



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ - ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στρατηγικές RNA θεραπείας σε μονογονιδιακά νοσήματα

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΠΙΤΤΑ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ - ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΒΑΡΒΑΡΑ ΤΡΑΧΑΝΑ - ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ - ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2023

Περιεχόμενα	
Περίληψη	4
Abstract.....	5
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	
1.1. Μονογονιδιακά νοσήματα.....	6
1.1.1. Αυτοσωμικές επικρατείς ασθένειες	6
1.1.2. Αυτοσωμικές υπολειπόμενες ασθένειες	7
1.1.3. Φυλοσύνδετη επικρατής ασθένεια.....	8
1.1.4. Φυλοσύνδετη υπολειπόμενη ασθένεια.....	9
1.1.5. Υ-συνδεδεμένες ασθένειες	10
1.1.6. Μιτοχονδριακές ασθένειες.....	10
1.2. RNA μόρια που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία.....	11
1.2.1. Μικρά μόριαRNAs παρεμβολής (siRNAs).....	11
1.2.2. Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια.....	12
1.2.3. Απαμερή	14
1.2.4. Αγγελιοφόρο RNA	15
1.3. Φορείς μεταφοράς μορίων RNA στα κύτταρα	17
1.3.1. Λιπίδια και νανοσωματίδια με βάση τα λιπίδια	18
1.3.2. Πολυμερή και νανοσωματίδια με βάση πολυμερή	22
Κεφάλαιο 2: Εγκεκριμένες RNA θεραπείες από τον FDA για μονογονιδιακά νοσήματα	25
2.1. Νωτιαία μυϊκή ατροφία	25
2.1.1. Nusinersen.....	27
2.2. Μυϊκή δυστροφίαDuchenne.....	31
2.2.1. Eteplirsen	32
2.2.2. Golodirsen.....	34
2.2.3. Vitolarsen	35
2.2.4. Casimersen.....	36
2.3. Οικογενής υπερχοληστερολαιμία	37
2.3.1. Mipomersen	38
2.3.2 Inclisiran.....	38
2.4. Κληρονομική αμυλοείδωση από τρανσθυρετίνη	39
2.4.1. Inotersen.....	41
2.4.2. Patisiran	42
2.4.3. Vutrisiran.....	46
Κεφάλαιο 3: RNA θεραπείες που βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο	48
3.1. Νόσος Huntington	48
3.1.1. Θεραπείες με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια.....	49

3.1.2.	Θεραπείες παρεμβολής RNA.....	52
3.1.3.	Θεραπείες με CRISPR	54
3.2.	Κυστική ίνωση	55
3.2.1.	Θεραπεία με mRNA.....	55
3.2.2.	Θεραπεία με tRNA.....	57
3.2.2.	Επεξεργασία RNA	57
3.3.	Κληρονομική Αμυλοείδωση από Τρανσθυρετίνη.....	60
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα.....		61
Βιβλιογραφία		63

Περίληψη

Τα μονογονιδιακά νοσήματα προκαλούνται από μεταλλάξεις σε ένα μόνο γονίδιο, που έχουν ως αποτέλεσμα την μη παραγωγή πρωτεΐνης ή την παραγωγή μιας μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που μπορεί να είναι μη λειτουργική. Σήμερα οι θεραπείες που βασίζονται στο RNA κερδίζουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των επιστημόνων λόγω των σημαντικών δυνατοτήτων που προσφέρουν, που είναι το χαμηλό σχετικά κόστος παραγωγής, η μακροχρόνια αποτελεσματικότητα και η δυνατότητα ανάπτυξης θεραπειών ειδικών για κάθε γονότυπο. Τα διαφορετικά είδη RNA που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι τα μικρά μόρια RNAs παρεμβολής (siRNAs), τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO), τα απταμερή και το αγγελιοφόρο RNA (mRNA). Τα μόρια αυτά θα πρέπει να εισέλθουν στο κύτταρο ώστε να δράσουν, επομένως απαιτούνται ειδικά σχεδιασμένοι φορείς. Οι διαθέσιμοι φορείς χωρίζονται σε φορείς που έχουν ως βάση λιπίδια και φορείς που έχουν ως βάση πολυμερή. Σήμερα υπάρχουν αρκετές εγκεκριμένες θεραπείες που βασίζονται στο RNA. Συγκεκριμένα, για τη Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία έχει εγκριθεί ένα 18-μερές ASO (Nusinersen), για τη μυϊκή δυστροφία Duchenne έχουν εγκριθεί 4 ASOs (Eteplirsen, Golodirsen, Viltolarsen, Casimersen), για την οικογενή υπερχοληστερολαιμία έχει εγκριθεί ένα ASO (Mipomersen), ενώ για την κληρονομική αμυλοείδωση από τρανσθυρετίνη (hATTR) έχουν εγκριθεί 3 θεραπείες που βασίζονται στο RNA, ένα ASO (Inotersen) και 2 siRNA (Patisiran, Vutrisiran). Εκτός από τα παραπάνω, ωστόσο, η έρευνα συνεχίζεται με πολλές κλινικές δοκιμές να βρίσκονται σε εξέλιξη για την ανάπτυξη και τον έλεγχο και άλλων θεραπειών που βασίζονται στο RNA. Μεγάλη έρευνα γίνεται για την ανακάλυψη θεραπείας με RNA για τη νόσο Huntington και την Κυστική ίνωση, ενώ βρίσκεται σε εξέλιξη έρευνα για τη θεραπεία της hATTR με CRISPR. Τα αποτελέσματα της χρήσης RNA στη θεραπεία μονογονιδιακών ασθενειών είναι πολλά υποσχόμενα και αναμένεται να ανακουφίσουν πολλούς ασθενείς παγκοσμίως τα επόμενα χρόνια.

Abstract

Monogenic diseases are caused by mutations in a single gene, producing a mutant protein that may be non-functional or even harmful, or the complete absence of the normal protein. Today RNA-based therapies are increasingly gaining the interest of scientists due to the significant potential they offer, which are relatively low production costs, long-term efficacy, and the possibility of developing genotype-specific therapies. The different types of RNAs used therapeutically are small interfering RNAs (siRNAs), antisense oligonucleotides (ASOs), aptamers, and messenger RNA (mRNA). These molecules must enter the cell to act, so specially designed carriers are required. Available carriers are divided into lipid-based carriers and polymer-based carriers. Today there are several approved RNA-based therapies. Specifically, for spinal muscular atrophy an 18-mer ASO (Nurinersen) has been approved, for Duchenne muscular dystrophy 4 ASOs (Eteplirsen, Golodirsen, Viltolarsen, Casimersen) have been approved, for familial hypercholesterolemia an ASO has been approved (Mipomersen), while for hereditary transthyretin amyloidosis (hATTR) 3 RNA-based therapies, an ASO (Inotersen) and 2 siRNAs (Patisiran, Vutrisiran) have been approved. In addition, research continues with many clinical trials underway to develop and test other RNA-based therapies. Much research is being done to discover RNA therapy for Huntington's disease and cystic fibrosis, and research is underway to treat hATTR with CRISPR. The results of using RNA in the treatment of monogenic diseases are promising and are expected to relieve many patients worldwide in the coming years.

Keywords: monogenic diseases, RNA, RNA therapy

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Μονογονιδιακά νοσήματα

Μονογονιδιακά ονομάζονται τα νοσήματα τα οποία οφείλονται σε γενετική βλάβη ενός μόνο γονιδίου και ακολουθούν συγκεκριμένο πρότυπο κληρονομικότητας μέσα στην οικογένεια.

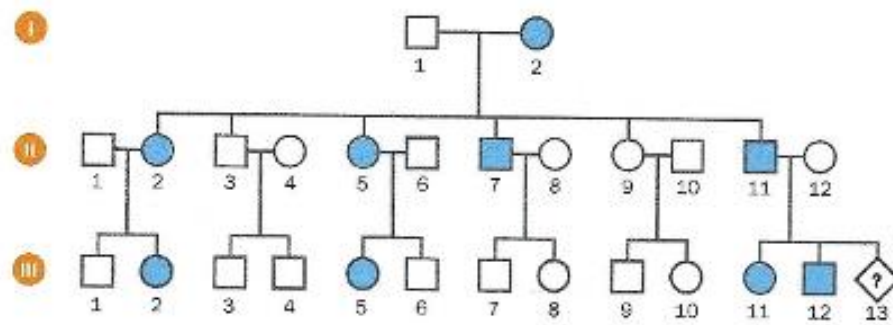
Tom Strachan, Andrew P Read (2020). Human Molecular Genetics (5th ed.). CRC Press

Οι περισσότερες συγγενείς μεταβολικές διαταραχές, γνωστές ως εγγενή σφάλματα του μεταβολισμού, οφείλονται σε μεταλλάξεις ενός μόνο γονιδίου. Στους φορείς οι μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή πρωτεΐνης με μειωμένη λειτουργική ικανότητα και ανιχνεύονται στον πληθυσμό σε χαμηλότερες συχνότητες σε σύγκριση με αυτό που θα αναμενόταν με βάση απλούς πιθανολογικούς υπολογισμούς (Šimčíková & Heneberg, 2019).

