika A na pripadajoče ojačevalno zaporedje, kar vodi v izpustitev (preskok) eksona 2. ASO, komplementaren ISS (desno), onemogoči vezavo zaviralnemu dejavniku B na utiševalno regulatorno zaporedje, s čimer spodbudi vključitev eksona 2.

Figure 2: Modulation of splicing by antisense oligonucleotides (ASOs; adapted from ref. (10)). **A.** Schematic depiction of pre-mRNA with exons (black boxes) and introns (thin lines). Exonic splicing enhancer (ESE) and intronic splicing silencer (ISS) regulatory elements (shown as grey boxes) are bound by trans-acting factors A and B, respectively. They either block (-) or promote (+) exon 2 inclusion. **B.** ASO complementary to ESE (left) displaces splicing factor A, thereby inhibiting exon 2 inclusion (i.e., promotes exon 2 skipping). In contrast, ASO complementary to ISS prevents the binding of negatively acting splicing factor B, thus promoting exon 2 inclusion.

proti nukleazam, a se na (pre-)mRNA vežejo z nižjo afiniteto (17). Zaradi negativnega naboja se vežejo na plazemske proteine, kar je ugodno z vidika dolge biološke razpolovne dobe (počasneje se odstranjujejo z glomerulno filtracijo), a izzovejo nekatere neželene učinke, kot so aktivacija kompleksa, podaljšanje protrombinskega časa in okvara ledvične funkcije (18). Dodatne modifikacije nukleotidov, zlasti metilacija in metoksietilacija 2'-OH skupine riboze, doprinesejo k odpornosti ASO proti RNazam (17), medtem ko metilenski most med 2'-OH skupino in atomom C4 riboze (t. i. LNA, *locked nucleic acids*) spremeni topologijo ASO v smeri višje afinitete vezave na tarčno RNA (19). Fosfordiamidatni morfolinski analogi nukleotidov niso negativno nabiti in se zato manj vežejo na plazemske proteine;

kot taki se sicer hitreje odstranjujejo iz organizma, a izkazujejo ugodnejši toksikološki profil (20).

Protismiselni oligonukleotidi kot učinkovine niso novost. FDA in EMA sta že pred dvajsetimi leti odobrili uporabo **fomivirsena**, 21 nukleotidov dolgega fosforotioatnega ASO za zdravljenje citomegalovirusnega retinitisa pri imunsko oslabiljenih bolnikih, primarno tistih z aidsom. Zdravilo so aplicirali lokalno v obliki intravitrealne injekcije. Fomivirsen z vezavo na mRNA *UL123* **s sterično blokado onemogoča translacijo** tega za replikacijo virusa esencialnega gena (21). Po le nekaj letih je nosilec tržnega dovoljenja zdravilo samoiniciativno umaknil, saj je v vmesnem obdobju prišlo do precejšnjega napredka pri zdravljenju okužb z virusom HIV in s tem bistveno manjše potrebe po fomivir-



Slika 3: Primerjava struktur oligonukleotidnih analogov (prirejeno po (10)): RNA – ribonukleinska kislina, PS – fosforotioat, 2'-O-Me – 2'-O-metil, 2'-MOE – 2'-O-metokisietil, LNA – analog z metilenskim mostičkom med 2'-OH skupino in atomom C4 riboze, PMO – fosforodiamidatni morfolinski analog.

Figure 3: Comparison of oligonucleotide analogues' structures (adapted from ref. (10)): RNA – ribonucleic acid, PS – phosphorothioate, 2'-O-Me – 2'-O-methyl, 2'-MOE – 2'-O-methoxyethyl, LNA – locked nucleic acid, PMO – phosphorodiamidate morpholino analogue.

senu. Še en primer ASO kot učinkovine je **mipomersen**, v ZDA odobren leta 2013 za zdravljenje družinske hiperholesterolemije, genske bolezni, ki je posledica mutacij obeh alelov gena za LDL-receptor (EMA je izdajo tržnega dovoljenja zavrnila zaradi hepatotoksičnosti). Mipomersen je 21-nukleotidni fosforotioatni ASO z deoksiribozami na osrednjih nukleotidih, medtem ko so gradniki na 5'- in 3'-koncih 2'-O-metoksietilirani. Komplementaren je mRNA za apolipoprotein B-100 (ApoB-100) in deluje tako, da **aktivira razgradnjo tarčne RNA z RNazo H** (endonukleazo, ki katalizira hidrolizo RNA v heterodupleksu RNA:DNA); posledično omejuje nastanek ApoB-100, glavne proteinske komponente lipoproteinov z nizko gostoto (LDL) (21). Aplikiramo ga subkutano, zdravljenje je dovoljeno le v kontekstu strogega načrta obvladovanja tveganja. Predstavniki nove skupine terapevtskih ASO (preglednica 1) so načrtovani tako, da so komplementarni cis-regulatornim elementom na pre-mRNA (10, 15), zato **ovirajo vezavo trans-delujočih dejavnikov** (slika 2) ter tako **spajalno telesce usmerjajo k specifičnemu spojitvenemu mestu ali ga odvrčajo od njega**, s čimer je moč