Οι διαταραχές ενός γονιδίου μπορούν να κληρονομηθούν στις επόμενες γενιές με διάφορους τρόπους.

1.1.1 Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα

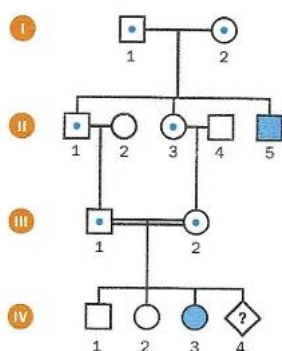
Μόνο ένα μεταλλαγμένο αντίγραφο του γονιδίου είναι απαραίτητο για να προσβληθεί ένα άτομο από μια αυτοσωμική επικρατούσα διαταραχή. Κάθε προσβεβλημένο άτομο έχει συνήθως έναν πάσχοντα γονέα. Η πιθανότητα ένα παιδί να κληρονομήσει το μεταλλαγμένο γονίδιο είναι 50%. Τα αυτοσωματικά επικρατή νοσήματα μερικές φορές παρουσιάζουν μειωμένη διεισδυτικότητα, πράγμα που σημαίνει ότι παρόλο που χρειάζεται μόνο ένα μεταλλαγμένο αντίγραφο, δεν αναπτύσσουν τη νόσο όλα τα άτομα που κληρονομούν αυτή τη μετάλλαξη. Παραδείγματα αυτοσωμικής επικρατούς κληρονομικότητας είναι η νόσος του Huntington, η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1, η νευροϊνωμάτωση τύπου 2, το σύνδρομο Marfan, ο κληρονομικός μη πολυποδιακός ορθοκολικός καρκίνος του παχέος εντέρου, οι κληρονομικές πολλαπλές εξοστώσεις (μια ιδιαίτερα διεισδυτική αυτοσωματική επικρατούσα διαταραχή), η οζώδης σκλήρυνση, η νόσος von Willebrand και η οξεία διαλείπουσα πορφυρία (Griffiths et al., 2020).



Εικόνα 1: Οικογενειακό δέντρο οικογένειας με αυτοσωμικό επικρατές νόσημα

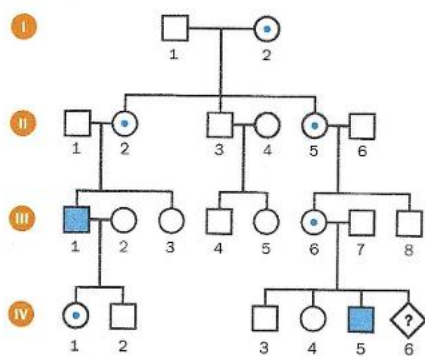
1.1.2 Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα

Δύο αντίγραφα του γονιδίου πρέπει να μεταλλαχθούν για να νοσήσει ένα άτομο από αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή. Οι πάσχοντες έχουν συνήθως γονείς που ο καθένας φέρει ένα μόνο αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου και αναφέρονται ως φορείς. Οι φορείς δεν εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου. Δύο φορείς έχουν 25% πιθανότητες να αποκτήσουν παιδί το οποίο θα πάσχει. Παραδείγματα αυτού του τύπου διαταραχής είναι ο αλφινισμός, η κυστική ίνωση, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η νόσος Tay-Sachs, η νόσος Niemann-Pick, η νωτιαία μυϊκή ατροφία και το σύνδρομο Roberts (Griffiths et al., 2020). Ορισμένες αυτοσωμικές υπολειπόμενες διαταραχές είναι συχνές επειδή, στο παρελθόν, η μεταφορά ενός από τα ελαττωματικά γονίδια οδηγούσε σε μια ελαφρά προστασία έναντι μιας λοιμώδους ασθένειας ή τοξίνης όπως η φυματίωση ή η ελονοσία (Mitton, 2002). Τέτοιες διαταραχές περιλαμβάνουν την κυστική ίνωση (Poolman & Galvani, 2007), τη δρεπανοκυτταρική αναιμία (Allison, 2009), τη φαινυλκετονουρία (Woolf, 1986) και τη θαλασσαιμία (Weatherall et al., 2015).



Εικόνα 2: Οικογενειακό δέντρο οικογένειας με αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα

πιθανότητα να έχει κόρες που είναι φορείς ενός αντιγράφου του μεταλλαγμένου γονιδίου. Οι φυλοσύνδετες υπολειπόμενες νόσοι περιλαμβάνουν τις σοβαρές ασθένειες αιμορροφιλία A, μυϊκή δυστροφία Duchenne και σύνδρομο Lesch-Nyhan, καθώς και κοινές και λιγότερο σοβαρές καταστάσεις όπως η ανδρική φαλάκρα και η αχρωματοψία στο κόκκινο και το πράσινο. Οι υπολειπόμενες καταστάσεις που συνδέονται με το X μπορεί μερικές φορές να εκδηλωθούν σε γυναίκες λόγω του φαινομένου απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X ή μονοσωμίας X (σύνδρομο Turner) (Griffiths et al., 2020).

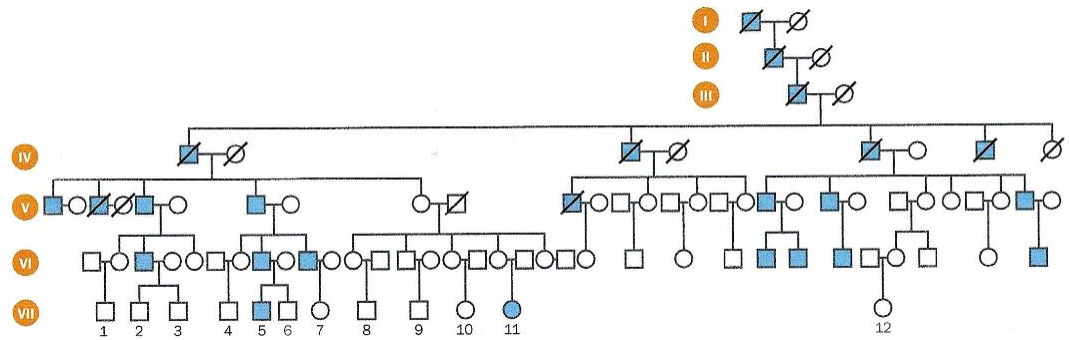


Εικόνα 4: Οικογενειακό δέντρο οικογένειας με φυλοσύνδετο υπολειπόμενο νόσημα

1.1.5 Ολανδρική κληρονομικότητα

Οι διαταραχές που συνδέονται με το Y προκαλούνται από μεταλλάξεις γονιδίων στο χρωμόσωμα Y. Επομένως αυτό σημαίνει ότι οι διαταραχές που συνδέονται με το Y στους ανθρώπους μπορούν να μεταδοθούν μόνο από τους άνδρες στους γιους τους. Τα θηλυκά δεν μπορούν ποτέ να επηρεαστούν επειδή δεν φέρουν Y χρωμόσωμα (Griffiths et al., 2020).

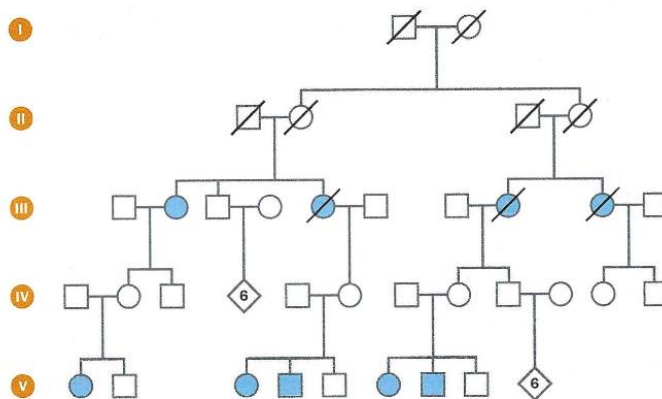
Οι διαταραχές που συνδέονται με το Y είναι εξαιρετικά σπάνιες, αλλά τα πιο γνωστά παραδείγματα συνήθως προκαλούν υπογονιμότητα. Η αναπαραγωγή σε τέτοιες καταστάσεις είναι δυνατή μόνο μέσω της παράκαμψης της υπογονιμότητας (Griffiths et al., 2020).