preusmeriti profil nastalih spojitvenih izooblik mRNA. Najpomembnejše predstavnike podrobneje predstavljamo v poglavju 3.

ASO apliciramo subkutano ali intravensko, če je cilj dostava v določena tkiva, tudi intramuskularno ali intravitrealno. Slabo prehajajo krvno-možgansko pregrado, zato je za dostavo v centralni živčni sistem potrebno poseči po intratekalni ali celo intracerebroventrikularni aplikaciji (10). Opažanja iz poskusov na živalih nakazujejo, da so vplivi ASO na povezovanje eksonov že po enkratni aplikaciji razmeroma dolgotrajni, v nekaterih tkivih vztrajajo tudi več kot šest mesecev (28, 29). V celice tudi *in vivo* vstopajo v »goli« obliki, tj. ne da bi jih vgrajevali v liposome ali nanodelce. Fosforotioatni oligonukleotidi se neposredno vežejo na nekatere celične receptorje (30), domnevno pa privzem poteka tudi posredno z receptorsko endocitozo; po tej poti vstopajo v celice številni proteini, na katere so vezani ASO (10). Kako ASO izstopijo iz endosomov v citosol in nato preidejo v jedro, še ni povsem pojasnjeno (31, 32).

3 PROTISMISLNI OLIGONUKLEOTIDI KOT MODULATORJI POVEZOVANJA EKSONOV

3.1 DUCHENNOVA MIŠIČNA DISTROFIJA

Duchennova mišična distrofija (DMD (33)) je huda progresivna genska bolezen. Nastopi zaradi mutacij v genu za distrofin (*DMD*), ki se nahaja na spolnem kromosomu X, in v povprečju prizadene enega na 5000 dečkov. Distrofin je strukturni protein, ki v skeletnih mišičnih celicah povezuje citoskelet z distroglikanskim membranskim kompleksom, ta pa omogoča pritrjevanje celic na zunajcelični matriks. Gen za distrofin je eden najdaljših genov pri človeku (razteza se prek 2,3 milijona baznih parov, kar predstavlja kar okoli 0,08 % človeškega genoma, in je sestavljen iz 79 eksonov), zato so mutacije v tem genu razmeroma pogoste. Večina mutacij predstavljajo delecije eksonov, ki so razlog za premik bralnega okvirja in oblikovanje prezgodnjega zaključnega kodona. To se odraža v odsotnosti distrofina, kar vodi v progresivno pešanje mišic in invalidnost že v otroštvu. V večini primerov bolniki umrejo zaradi zapletov, povezanih z odpovedjo dihalnih mišic, ali kardiomiopatij. Zelo podobno klinično sliko ima redkejša Beckerjeva mišična distrofija (BMD), le da se bolezen pojavi kasneje in na-

Preglednica 1: Izbrani predstavniki protismiselnih oligonukleotidov (ASO), ki delujejo kot modulatorji povezovanja eksonov.

Table 1: Selected splicing-modifying antisense oligonucleotides.

ASO	Terapevtska indikacija ^a	Tarčna pre-mRNA	Mehanizem delovanja	Razvojna faza	Referenca ^b
Nusinersen (ISIS 396443)	SMA	SMN2	Spodbujanje vključitve eksona 7; nastanek funkcionalne izooblike proteina SMN2	Dovoljenje za promet v EU in ZDA	NCT01494701 NCT01703988 NCT01780246 NCT01839656 NCT02052791 NCT02193074 NCT02292537 NCT02386553 NCT02462759 NCT02594124 NCT02865109 NCT03709784
Eteplirsen (AVI-4658)	DMD	DMD	Preskok eksona 51; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	Uporaba pogojno odobrena v ZDA; EMA dovoljenja za promet ni priporočila	NCT00159250 NCT00844597 NCT01396239 NCT01540409 NCT02255552 NCT02286947 NCT02420379 NCT03218995
Drisapersen (PRO051, GSK2402968)			Preskok eksona 51; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	Razvoj ustavljen po F III	NCT01153932 NCT01480245 NCT01803412 NCT01910649 NCT02636686
Golodirsen (SRR-4053)			Preskok eksona 53; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I/II	NCT02310906
Kazimersen (SRP-4045)			Preskok eksona 45; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I	NCT02530905
Kazimersen (SRP-4045) in golodirsen (SRR-4053)			Preskok eksonov 45 ali 53; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F III	NCT02500381 NCT03532542
PRO044 (BMN-044)			Preskok eksona 44; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F II	NCT01037309 NCT02329769 NCT02958202

PRO045 (BMN-045)			Preskok eksona 45; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I/II	NCT01826474
DS-5141b			Preskok eksona 45; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I/II	NCT02667483
ASO-021	Alzheimerjeva bolezen	<i>APOER2</i>	Spodbujanje vključitve eksona 19; nastanek funkcionalnega receptorja APOER2	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(22)
"4R to 3R splicing ASO"	Alzheimerjeva bolezen in druge taupatije	<i>tau (MAPT)</i>	Preskok eksona 10; promocija krajše izoblike proteina Tau, manj podvržene fosforilaciji in agregaciji	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(23)
ASO MDM4	Rak	<i>MDM4</i>	Preskok eksona 6; razgradnja transkripta onkogenega MDM4 s prezgodnjim zaključnim kodonom (angl. <i>nonsense-mediated decay</i>)	predklinični dokaz koncepta na več melanomskih celičnih linijah ter na ksenograftih	(24)
ST2	Rak	<i>STAT3</i>	Spodbujanje rabe alternativnega akceptorskega mesta povezovanja v eksonu 23; nastanek proapoptotične izoblike proteina STAT3β	predklinični dokaz koncepta na dveh celičnih linijah raka dojke ter na ksenograftih	(25)
"APO-skip SSO"	Družinska hiperholesterolemija	<i>APOB</i>	Preskok eksona 27; nastanek krajše izoblike proteina APOB, ki zavira sestavljanje LDL	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(26)
AON5 in AON6 (dostava z adenoasociacijskim virusnim vektorjem)	Hipertrofična kardiomiopatija	<i>MYBPC4</i>	Preskok eksonov 5 in 6; nastanek krajše delno funkcionalne oblike proteina cMyBP-C	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(27)

^a SMA – spinalna mišična atrofija, DMD – Duchennova mišična distrofija

^b Za klinična vrednotenja so podane identifikacijske številke raziskav iz mednarodne podatkovne zbirke *ClinicalTrials.gov* (<https://clinicaltrials.gov/>)



preduje počasneje. Tudi vzrok BMD so mutacije v genu za distrofin, a te (za razliko od DMD) ne porušijo bralnega okvirja. Opazanja, da so krajše oblike distrofina (npr. zaradi delecij nekaterih celotnih eksonov) delno funkcionalne (34), so porodile idejo o terapevtski uporabi ASO za preskakanje posameznih eksonov distrofina pri DMD s ciljem ponovno vzpostaviti pravilni bralni okvir (10) (slika 4A).

Okoli 70 % mutacij, ki izzovejo DMD, zajema delecijo regij gena za distrofin med eksonoma 45 in 55 (15, 35). Izpustitev (preskok) eksona 51 bi teoretično izzval terapevtski učinek pri ~14 % bolnikov z DMD, saj bi omogočil nastanek distrofina, kakršnega opazamo pri bolnikih z BMD (10, 15). V predkliničnih raziskavah, izvedenih na človeških celicah *in vitro* ter na mišjem modelu DMD, so dokazali izvedljivost tovrstnega terapevtskega koncepta; v klinično vrednotenje je vstopilo več učinkovin ASO (36), najbolj znani sta drisapersen ter eteplirsena.