Εικόνα 5: Οικογενειακό δέντρο οικογένειας με Ολανδρική κληρονομικότητα

1.1.6 Μιτοχονδριακή κληρονομικότητα

Αυτός ο τύπος κληρονομικότητας, γνωστός και ως μητρική κληρονομικότητα, είναι η πιο σπάνια και αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA. Επειδή μόνο τα μιτοχόνδρια του ωαρίου μεταφέρονται στο ζυγωτό κατά τη γονιμοποίηση και κατ'έκταση στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, μόνο οι μητέρες μπορούν να μεταδώσουν τις παθήσεις του μιτοχονδριακού DNA στα παιδιά τους. Ένα παράδειγμα αυτού του τύπου διαταραχής είναι η κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber (Griffiths et al., 2020).



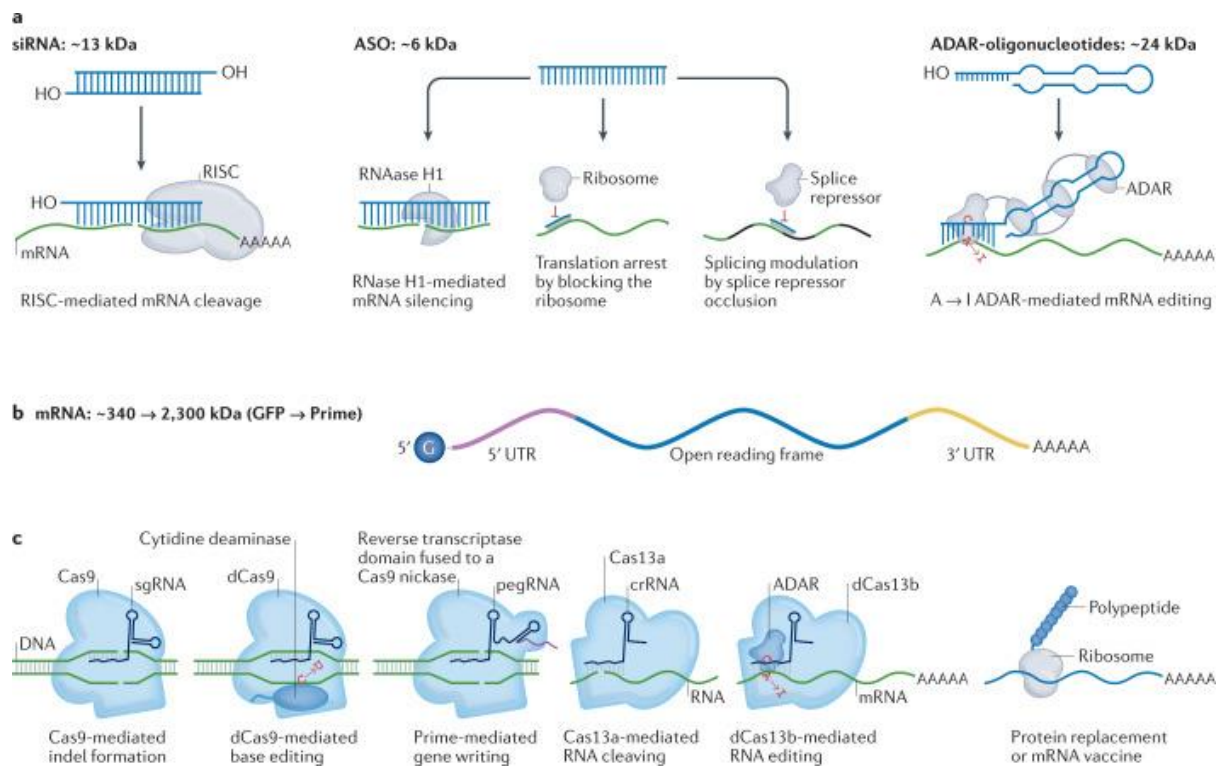
Εικόνα 6: Οικογενειακό δέντρο οικογένειας με Μιτοχονδριακή κληρονομικότητα

1.2 RNA μόρια που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία

1.2.1 Μικρά μόριαRNAs παρεμβολής (siRNAs)-

Ένας βιοχημικός μηχανισμός δράσης που έχει χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στους ανθρώπους είναι η γονιδιακή σίγαση με τη μεσολάβηση των small interfering RNA (siRNA). Αυτά τα δίκλιωνα RNA με μοριακό βάρος περίπου 13 kDa καταστέλλουν τη μετάφραση πρωτεΐνης στρατολογώντας το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) σε mRNA μέσω

ζευγαρώματος βάσεων σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας (Εικόνα 7). Έπειτα, το mRNA στόχος διασπάται μέσω της δράσης της καταλυτικής πρωτεΐνης RISC Ago2, μέλους της οικογένειας των Αργοναυτών. Εναλλακτικά, άλλες πρωτεΐνες Ago (Ago1, Ago3 και Ago4) καταλύουν την προκαλούμενη από ενδονουκλεάση μη ειδική αποικοδόμηση του mRNA εντοπίζοντας το δεσμευμένο mRNA σε σωματίνα επεξεργασίας (Wilson & Doudna, 2013).



Εικόνα 7: Τα διαφορετικά είδη RNA που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία μονογονιδιακών ασθενειών (Paunovska et al., 2022).

Το siRNA μπορεί να μειώσει την έκφραση οποιουδήποτε γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη και έχει εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) ή τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) με τη μορφή των ακόλουθων φαρμάκων: **Patisiran**, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της κληρονομικής αμυλοείδωσης που προκαλείται από τρανσθυρετίνη (hereditary transthyretin-mediated amyloidosis, hATTR) (Adams et al., 2018), **Givosiran**, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της οξείας ηπατικής πορφυρίας (Balwani et al., 2020), **Lumasiran**, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της πρωτοπαθούς υπεροξαλουρίας τύπου 1 (Garrelfs et al., 2021), και **Inclisiran**, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας (Ray et al., 2020). Επιπλέον, ο FDA έχει εγκρίνει μια νέα αίτηση

φαρμάκου για το **Vutrisiran** (*Alnylam announces U.S. Food and Drug Administration acceptance of New Drug Application for Investigational vut.*, 2021), μια ερευνητική θεραπεία RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi) για τη θεραπεία της hATTR με πολυνευροπάθεια (Hereditary Transthyretin Amyloidosis-Polyneuropathy, hATTR-PN) σε ενήλικες, μετά από μια επιτυχημένη κλινική δοκιμή φάσης III. Ο FDA ενέκρινε το πρώτο φάρμακο siRNA (Adams et al., 2018) 20 χρόνια μετά την πρώτη αναφορά RNAi σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Fire et al., 1998).

Η κλινική εφαρμογή του siRNA είναι εύκολη εξαιτίας τριών χαρακτηριστικών. Πρώτον, ο μικρός αριθμός νουκλεοτιδίων του μορίου επιτρέπει στους επιστήμονες να χρησιμοποιήσουν τη σύνθεση στερεάς φάσης για να κατασκευάσουν siRNA με ειδικές για τη θέση χημικές τροποποιήσεις, συνήθως στον φωσφορικό σκελετό και στον σακχαρώδη δακτύλιο. Μια ολόκληρη σειρά χημικών ουσιών έχει αναπτυχθεί για μια ποικιλία τροποποιήσεων ριβόζης, όπως 2'-Ο-μεθύλιο (2'-OMe), 2'-μεθοξυαιθύλιο (2'-MOE), 2'-φθόριο (2'-F), ολιγονουκλεοτίδια κλειδωμένου νουκλεϊκού οξέος, κ.ά. (Adachi et al., 2021). Άλλες συμπληρωματικές τροποποιήσεις είναι οι τροποποιήσεις του φωσφορικού σκελετού, συμπεριλαμβανομένων των φωσφοροθειοϊκών, των φωσφοροδιαμιδικών μορφολινο ολιγομερών (phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides, PMO), των πεπτιδικών ολιγονουκλεοτιδίων νουκλεϊκού οξέος (peptide nucleic acid oligonucleotides, PNA) και των τροποποιήσεων της νουκλεοβάσης, όπως η 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-methylcytosine, m5C). Η αλλαγή του συνδυασμού των διαφορετικών χημικών τροποποιήσεων του siRNA επέτρεψε στους επιστήμονες να βελτιώσουν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες, την έμφυτη ανοσολογική απόκριση και τη σταθερότητα (Humphreys et al., 2020). Δεύτερον, το siRNA χρησιμοποιεί το RISC, το οποίο είναι ενδογενές στα ευκαρυωτικά κύτταρα και επομένως δεν απαιτεί την παροχή μεγάλων ενζύμων με λειτουργικότητα νουκλεάσης. Τέλος, δεδομένου ότι το siRNA παρεμβαίνει στο ώριμο mRNA, απαιτεί μόνο κυτταροπλασματική παροχή, κάτι που είναι ευκολότερο να επιτευχθεί από την πυρηνική μεταφορά.