Drisapersen je fosforotioatni, 2'-O-metilirani ASO iz 20 nukleotidov, ki se selektivno veže na ojačevalno zaporedje v eksonu 51 pre-mRNA *DMD* in tako spodbuja preskok tega eksona ter vzpostavitve bralnega okvirja in nastanek krajše, a delno funkcionalne oblike distrofina. Zgodnje klinične raziskave (37, 38), opravljene na majhnih skupinah dečkov z DMD, so nakazovale učinkovitost drisapersena po intramuskularnem ali subkutanem injiciranju, saj so z imunohistokemijsko analizo biopsijskih vzorcev mišic potrdili nastajanje distrofina, udeleženci raziskave pa so izkazovali tudi napredek v šestminutnem testu hoje (6MTH). V drugi fazi kliničnega vrednotenja (študija DEMAND 2 (39)) so primerjali učinkovitost zdravljenja DMD po kontinuirani ali intermitentni subkutani aplikaciji drisapersena in placebo pri 53 dečkih. Po 25 tednih zdravljenja so poročali o statistično značilnem napredku pri 6MTH ter majhnem porastu izražanja distrofina na nivoju mRNA in proteina v skupini, ki je prejela drisapersen. Tretja klinična faza (DEMAND 3 (36)), ki je zajela 186 dečkov z DMD, zdravljenih 48 tednov s 6 mg drisapersena subkutano/kg/teden, ni potrdila učinkovitosti (tj. razlik v 6MTH glede na placebo niso zaznali), a so bili vključitveni kriteriji za študiji DEMAND 2 in 3 različni. Poleg tega so se pri udeležencih pojavili resni neželeni učinki zdravljenja (61 % je utrpelo poškodbe ledvic, pri 2 % sodelujočih je prišlo do hude trombocitopenije), zato so nadaljnji razvoj drisapersena ustavili.

Eteplirsena je morfolinski fosforodiamidatni ASO dolžine 30 nukleotidov, ki se veže na isto vezavno mesto kot drisapersen in ima enak mehanizem delovanja. V zgodnjih kliničnih vrednotenjih intravensko ali intramuskularno apliciranega eteplirsena so potrdili vpliv na spodbujanje nastajanja distrofina z imunohistokemijsko analizo biopsijskih

vzorcev (učinek je bil odvisen od odmerka eteplirsena), ne pa tudi izboljšanja mišične funkcije (40, 41). V kliničnih raziskavah, ki sta zajeli daljše časovno obdobje (48 tednov + nadaljnjih 36 mesecev (42, 43)), so ob vplivu na povečano izražanje distrofina (sicer vsega 0,93-odstotni porast po 180 tednih zdravljenja) poročali tudi o počasnejšem napredovanju bolezni (glede na kontrolno skupino obolelih za DMD primerljive stopnje bolezni in starosti). Resnih neželenih učinkov niso zaznali. Na osnovi teh rezultatov je FDA septembra 2016 po pospešenem postopku pogojno odobrila uporabo eteplirsena za zdravljenje DMD pri bolnikih, kjer je terapevtski učinek moč pričakovati s preskokom eksona 51. Priporočeni odmerek eteplirsena je 30 mg/kg/teden, apliciran z infuzijo. Lastnika tržnega dovoljenja je FDA hkrati zavezala k postmarketinškemu vrednotenju klinične učinkovitosti (do maja 2021), saj sta ključni klinični raziskavi zajeli le 12 bolnikov. Nasprotno je Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini (CHMP) pri EMA maja 2018 izrazil negativno mnenje in ni priporočil odobritve dovoljenja za promet z zdravilom v Evropski uniji (44).