1.2.2 Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια

Τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides, ASO) είναι ολιγονουκλεοτίδια με μοριακό βάρος 6–9 kDa (Evers et al., 2015). Τα ASO έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας (Santos et al., 2015), της hATTR-PN (Benson et al., 2018), των ειδικών υποτύπων της μυϊκής δυστροφίας Duchenne (Frank et al., 2020) και της βρεφικής μυϊκής ατροφίας (Finkel et al., 201). Τα ASO μπορούν

να δράσουν μέσω τριών μηχανισμών δράσης (Εικόνα 7a). Πρώτον, παρόμοια με τα siRNA, τα ASO δεσμεύουν το mRNA μέσω ζευγαρώματος βάσεων, αλλά σε αντίθεση με τα siRNA, το ετεροδιπλό ASO DNA-RNA στρατολογεί την RNase H1 αντί για το σύμπλοκο RISC. Τα ASO που εξαρτώνται από τη RNase H1 είναι επίσης γνωστά ως garmers και οδηγούν σε διάσπαση του RNA στόχου (Crooke et al., 2017). Δεύτερον, τα ASO μπορούν επίσης να παρεμβαίνουν στον μηχανισμό συναρμογής αλληλεπιδρώντας με το pre-mRNA, προάγοντας έτσι την εναλλακτική συναρμογή (Crooke et al., 2017) και αυξάνοντας την έκφραση της πρωτεΐνης στόχου (Lim et al., 2020). Έτσι, σε αντίθεση με το siRNA, το οποίο αποσιωπά τα γονίδια-στόχους, τα ASO μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αύξηση της πρωτεϊνικής δραστηριότητας σε ασθένειες όπως η μυϊκή δυστροφία Duchenne και η μυϊκή ατροφία της σπονδυλικής στήλης. Ωστόσο, αυτοί οι δύο μηχανισμοί απαιτούν πυρηνική μεταφορά έτσι ώστε το σύμπλεγμα ASO-RNase H1 να μπορεί να αλληλεπιδράσει με το pre-mRNA. Ο τρίτος τρόπος, που προκαλεί μείωση της έκφρασης του mRNA, είναι η μεταφραστική διακοπή της στοχευόμενης πρωτεΐνης μέσω δέσμησης με το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του mRNA-στόχου (Kilanowska & Studzińska, 2020).

Η χημική τροποποίηση ASO μπορεί να επηρεάσει τον μηχανισμό δράσης, καθώς και τη συγγένεια δέσμησης της αλληλουχίας στόχου. Τα garmers έχουν μια γενική χημική δομή περιοχών πέντε νουκλεοτιδικών υπολειμμάτων που μοιάζουν με RNA που πλευρίζουν μια κεντρική περιοχή DNA 10 νουκλεοτιδίων (Bennett et al., 2017). Το garmer μπορεί να βελτιώσει τον υβριδισμό και την αντίσταση στη νουκλεάση, ενώ εξακολουθεί να διατηρεί την ενεργοποίηση της RNase H1. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, άλλες τροποποιήσεις, όπως κλειδωμένα ολιγονουκλεοτίδια νουκλεϊκού οξέος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί των 2'-τροποποιημένων, αλλά ενώ αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να βελτιώσουν την ισχύ, μπορούν επίσης να αυξήσουν την τοξικότητα (Yamamoto et al., 2021). Τα ASO που περιλαμβάνουν στερικό αποκλεισμό είναι ανεξάρτητα από RNase H1 και αποτελούνται εξ ολοκλήρου από βάσεις RNA και όχι από DNA. Συγκεκριμένα, τα ASO έχουν συχνά πλήρη φωσφοροθειϊκό σκελετό, ο οποίος μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά τους στον πυρήνα (Shen et al., 2019).

Χημικά τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια με ένα αντιπληροφοριακό μοτίβο δέσμησης στόχου έχουν σχεδιαστεί με μια κατασκευασμένη περιοχή φουρκέτας που στρατολογεί το ενδογενές ένζυμο επεξεργασίας RNA αδενοσίνη απαμινάση που δρα στο RNA (adenosine deaminase acting on RNA, ADAR) (Qu et al., 2019) (Εικόνα 7a). Αυτά τα ADAR-ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία έχουν μοριακό βάρος περίπου 10-35 kDa και μπορούν να κατασκευαστούν με ειδικών για τη θέση χημικών τροποποιήσεων, χρησιμοποιούν το μονόκλωνο τμήμα του RNA τους για να δεσμεύσουν ένα mRNA στόχο μέσω ζευγαρώματος

βάσεων. Ο άλλος τομέας στρατολογεί το ADAR στο RNA, όπου το ADAR μετατρέπει τις αδενοσίνες σε ινοσίνες. Οι ινοσίνες στη συνέχεια διαβάζονται ως γουανοσίνη από τον ενδογενή μεταφραστικό μηχανισμό, οδηγώντας σε επεξεργασία RNA από αδενοσίνη σε ινοσίνη σε γουανοσίνη (A-to-I-to-G). Η επεξεργασία από το I έως το G μπορεί να συμβεί σε ώριμο mRNA, υποδηλώνοντας ότι η κυτταροπλασματική παροχή ολιγονουκλεοτιδίων ADAR μπορεί να είναι επαρκής για την επίτευξη ενός αποτελέσματος. Έτσι, τα ADAR-ολιγονουκλεοτίδια αντιπροσωπεύουν μια αναδυόμενη κατηγορία ολιγονουκλεοτιδίων για τη θεραπεία γενετικών ασθενειών (Aquino-Jarquín, 2020).

1.2.3 Απταμερή (aptamers)

Τα απταμερή είναι βραχέα μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα που μπορούν να συνδεθούν με ποικιλία στόχων, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, υδατάνθρακες και άλλα μόρια, λόγω της τριτοταγούς δομής του απταμερούς και όχι της αλληλουχίας του. Τα απταμερή περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1990 ανεξάρτητα από δύο ομάδες, τους Ellington & Szostak (1990) και Tuerk & Gold (1990), μέσω της συστηματικής εξέλιξης του συνδέτη με την τεχνική εκθετικού εμπλουτισμού (systematic evolution of ligand by exponential enrichment, SELEX). Τα απταμερή αναπτύσσονται από δεξαμενές νουκλεϊκών οξέων με μεγάλη ποικιλία για να συνδέονται με στόχους με υψηλή ειδικότητα και συγγένεια και μπορούν να χρησιμεύσουν ως αγωνιστές (Dollins et al., 2008), ανταγωνιστές (Berezchnoy et al., 2012), διεδικά απταμερή (Schrand et al., 2017), ακόμη και φορείς για άλλα φάρμακα (Lozano et al., 2016).

Αν και τα απταμερή είναι υποσχόμενα ως θεραπευτικά μόρια, υπάρχει μόνο ένα εγκεκριμένο από τον FDA φάρμακο με βάση το απταμερές στην αγορά. Το **Pegaptanib** (Macugen, Bausch + Lomb Pharmaceutical Retina Portfolio) με έγκριση από τον FDA τον Δεκέμβριο του 2004, είναι ένα απταμερές RNA μήκους 27 βάσεων που στοχεύει τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, μιας κύριας αιτίας μη αναστρέψιμης τύφλωσης παγκοσμίως (Ruckman et al., 1998). Πολλά άλλα φάρμακα με βάση το απταμερές βρίσκονται επί του παρόντος σε φάση κλινικών δοκιμών (Kaur et al., 2018). Το **Emapticap pegol** (NOXXON, 2020b; NOXXON Pharma), για παράδειγμα, αναπτύχθηκε για να δεσμεύει και να αναστέλλει ειδικά το προφλεγμονώδες μοτίβο χημειοκίνης C-C συνδέτη 2 (C-C motif-ligand 2, CCL2) για τη θεραπεία της διαβητικής νεφροπάθειας καθώς και του καρκίνου του πνεύμονα και του παγκρέατος (NOXXON, 2020b). Ομοίως, το **Olaptesed pegol** (NOXXON, 2020a) αναπτύχθηκε για να στοχεύσει τον συνδέτη χημειοκίνης CXC (CXC chemokine ligand, CXCL12) για την κλινική θεραπεία του καρκίνου του εγκεφάλου (γλοιοβλάστωμα/γλίομα).

Το **REG1** είναι μια συνδυαστική αντιπηκτική θεραπεία που αποτελείται από πεγκνιβακογίνη, έναν αναστολέα απταμερούς RNA του παράγοντα πήξης IXa και anivamersen, μια συμπληρωματική αλληλουχία για την ταχεία αναστροφή της αντιπηκτικής δράσης της πεγκνιβακογίνης (Lincoff et al., 2016). Ο σκοπός αυτού του συνδυασμού απταμερούς είναι ότι το πρώτο θα προκαλέσει αντιπηκτική δράση όπως χρειάζεται, ενώ το δεύτερο θα αντιστρέψει την αντιπηκτική αγωγή όπως είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η υπερβολική αιμορραγία. Ωστόσο, σε μια δοκιμή που συγκρίνει τη θεραπεία με απταμερή έναντι του εγκεκριμένου αντιπηκτικού μπιβαλιρουδίνης, σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαδερμική παρέμβαση στη στεφανιαία αρτηρία, το REG1 δεν παρείχε μεγαλύτερο όφελος και είχε μεγαλύτερη συχνότητα σοβαρών αλλεργικών αντιδράσεων.

Τα απταμερή έχουν μεγάλες δυνατότητες να αντικαταστήσουν τα μονοκλωνικά αντισώματα σε θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές (Bauer et al., 2019) επειδή μπορούν να παραχθούν μέσω χημικής σύνθεσης, είναι πιο οικονομικά στην κατασκευή, πιο απλά στην τροποποίηση και προκαλούν μικρή ανοσογονικότητα. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι τα απταμερή έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των αντισωμάτων, η κλινική τους μετάφραση είναι δύσκολη λόγω των υποβέλτιστων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (υψηλή ευαισθησία στις νουκλεάσες, εύκολη απόκριση από τα νεφρά) και της πολυπλοκότητας των τεχνικών επιλογής (μια χρονοβόρα διαδικασία με χαμηλά ποσοστά επιτυχίας) (Nimjee et al., 2017).

1.2.4 Αγγελιοφόρο RNA

Ένας άλλος τύπος θεραπευτικού RNA είναι το mRNA, το οποίο μπορεί να κωδικοποιεί πρωτεΐνες που έχουν θεραπευτική δράση. Λόγω του μεγέθους τους, τα mRNA μεταγράφονται *in vitro* και δεν μπορούν επί του παρόντος να κατασκευαστούν με ειδικές για τη θέση χημικές τροποποιήσεις χρησιμοποιώντας σύνθεση στερεάς κατάστασης (Εικόνα 1b). Το mRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αντικαταστήσει την πρωτεΐνη, χρησιμοποιώντας θεραπείες υποκατάστασης (Da Silva Sanchez et al., 2020), για τη μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις κοπής Cas9 (Gillmore et al., 2021) ή για την επιδιόρθωση πρωτεϊνικών μεταλλάξεων σε επίπεδο DNA, χρησιμοποιώντας επεξεργασία βάσης (Musunuru et al., 2021).

Το 2021, οι ερευνητές ανέφεραν την επιτυχή χρήση των νανοσωματιδίων λιπιδίων (lipid nanoparticles, LNP) που ενθυλακώνουν το mRNA του *Streptococcus pyogenes* Cas9 (ενδονουκλεάση Cas9 που σχετίζεται με CRISPR) και ενός οδηγού RNA CRISPR σε έξι ασθενείς με hATTR-PN. Μια εφάπαξ δόση 0,3 mg/kg είχε ως αποτέλεσμα μια μέση μείωση από την αρχική τιμή των επιπέδων τρανσθυρετίνης (transthyretin, TTR) στο αίμα κατά 87%

στις 28 ημέρες μετά τη δόση 58. Το γονιδιακό προϊόν TTR είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά της βιταμίνης A και της θυροξίνης σε όλο το σώμα και οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο προκαλούν το hATTR (Gillmore et al., 2021). Αυτό το ορόσημο για μια νέα θεραπευτική μέθοδο ήρθε παράλληλα με την αξιοσημείωτη επιτυχία του πλέον εγκεκριμένου από τον FDA (Parums, 2021), βασισμένο σε mRNA, εμβολίου κατά του SARS-CoV2 (Thompson et al., 2021). Άλλα κλινικά παραδείγματα αντικατάστασης πρωτεϊνών με τη μεσολάβηση mRNA περιλαμβάνουν προσπάθειες για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης, καθώς και της ανεπάρκειας τρανσκαρβαμυλάσης ορνιθίνης. Εκτός από την αντικατάσταση γονιδίων, η παροδική έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης των ολιγοδενδροκυττάρων της μυελίνης οδήγησε σε ανοσολογική ανοχή και επακόλουθη θεραπεία της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας σε ποντίκια (Krienke et al., 2021). Το αντίθετο αυτού του μηχανισμού ανοχής είναι η διαμεσολαβούμενη από mRNA έκφραση ενός αντιγόνου για τη δημιουργία μακροχρόνιας ανοσίας έναντι του αντιγόνου, τα λεγόμενα εμβόλια mRNA.

Το mRNA μπορεί επίσης να εκφράζει παροδικά νουκλεάσες δακτύλου ψευδαργύρου, νουκλεάσες που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής ή νουκλεάσες που προέρχονται από συστήματα CRISPR-Cas (Zhang et al., 2019). Οι νουκλεάσες που έχουν σχεδιαστεί για να ρυθμίζουν την έκφραση του DNA είναι ιδιαίτερα κατάλληλες για θεραπείες που βασίζονται σε mRNA, οι οποίες παράγουν πρωτεΐνες για ώρες έως ημέρες (Pardi et al., 2015) αντί για εβδομάδες, όπως θα συνέβαινε με τις θεραπείες που βασίζονται στο DNA. Μια βραχύβια νουκλεάση DNA μπορεί να δημιουργήσει ένα μακρόβιο γεγονός επεξεργασίας γονιδίων (Finn et al., 2018). Έχει ξεκινήσει μια κλινική δοκιμή ενός SaCas9 που βασίζεται σε αδενο-συσχετιζόμενο ιικό φορέα (Editas Medicine, 2020), αλλά δύο επιχειρήματα υποδηλώνουν ότι η παροδική έκφραση Cas με βάση mRNA ή πρωτεΐνη μπορεί να είναι προτιμότερη σε περιπτώσεις όπου το ένζυμο είναι ενεργή νουκλεάση DNA. Πρώτον, η μακροχρόνια έκφραση μιας ενεργής νουκλεάσης DNA μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα συμβάντα επεξεργασίας σε τόπους εκτός στόχου (Chen et al., 2020). Δεύτερον, η αδενο-σχετισμένη με βάση ιικό φορέα Cas9 έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε ενσωμάτωση φορέα μετά από θραύσματα δίκλωνου DNA (Hanlon et al., 2019).

Τα ένζυμα Cas επιδέχονται βελτιώσεις τριών τύπων που βασίζονται στη βιοχημεία, οι οποίες διευρύνουν τις πιθανές θεραπευτικές τους δυνατότητες (Jiang & Doudna, 2017). Στον πρώτο τύπο βελτίωσης, τα ένζυμα Cas μπορούν να σχεδιαστούν ορθολογικά (Slaymaker et al., 2016) ή να εξελιχθούν (Kleinstiver et al., 2015) για να στοχεύουν το DNA δίπλα σε διαφορετικές θέσεις μοτίβων που γειτνιάζουν με πρωτοδιάστημα. Ένας δεύτερος τύπος βελτίωσης είναι ότι τα ένζυμα Cas που εξελίχθηκαν για να κάνουν δίκλωνες θραύσεις στο DNA στόχο μπορούν

να μεταλλαχθούν σε μία ή δύο ανενεργές περιοχές νουκλεάσης, οδηγώντας σε «νικάσες» ή «νεκρά» ένζυμα Cas (dCas9), αντίστοιχα. Ένας τρίτος τύπος βελτίωσης είναι ότι τα ένζυμα Cas μπορούν να συζευχθούν με τομείς που οδηγούν σε μεταγραφική ενεργοποίηση (Gilbert et al., 2013), επεξεργασία επιγονιδιώματος (Nuñez et al., 2021), επεξεργασία βάσης (Porto et al., 2020), αλλαγές στο μιτοχονδριακό DNA (Mok et al., 2020), ένθεση γονιδίου μεσολαβούμενη από ανάστροφη μεταγραφή (Anzalone et al., 2019) και μετάθεση (Saito et al., 2021). Σημειωτέων, αυτές οι αλλαγές μπορούν επίσης να γίνουν στα ένζυμα Cas12a (Zetsche et al., 2015), τα οποία μπορεί να απαιτούν ένα βραχύτερο οδηγό RNA και να οδηγούν σε κλιμακωτές δίκλωνες θραύσεις.