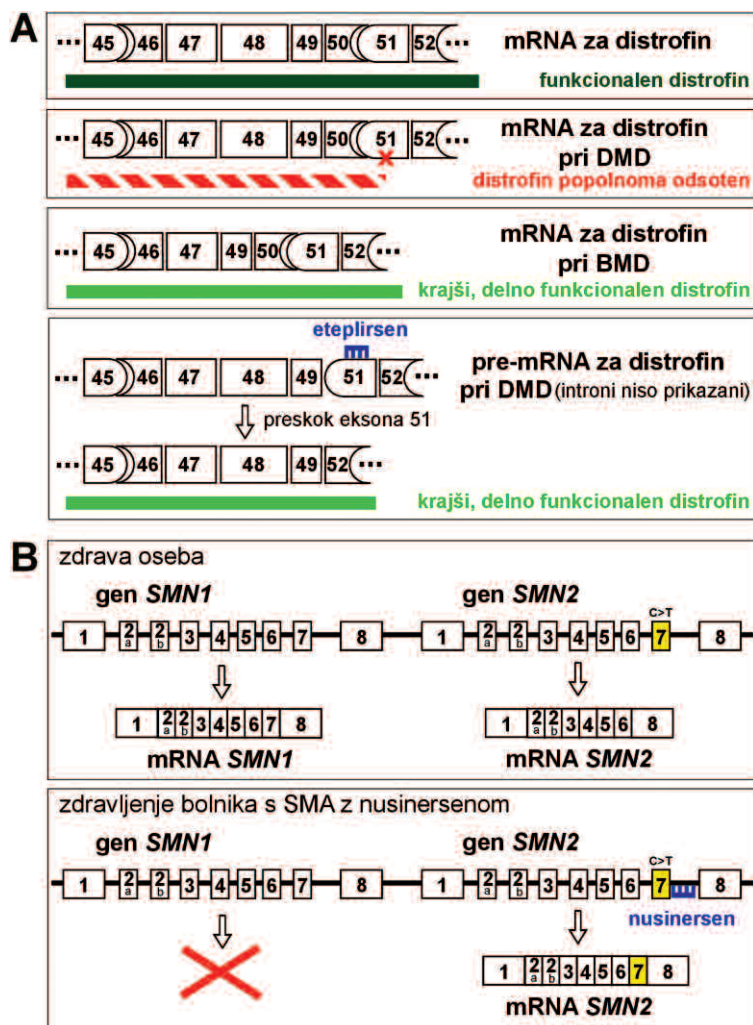
3.2 SPINALNA MIŠIČNA ATROFIJA

Spinalna mišična atrofija (SMA (45)) je avtosomna recesivna genska bolezen z okvirno incidenco 1 na 11.000 rojstev, za katero je značilna progresivna degeneracija motoričnih nevronov. Posledično postopno propadajo mišična vlakna, kar vodi v napredujočo invalidnost in smrt zaradi oslabelosti dihalnih mišic. V 95 % primerov bolezni nastopi zaradi delecij ali mutacij obeh alelov gena *SMN1* (*survival of motor neuron 1*) na kromosomu 5. Protein SMN igra osrednjo vlogo pri procesiranju nevronskih pre-mRNA in je ključen za tvorbo izrastkov živčnih celic (aksona in dendritov), potrebnih za prenos signalov med nevroni ter med nevroni in mišičnimi celicami. Človeški kromosom 5 nosi tudi zapis za eno ali več kopij paralognega gena *SMN2*, ki se od gena *SMN1* razlikuje le v nekaj nukleotidih. Biološko najpomembnejša razlika med paralogoma je mutacija citidina v timidin v ojačevalnem zaporedju eksona 7 *SMN2*, saj je odgovorna za spremembo vzorca povezovanja eksonov – v večini prepisov gena *SMN2* pride do preskoka (opustitve) eksona 7 in s tem do zelo omejenega nastajanja (10–15 %) funkcionalnega proteinskega produkta SMN gena *SMN2* (slika 4B). Klinična slika SMA je odvisna od števila kopij gena *SMN2*; pri večjem številu kopij praviloma opazimo manj izrazite simptome bolezni, kar nakazuje, da *SMN2* lahko delno nadomesti odsotnost funkcionalnega gena *SMN1* (46).

Do pred kratkim je bilo zdravljenje SMA le podporno, tj. omejeno na obvladovanje pulmoloških, gastrointestinalnih

in ortopedskih zapletov. Tako **nusinersen**, v ZDA odobren decembra 2016, v Evropi pa šest mesecev za tem, predstavlja revolucijo v zdravljenju SMA. Nusinersen je sintezni ASO, zgrajen iz 18 fosforotioatnih, 2'-O-metoksietiliranih nukleotidov, komplementaren utiševalnemu zaporedju v intronu 7. Z oviranjem vezave zaviralnih trans-delujočih dejavnikov spodbudi vključitev eksona 7 v mRNA SMN2 (slika

4B), s čimer okrepi nastajanje funkcionalnega proteina SMN (47). V prvi fazi kliničnega vrednotenja (48) so nusinersen vbrizgali pediatričnim bolnikom v enem odmerku (1 mg, 3 mg, 6 mg ali 9 mg) intratekalno ter ovrednotili izražanje SMN v cerebrospinalni tekočini po 9 in 14 mesecih. V skupinah bolnikov, ki so prejeli največja odmerka, so za beležili povprečno 118 % oz. 161 % porasta SMN. V sku-



Slika 4: Mehanizma delovanj ASO pri zdravljenju Duchenneve mišične distrofije (DMD) in spinalne mišične atrofije (SMA; prirejeno po (15)). A. Ponazoritev povezovanja eksonov v mRNA za distrofin pri DMD (primer nesmiselne točkovne mutacije v eksonu 51, rdeč križec) in Beckerjevi mišični distrofiji (BMD; primer delecije eksona 48) ter modulacija povezovanja eksonov z eteplirsenom (preskok eksona 51) kot terapevtska strategija za zdravljenje DMD. B. Ponazoritev povezovanja eksonov v mRNA SMN1 in SMN2 ter spodbujanje vključitve eksona 7 SMN2 z nusinersenom, ki zavira vezavo zaviralnega trans-delujočega dejavnika na intronsko utiševalno zaporedje.

Figure 4: Mechanisms of action of ASOs in treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and spinal muscular atrophy (SMA; adapted from (15)). A. Depiction of dystrophin mRNA splicing in DMD (an example of nonsense point mutation in exon 51, red cross) and Becker muscular dystrophy (BMD; an example of in-frame exon 48 deletion), and modulation of splicing with eteplirsen (induction of exon 51 skipping) as a therapeutic strategy for DMD. B. Depiction of SMN1 and SMN2 mRNA splicing, and promotion of SMN2 exon 7 inclusion with nusinersen, which blocks the binding of trans-acting splicing repressor to the intronic splice silencer, as a therapeutic strategy for SMA.



pini, ki je prejela 9 mg nusinersena so poročali tudi o izboljšanju motoričnih funkcij (ocenjeno po razširjeni Hammersmithovi lestvici gibalnih sposobnosti) v primerjavi s stanjem pred začetkom zdravljenja. Resnih neželenih učinkov niso zaznali. Učinkovitost in varnost nusinersena so potrdili tudi v raziskavi druge faze (49), ki je zajela 20 pediatričnih bolnikov (dojenčkov starosti med tremi tedni in sedmimi meseci). V tem primeru so bolniki prejeli nusinersen v obdobju 32 mesecev (1., 15., 85. dan (po 6 ali 12 mg) in 253. dan ter nato vsake štiri mesece (po 12 mg)). Večina sodelujočih otrok je izkazovala napredek v razvoju in izboljšane motorične funkcije (glede na siceršnji pričakovani potek bolezni) ter ni potrebovala pomoči pri dihanju. Nekateri otroci so celo sedeli samostojno ali se samostojno prevahili na bok, funkcije rok in nog ter gibanje glave so se izboljšali. V živčnem tkivu treh od štirih sodelujočih, ki so med raziskavo umrli (kar pa ni bila posledica neželenih učinkov zdravljenja), so potrdili dva- do šestkrat višje nivoje mRNA *SMN2* z eksonom 7 (v primerjavi z otroki, ki niso bili vključeni v raziskavo) kot tudi višjo koncentracijo proteina SMN. Tretji fazi kliničnega vrednotenja (ENDEAR (50) in CHERISH (51)) sta zajeli 121 dojenčkov s SMA oz. 126 otrok, pri katerih so se simptomi bolezni pojavili po šestem mesecu starosti. V obeh primerih je zdravljenje potekalo več kot eno leto (13 oz. 15 mesecev), udeleženci so prejeli po 12 mg nusinersena intratekalno ali placebo v štirih oz. šestih odmerkih. Tudi tokrat se je nusinersen izkazal za razmeroma varno učinkovino. V raziskavi ENDEAR so dosegli klinično izboljšanje motoričnih funkcij pri 51 % prejemnikov nusinersena (v primerjavi z 0 % v skupini, ki je prejela placebo). Tudi v raziskavi CHERISH so bili izsledki spodbudni: po 15 mesecih zdravljenja so zabeležili napredek v motoričnih funkcijah pri bolnikih, ki so prejeli nusinersen (ocenjen kot porast v obsegu $3,9 \pm 0,49$ točke po razširjeni Hammersmithovi lestvici gibalnih sposobnosti glede na začetno vrednost, medtem ko je motorična funkcija v skupini, ki je prejela placebo, upadla (znižala se je za $-1,0 \pm 0,76$ točke)). Z nusinersenom od marca 2017 zdravijo pediatrične bolnike s SMA tudi na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (52).

4 SKLEP

Modulacija povezovanja eksonov s protismiselnimi oligonukleotidi je nova, še ne uveljavljena terapevtska strategija,

ki obljublja možnost spopadanja s številnimi neozdravljivimi genskimi boleznimi. Relativno kratko nukleotidno zaporedje, komplementarno cis-regulatornim regijam pre-mRNA, zagotavlja visoko selektivnost delovanja ASO. Pri tem je pomembno zavedanje, da modulacija povezovanja eksonov ne omogoča zdravljenja bolezni, temveč zgolj blaženje simptomov, saj je učinek ASO reverzibilen (za razliko od eksperimentalnih oblik genskega zdravljenja, ki slonijo npr. na urejanju genov s tehnologijo CRISPR/Cas (53)). Na reverzibilnost učinka lahko gledamo tudi kot na prednost – učinek »zgrešitve zelene tarče« (*off-target effect*) na nivoju RNA je namreč nepomemben, če pa pride do poškodbe DNA, je to za celico lahko usodno ali pa (v primeru inaktivacije tumor-supresorskih genov) privede celo do pojava neoplazij.