Συμπληρωματικές αυτών των DNA νουκλεασών είναι οι νουκλεάσες RNA που δεσμεύουν και διασπούν το RNA (Özcan et al., 2021) ή, εναλλακτικά, μπορούν να κατασκευαστούν με έναν τομέα ADAR για να επιτρέψουν την επεξεργασία βάσεων RNA (Abudayyeh et al., 2019) (Εικόνα 1c). Σε σύγκριση με τις νουκλεάσες που επεξεργάζονται το DNA, η μη μεσολαβούμενη από ιούς μεταφορά μιας νουκλεάσης RNA διευκολύνει παροδικές, βραχύτερες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (Cox et al., 2017). Έτσι, ενώ οι νουκλεάσες DNA μπορεί να είναι κατάλληλες για χρόνιες ασθένειες, οι νουκλεάσες RNA μπορεί να είναι πιο χρήσιμες για βραχυπρόθεσμες ασθένειες, όπως παροδική φλεγμονή ή ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνα RNA όπως οι κοροναϊοί (Blanchard et al., 2021). Η παροχή θεραπευτικών CRISPR είναι πρόκληση επειδή τόσο η πρωτεΐνη Cas όσο και το RNA μονού οδηγού (single-guide RNA, sgRNA) πρέπει να υπάρχουν σε επαρκείς συγκεντρώσεις για να σχηματιστούν ενδοκυτταρικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Σε προκλινικές μελέτες, αυτό το πρόβλημα δύο ωφέλιμων φορτίων έχει λυθεί με την ταυτόχρονη παροχή mRNA και sgRNA σε νανοσωματίδια (Blanchard et al., 2021), εκφράζοντας συστατικά sgRNA μέσω αδενοσυνδεόμενου ιού (adeno-associated virus, AAV) πριν από την έγχυση LNP φορτωμένων με Cas9 mRNA (Yin et al., 2016) ή με έγχυση συμπλεγμένα RNPs (Wei et al., 2020). Μια εναλλακτική λύση είναι η μείωση του μεγέθους του ενζύμου Cas, το οποίο μπορεί να διευκολύνει τη συσκευασία μαζί με το sgRNA στο ίδιο σύστημα παροχής.

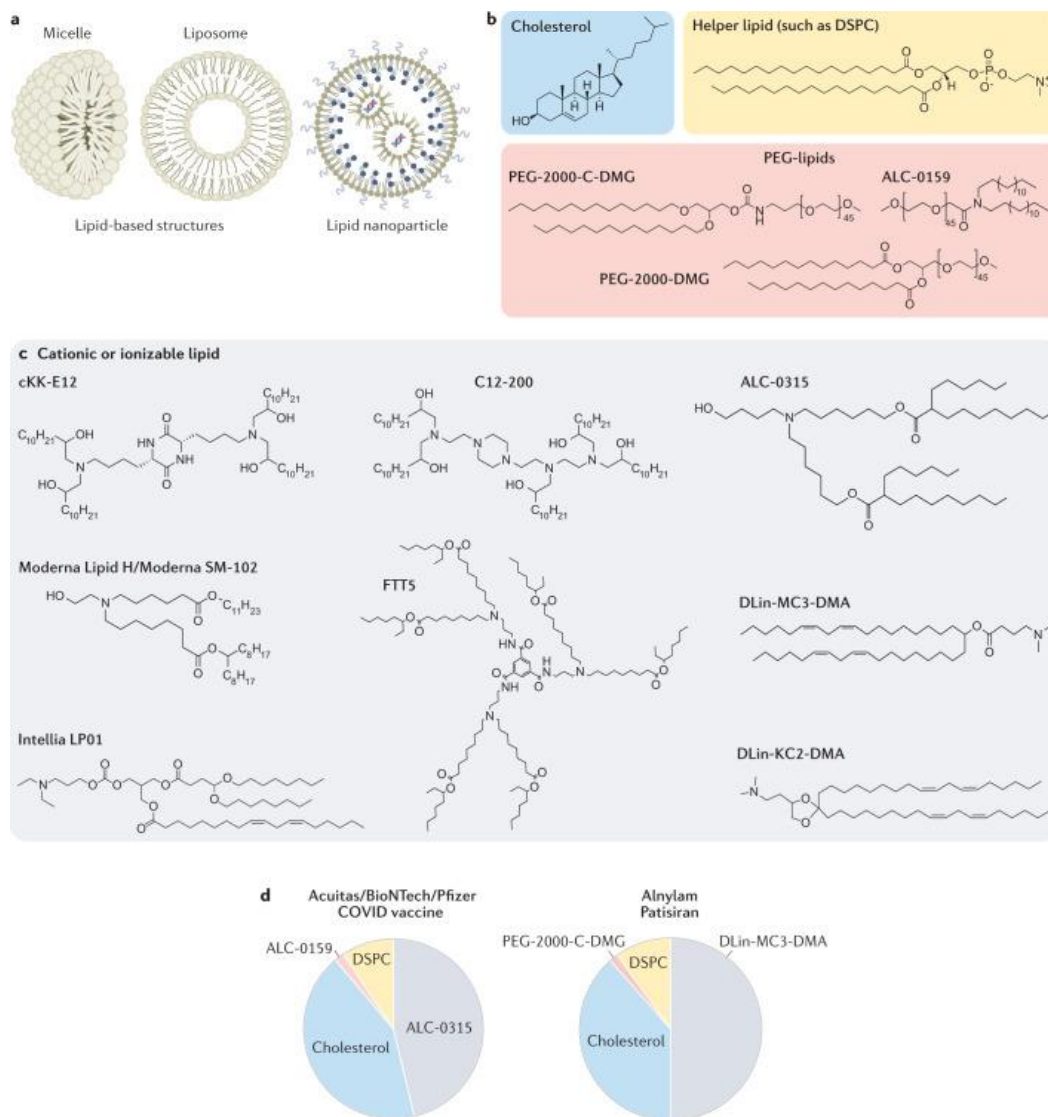
1.3. Φορείς μεταφοράς μορίων RNA στα κύτταρα

Αν και διαφορετικά ωφέλιμα φορτία RNA μπορεί να έχουν διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς δράσης, όλα πρέπει να αποφεύγουν την κάθαρση από όργανα εκτός στόχου, πρέπει να έχουν πρόσβαση στον σωστό ιστό, πρέπει να αλληλεπιδρούν με τον επιθυμητό τύπο κυττάρου σε ένα σύνθετο μικροπεριβάλλον ιστού, πρέπει να απορροφώνται μέσω

ενδοκυττάρωσης και πρέπει να εξέρχονται, χωρίς να προκαλέσουν επιβλαβή ανοσοαπόκριση (Cheng et al., 2015). Αν και τα μικρά ολιγονουκλεοτιδικά θεραπευτικά RNA, συμπεριλαμβανομένων των ASOs, siRNAs και ADAR-ολιγονουκλεοτιδίων, μπορούν να τροποποιηθούν χρησιμοποιώντας σταθερές χημικές ουσίες, τα θεραπευτικά RNA που βασίζονται σε mRNA ή DNA απαιτούν φορέα για είσοδο σε ένα κύτταρο. Για να διευκολυνθεί αυτή η διαδικασία, οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει πολλά συστήματα μεταφοράς μορίων RNA χρησιμοποιώντας μια σειρά υλικών, συμπεριλαμβανομένων πολυμερών και LNPs.

1.3.1. Λιπίδια και νανοσωματίδια με βάση τα λιπίδια

Τα LNPs είναι μια βασική κατηγορία συστήματος χορήγησης φαρμάκων που περιλαμβάνει νανοσωματίδια εγκεκριμένα από τον FDA για την μεταφορά siRNA στο ήπαρ (Adams et al., 2018) και για τη χορήγηση εμβολίου mRNA (Dobrowolsk et al., 2021). Με βάση το μέγεθος της υδρόφιλης ομάδας κεφαλής σε σχέση με το μέγεθος της υδρόφοβης ουράς ή των ουρών (Israelachvili et al., 1977), τα λιπίδια σχηματίζουν διακριτές δομές που περιλαμβάνουν μικκύλια, λιποσώματα και LNPs (Εικόνα 8a). Τα εγκεκριμένα από τον FDA LNP περιέχουν παραλλαγές τεσσάρων βασικών συστατικών: ένα κατιονικό ή ιονιζόμενο λιπίδιο, χοληστερόλη, ένα βοηθητικό λιπίδιο και ένα λιπίδιο πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (poly(ethylene glycol), PEG) (Εικόνα 8b,c).



Εικόνα 8: Οι εγκεκριμένες από τον FDA δομές που βασίζονται σε λιπίδια περιέχουν κάποια παραλλαγή των τεσσάρων βασικών συστατικών: χοληστερόλη, βοηθητικό λιπίδιο, PEG-λιπίδιο και κατιονικό ή ιονιζόμενο λιπίδιο (Paunovska et al., 2022).