Precejšnjo oviro pri vrednotenju učinkovitosti ASO predstavlja dejstvo, da jih razvijajo za zdravljenje redkih bolezni, kar otežuje rekrutiranje homogenih populacij bolnikov (npr. podobne starosti, z enakimi ali podobnimi genetskimi napakami in stopnjo bolezni). Iz etičnih razlogov se včasih odločijo za kontrolno skupino bolnikov z gensko napako, kjer terapevtskega učinka po zdravljenju z ASO ni moč pričakovati, a razlike v genetskem ozadju so lahko vzrok različnim manifestacijam bolezni. Hkrati je vprašljiva tudi ustreznost prognostičnih označevalcev, kot je primer nivojev distrofina (mRNA ali proteina) za napovedovanje terapevtskega učinka ASO pri zdravljenju DMD. To so bili tudi poglavitni očitki Odbora za zdravila za uporabo v humani medicini (CHMP, EMA), ki je zavrnil registracijo eteplirsena (54). Po drugi strani je neprepričljivo učinkovitost eteplirsena v primerjavi z nusinersenom mogoče pojasniti tudi s konceptualno razliko v mehanizmi delovanj obeh ASO: nusinersen spodbuja nastanek polno funkcionalnega proteina SMN, medtem ko eteplirsen omogoča le nastanek delno funkcionalne, skrajšane oblike distrofina (zato je pričakovani terapevtski učinek že v osnovi bistveno manjši (10)). Na učinkovitost ASO nenazadnje vpliva tudi sekundarna struktura tarčne RNA, ki lahko močno omeji sposobnost asociacije s cis-regulatornimi elementi in s tem možnost tekmovanja za vezavo s trans-delujočimi regulatorji povezovanja eksonov ali spajalnim telescem. Ob izjemno visokih neposrednih stroških zdravljenja z ASO (npr. cena enega odmerka nusinersena znaša 125.000 USD, tj. 625.000–750.000 USD za prvo leto zdravljenja in nato po 375.000 USD za vzdrževalne odmerke vsako nadaljnje leto (55), oz. 270.000 EUR/leto (15)) je razumljivo, da se med deležniki pogosto postavlja vprašanje stroškovne učinkovitosti te skupine zdravil.