Οι επιστήμονες ερεύνησαν τη δομή των συστημάτων μεταφοράς που βασίζονται σε λιπίδια που συμπλέκονται με νουκλεϊκό οξύ (Herrera et al., 2021) και απέδειξαν ότι η δομή των λιπιδίων αλλάζει τον τρόπο με τον οποίο τα LNPs αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα (Semple et al., 2010). Δεδομένου ότι η δομή των λιπιδίων επηρεάζει την μεταφορά και ότι τα λιπίδια μπορούν να συντεθούν εύκολα χρησιμοποιώντας χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των αντιδράσεων με βάση την προσθήκη Michael, με βάση το εποξειδίο και την αλκοόλη, οι επιστήμονες έχουν δημιουργήσει βιβλιοθήκες με δεκάδες έως χιλιάδες χημικά διακριτά συστήματα μεταφοράς λιπιδίων (Zhang et al., 2021). Πολλές από αυτές τις προσπάθειες επικεντρώθηκαν στη βελτίωση της μεταφοράς siRNA στα ηπατοκύτταρα σε ποντίκια (Love et al., 2010). Αυτή η έρευνα, μαζί με μια πιο ορθολογική προσέγγιση στο σχεδιασμό των λιπιδίων

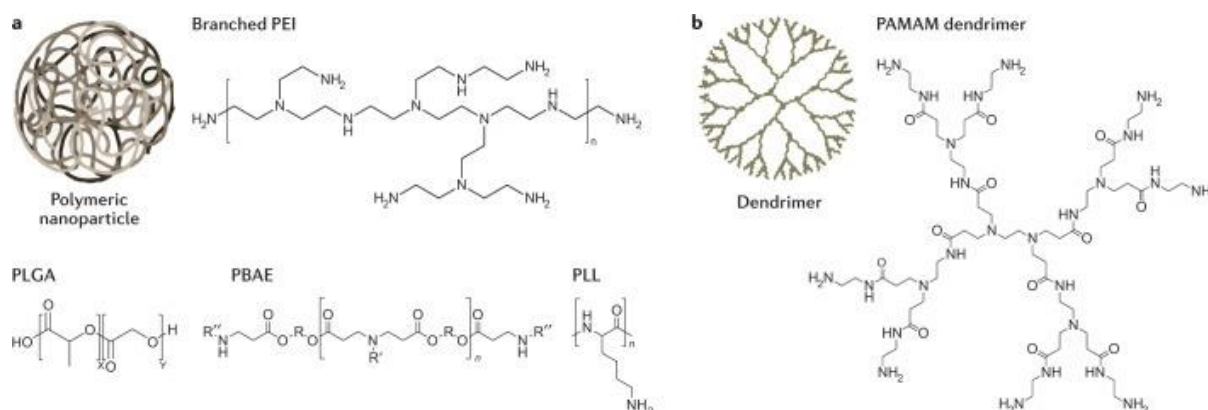
(Semple et al., 2010), μείωσε τη δόση που απαιτείται για την ισχυρή *in vivo* σίγαση ενός γονιδίου των ηπατοκυττάρων σε ποντίκια από περίπου 1,0 mg/kg (Zimmermann et al., 2006) σε 0,002 mg/kg (Dong et al., 2014). Τα βασικά λιπίδια που παρείχαν siRNA σε πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου περιελάμβαναν το C12-200, το οποίο συντέθηκε χρησιμοποιώντας χημεία εποξειδίου-αμίνης (Love et al., 2010), το cKK-E12, μια πεπτιδοειδή λιπιδική ένωση (Dong et al., 2014), το DLin-KC2-DMA, ένα ιονιζόμενο λιπίδιο που προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας ορθολογικό σχεδιασμό (Semple et al., 2010) και το DLin-MC3-DMA (Jayaraman et al., 2012), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στο Patisiran για τη θεραπεία του hATTR (Adams et al., 2018) (Εικόνα 2c,d).

Τα LNP έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά mRNA στο ήπαρ σε ποντίκια, σε πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου και σε ανθρώπους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στα LNPs χρησιμοποιήθηκαν λιπίδια που είχαν αναπτυχθεί προηγουμένως για την παροχή siRNA. Για παράδειγμα, σε ποντίκια, τα LNP που σκευάστηκαν με cKK-E12 (Paunovska et al., 2019), C12-200 (Kauffman et al., 2015) και DLin-MC3-DMA (Sedic et al., 2018) μετέφεραν mRNA στο ήπαρ. Νεότερα λιπίδια που αναφέρθηκαν, όπως το LP01 (Finn et al., 2018) (Intellia Therapeutics), το Lipid H (ModernaTx, 2021) (Moderna) και το FTT5 (Zhang et al., 2020) (Ohio State and Beam Therapeutics), έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά mRNA στο ήπαρ του ποντικού. Πρόσφατα, δύο LNP που διαμορφώθηκαν με ένα μη αναφερόμενο κατιονικό ή ιονιζόμενο λιπίδιο, PEG-λιπίδιο, χοληστερόλη και 1,2-διστεαροϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) μετέφεραν mRNA που κωδικοποιεί Cas9 και sgRNA επεξεργασίας βάσης που στοχεύει το ηπατικό PCSK9 σε πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου (Musunuru et al., 2021). Μια μόνο χορήγηση LNP οδήγησε σε μήνες συνεχούς σίγησης του PCSK9. Επιπλέον, η μακροχρόνια σίγαση του PCSK9 με τη μεσολάβηση αντισωμάτων (Sabatine et al., 2017) ή siRNA (Ray et al., 2020) έχει δείξει ευεργετικά αποτελέσματα στην καρδιαγγειακή νόσο στους ανθρώπους. Ξεχωριστά, η Beam Therapeutics (2021) ανέφερε ότι η μεσολάβηση του LNP στη χορήγηση οδήγησε σε παρατεταμένα αποτελέσματα στο ήπαρ πρωτευόντων πλην του ανθρώπου. Εκτός από αυτές τις προκλινικές μελέτες, η Intellia δημοσίευσε δεδομένα σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε δόση NTLA-2001, που χρησιμοποιείται για την αδρανοποίηση του γονιδίου *TTR*. Η αδρανοποίηση του *TTR* έχει επίσης επικυρωθεί στο παρελθόν σε ανθρώπους. Το siRNA ή τα ASO που στοχεύουν το *TTR* επιβράδυναν την εξέλιξη της hATTR-PN (Benson et al., 2018). Εκτός από το ωφέλιμο φορτίο RNA, τα LNP Alnylam, Moderna και Pfizer/BioNTech/Acuitas περιλαμβάνουν τέσσερα συστατικά: τα κατιονικά ή ιονίσιμα λιπίδια DLin-MC3-DMA (Alnylam), SM-102 (Moderna) ή ALC-0315 (Pfizer/ BioNTech/Acuitas), χοληστερόλη, PEG-

λιπίδια PEG-2000-C-DMG (Alnylam), PEG-2000-DMG (Moderna) ή ALC-0159 (Pfizer/BioNTech/Acuitas) και DSPC (Εικόνα 2b-d). Αν και οι περισσότερες προκλινικές μελέτες έχουν αξιολογήσει πώς η δομή του κατιονικού ή ιονιζόμενου λιπιδίου επηρεάζει τη μεταφορά, τα άλλα τρία συστατικά μπορούν επίσης να την επηρεάσουν (Kulkarni et al., 2018). Για παράδειγμα, αλλάζοντας τη χοληστερόλη, το PEG-λιπίδιο ή το «βοηθητικό» λιπίδιο, ένα LNP που μετέφερε siRNA σε πνευμονικά και καρδιαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα σε ποντίκια (Dahlman et al., 2014) και μη ανθρώπινα πρωτεύοντα (Sago et al., 2018) στοχεύτηκε εκ νέου για να μεταφέρει siRNA (Khan et al., 2018), sgRNA (Paunovska et al., 2018) ή mRNA (Sago et al., 2018) στο ηπατικό οστό σπληνικά ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση καθώς και επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα μετά από νεφελοποίηση (Lokugamage et al., 2021). Σε πρόσθετα παραδείγματα, η αλλαγή της δομής του PEG-λιπιδίου ή του μοριακού του ποσοστού άλλαξε τη φαρμακοκινητική του LNP και την παροχή siRNA του ήπατος (Mui et al., 2013) σε ποντικούς και επηρέασε τη μεταφορά εντός του οφθαλμού (Ryals et al., 2020). Τόσο το PEG όσο και το λιπιδικό συστατικό του PEG-λιπιδίου επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά με το LNP και τα κύτταρα: το λιπίδιο «αγκυρώνει» το PEG-λιπίδιο στο LNP, ενώ το υδρόφιλο PEG αλληλεπιδρά με το νερό στο αίμα, δημιουργώντας έτσι ένα υδατικό φράγμα παρόμοια με άλλα PEGολυομένα νανοφάρμακα (Suk et al., 2016). Παρομοίως, αν και τα περισσότερα LNP έχουν διαμορφωθεί με μη τροποποιημένες χοληστερόλες, η χορήγηση LNP σε κυτταροκαλλιέργειες και σε ποντίκια έχει αποδειχθεί ότι βελτιώθηκε με τη χρήση οξειδωμένων χοληστερολών (Paunovska et al., 2019), εστεροποιημένων χοληστερολών (Paunovska et al., 2018) ή αναλόγων χοληστερόλης όπως φυτοστερόλες (Herrera et al., 2021). Αν και ο μηχανισμός πίσω από τις μεσολαβούμενες από τη χοληστερόλη βελτιώσεις στη μεταφορά παραμένει άγνωστος, η ενσωμάτωση τροποποιημένης χοληστερόλης στα LNPs μπορεί να αλλάξει τη δομή τους (Eygeris et al., 2020). Οι ερευνητές έχουν αποδείξει ότι η αντικατάσταση του DSPC με άλλα λιπίδια μπορεί να βοηθήσει τη μεταφορά των LNP στον σπλήνα ή στους πνεύμονες (Kauffman et al., 2018). Ομοίως, με την προσθήκη ενός άλλου λιπιδίου στο LNP, αλλάζοντας έτσι το LNP από ένα σύστημα τεσσάρων συστατικών σε ένα σύστημα πέντε συστατικών, τα LNP στοχεύονταν στον πνεύμονα και τη σπλήνα σε μια διαδικασία που ονομάζεται επιλεκτική στόχευση οργάνων (Cheng et al., 2020). Τέλος, τόσο η Intellia (2021) όσο και η Beam Therapeutics (2021) έχουν μοιραστεί πληροφορίες ότι τα LNPs μπορούν να κατασκευαστούν για να μεταφέρουν mRNA σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα σε ποντίκια, με την ελπίδα να αναπτύξουν *in vivo* θεραπείες στόχευσης αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων.