5 LITERATURA

1. Papasaikas P, Valcarcel J. The spliceosome: the ultimate RNA chaperone and sculptor. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(1):33-45.
2. Hang J, Wan R, Yan C, Shi Y. Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science.* 2015; 349(6253):1191-8.
3. Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA.* 2008;14(5):802-13.
4. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008; 40(12):1413-5.
5. Gallego-Paez LM, Bordone MC, Leote AC, Saraiva-Agostinho N, Ascensao-Ferreira M, Barbosa-Morais NL. Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige. *Hum Genet.* 2017;136(9):1015-42.
6. Gueroussov S, Gonatopoulos-Pournatzis T, Irimia M, Raj B, Lin ZY, Gingras AC et al. An alternative splicing event amplifies evolutionary differences between vertebrates. *Science.* 2015;349(6250):868-73.
7. Scotti MM, Swanson MS. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet.* 2016;17(1):19-32.
8. Baralle D, Buratti E. RNA splicing in human disease and in the clinic. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(5):355-68.
9. Ohno K, Takeda JI, Masuda A. Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(1):
10. Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6549-63.
11. Kishore S, Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science.* 2006;311(5758):230-2.
12. Bratkovič T, Modic M, Camargo Ortega G, Drukker M, Rogelj B. Neuronal differentiation induces SNORD115 expression and is accompanied by post-transcriptional changes of serotonin receptor 2c mRNA. *Sci Rep.* 2018;8(1):5101.
13. Sperling J, Azubel M, Sperling R. Structure and function of the pre-mRNA splicing machine. *Structure.* 2008;16(11):1605-15.
14. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(1):14-26.
15. Goyal N, Narayanaswami P. Making sense of antisense oligonucleotides: a narrative review. *Muscle Nerve.* 2018;57(3):356-70.
16. Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(5):347-55.
17. Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24(6):374-87.
18. Iannitti T, Morales-Medina JC, Palmieri B. Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity. *Curr Drug Targets.* 2014;15(7):663-73.
19. Hagedorn PH, Persson R, Funder ED, Albaek N, Diemer SL, Hansen DJ et al. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discov Today.* 2018; 23(1):101-14.
20. Amantana A, Iversen PL. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5(5):550-5.
21. Stein CA, Castanotto D. FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017. *Mol Ther.* 2017;25(5):1069-75.
22. Hinrich AJ, Jodelka FM, Chang JL, Brutman D, Bruno AM, Briggs CA et al. Therapeutic correction of ApoER2 splicing in Alzheimer's disease mice using antisense oligonucleotides. *EMBO Mol Med.* 2016;8(4):328-45.
23. Schoch KM, DeVos SL, Miller RL, Chun SJ, Norrbom M, Wozniak DF et al. Increased 4R-Tau induces pathological changes in a human-Tau mouse model. *Neuron.* 2016;90(5):941-7.
24. Dewaele M, Tabaglio T, Willekens K, Bezzi M, Teo SX, Low DH et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J Clin Invest.* 2016;126(1):68-84.
25. Zammarchi F, de Stanchina E, Bourmazou E, Supakorndej T, Martires K, Riedel E et al. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(43):17779-84.
26. Disterer P, Al-Shawi R, Ellmerich S, Waddington SN, Owen JS, Simons JP et al. Exon skipping of hepatic APOB pre-mRNA with splice-switching oligonucleotides reduces LDL cholesterol in vivo. *Mol Ther.* 2013;21(3):602-9.
27. Gedicke-Hornung C, Behrens-Gawlik V, Reischmann S, Geertz B, Stimpel D, Weinberger F et al. Rescue of cardiomyopathy through U7snRNA-mediated exon skipping in Mybpc3-targeted knock-in mice. *EMBO Mol Med.* 2013;5(7):1128-45.
28. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 2010; 24(15):1634-44.
29. Rigo F, Chun SJ, Norris DA, Hung G, Lee S, Matson J et al. Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;350(1):46-55.
30. Miller CM, Tanowitz M, Donner AJ, Prakash TP, Swayze EE, Harris EN et al. Receptor-mediated uptake of phosphorothioate antisense oligonucleotides in different cell types of the liver. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(3):119-27.
31. Lorenz P, Misteli T, Baker BF, Bennett CF, Spector DL. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(2):582-92.
32. Miller CM, Wan WB, Seth PP, Harris EN. Endosomal escape of antisense oligonucleotides internalized by stabilin receptors is regulated by Rab5C and EEA1 during endosomal maturation. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(2):86-96.
33. Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health.* 2015;51(8):759-64.
34. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 1989;45(4):498-506.
35. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2(12):731-40.
36. Niks EH, Aartsma-Rus A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(2):225-36.
37. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 2007;357(26):2677-86.
38. Goemans NM, Tulinus M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhart PF, Heuvelmans N et al. Systemic administration of PRO051 in



- Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2011;364(16):1513-22.
39. Voit T, Topaloglu H, Straub V, Muntoni F, Deconinck N, Campion G et al. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol.* 2014;13(10):987-96.
 40. Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C et al. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 2009;8(10):918-28.
 41. Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet.* 2011;378(9791):595-605.
 42. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2013;74(5):637-47.
 43. Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Shao J et al. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2016;79(2):257-71.
 44. Aartsma-Rus A, Goemans N. A sequel to the eteplirsen saga: eteplirsen is approved in the United States but was not approved in Europe. *Nucleic Acid Ther.* 2019;29(1):13-15.
 45. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy. *Neurol Clin.* 2015;33(4):831-46.
 46. Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmuller H, Blick S, Baasner A et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet.* 2006;119(4):422-8.
 47. Porensky PN, Mitropant C, McGovern VL, Bevan AK, Foust KD, Kaspar BK et al. A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet.* 2012;21(7):1625-38.
 48. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2016;86(10):890-7.
 49. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet.* 2016;388(10063):3017-36.
 50. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1723-32.
 51. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM et al. Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2018;378(7):625-35.
 52. Osredkar D. Na Pediatrični kliniki pričeli z zdravljenjem otroka s SMA tip I (šporočilo za javnost). 2017; www.kclj.si/dokumenti/spm_Na_Pediaticni_kliniki_priceli_z_zdravljenjem_otroka_s_SMA_tip_I_07032017.pdf. Dostop: 10-01-2019.
 53. Hussain W, Mahmood T, Hussain J, Ali N, Shah T, Qayyum S et al. CRISPR/Cas system: A game changing genome editing technology, to treat human genetic diseases. *Gene.* 2019;685:70-5.
 54. EMA. Znanstveni zaključki in podlaga za zavrnitev zdravila Exondys (povzetek evropskega javnega poročila o oceni zdravila). 2018; www.ema.europa.eu/documents/scientific-conclusion/exondys-epar-scientific-conclusions-grounds-refusal_sl.pdf. Dostop: 10-01-2019.
 55. Treating rare disorders: time to act on unfair prices. *Lancet Neurol.* 2017;16(10):761.