1.3.2. Πολυμερή και νανοσωματίδια με βάση πολυμερή

Πολλά μη ικκά συστήματα μεταφοράς RNA χρησιμοποιούν επίσης πολυμερή και πολυμερή νανοσωματίδια (Rai et al., 2019) (Εικόνα 9a). Οι χημικοί μπορούν να διαφοροποιήσουν τα χαρακτηριστικά του πολυμερούς, όπως το φορτίο, η ικανότητα αποικοδόμησης και το μοριακό βάρος, τα οποία επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο τα πολυμερή μεταφέρουν RNA στα κύτταρα (Cruchó & Barros, 2017). Ένα πολυμερές που χρησιμοποιείται συχνά είναι το πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA). Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων PLGA έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη μεταφορά φαρμάκων μικρών μορίων αλλά όχι για την μεταφορά νουκλεϊκών οξέων (Zhong et al., 2018). Σε ουδέτερο pH, το PLGA δεν έχει το θετικό φορτίο που απαιτείται για να συμπλοκοποιήσει τον σκελετό του ανιονικού φωσφοδιεστερικού RNA. Έτσι, για να χρησιμοποιήσουν το PLGA ως σύστημα μεταφοράς RNA, οι επιστήμονες έχουν προσθέσει κατιονικές χημικές ομάδες όπως η χιτοζάνη για τη μεταφορά siRNA σε ποντίκια (Xiao et al., 2016).



Εικόνα 9: Το RNA μπορεί να μεταφερθεί χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια που έχουν διαμορφωθεί με πολυμερή ή δενδριμερή (Paunovska et al., 2022).

Τα πολυμερή που περιέχουν ομάδες αμίνης που μπορούν να γίνουν κατιονικές, όπως η πολυαιθυλενιμίνη (polyethylenimine, PEI) και η πολυ(1-λυσίνη) (and poly(1-lysine), PLL), μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με το RNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και να το παραδώσουν στα κύτταρα (Ewe et al., 2017). Ωστόσο, τα μη τροποποιημένα PEI και PLL δεν είναι πάντα καλά ανεκτά (Gao et al., 2011) και η ικανότητα μορφομετατροπής PEI και η τοξικότητα αυξάνονται με το μοριακό βάρος (Breunig et al., 2007). Έτσι, τα PEI και PLL έχουν τροποποιηθεί χημικά για να βελτιώσουν την *in vivo* αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα. Για παράδειγμα, νανοσωματίδια κατασκευασμένα με PEI μοσχευμένο με PEG έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά mRNA σε κύτταρα του ανοσοποιητικού στους πνεύμονες (Ke

et al., 2020) και συζυγή κυκλοδεξτρίνης-PEI έχουν χρησιμοποιηθεί για την παροχή εμβολίου mRNA *in vivo* (Tan et al., 2020). Ομοίως, τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου τροποποιήθηκαν επιφανειακά με PLL για να παραδώσουν γονίδια στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε ποντίκια (Xiang et al., 2003).

Μια άλλη κατηγορία κατιονικών πολυμερών είναι οι πολυ(βήτα-αμινο εστέρες) (poly(beta-amino ester)s, PBAEs), οι οποίοι συντίθενται με σύζευξη μονομερών αμίνης σε διακρυλικά. Αυτά τα πολυμερή, τα οποία σχεδιάστηκαν για να έχουν βελτιωμένη βιοαποικοδόμηση και κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τα PEI και PLL (Yin et al., 2014), περιέχουν κατιονικές αμίνες καθώς και βιοαποικοδομήσιμους εστερικούς δεσμούς (Choi et al., 2020). Η πρώιμη έρευνα χρησιμοποίησε τη χημεία προσθήκης Michael για να συνθέσει εκατοντάδες χημικά διακριτά PBAE και στη συνέχεια αξιολόγησε πώς αυτά τα νανοσωματίδια μετέφεραν DNA (Green et al., 2008) και RNA σε κυτταρική καλλιέργεια (Vandenbroucke et al., 2008). Αυτές οι «βιβλιοθήκες» PBAE έδωσαν τη δυνατότητα στους ερευνητές να μελετήσουν πώς η χημική δομή του PBAE επηρεάζει τη μεταφορά του φαρμάκου, δημιουργώντας έτσι κανόνες σχεδιασμού για τα επόμενα PBAE (Anderson et al., 2003; 2005). Οι αρχικοί κανόνες σχεδιασμού πρότειναν ότι τα αποτελεσματικά πολυμερή ήταν σχεδόν πάντα υδρόφοβα, είχαν μονοαλκοολικές ή διαλκοολικές πλευρικές ομάδες και είχαν γραμμικές δις (δευτερεύουσες) αμίνες (Anderson et al., 2003). Μια μελέτη παρακολούθησης που χρησιμοποιεί αυτά τα κριτήρια σχεδιασμού έδειξε ότι τα κορυφαία πολυμερή σχηματίστηκαν όλα από αμινοαλκοόλες και ήταν παρόμοια χημικά, διαφέροντας μόνο κατά έναν άνθρακα (Anderson et al., 2005). Γενικότερα, αυτές οι μελέτες κατέδειξαν τη σκοπιμότητα της χημικής σύνθεσης υψηλής απόδοσης ακολουθούμενη από μελέτες χορήγησης φαρμάκων υψηλής απόδοσης, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί σε άλλες χημικές κατηγορίες νανοσωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων των LNPs (Altinoglu et al., 2015). Τα PBAEs έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά φορέων DNA σε πνευμονικά κύτταρα μετά από νεφελοποίηση (Mastorakos et al., 2015), την παροχή mRNA ενδορινικά (Su et al., 2011) και την παροχή siRNA σε μοντέλο όγκου ανθρώπινου ορθοτοπικού γλοιοβλαστώματος σε ποντίκια (Kozielski et al., 2019). Πιο πρόσφατα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν επίσης πολυμερή με βάση το PBAE για την παροχή Cas13a mRNA και για την καθοδήγηση του RNA στην αναπνευστική οδό ποντικών και χάμστερ μέσω νεφελοποίησης για τη θεραπεία του SARS-Cov-2 (Blanchard et al., 2021).

Οι ερευνητές συνέθεσαν επίσης υβρίδια λιπιδίου-πολυμερούς και βρήκαν ότι η προσθήκη λιπιδίων στα PBAE βελτίωσε τη σταθερότητα και την απόδοση του ορού (Kaczmarek et al., 2016). Μια πρόσθετη κατηγορία πολυμερών που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά RNA είναι

τα δενδριμερή, τα οποία αποτελούνται από έναν καθορισμένο αριθμό διακλαδισμένων μονομερών που προέρχονται από ένα μόριο κεντρικού πυρήνα (Εικόνα 3b). Τα δενδριμερή που συντίθενται με κατιονικές ομάδες, όπως η πολυ(αμιδοαμίνη) (poly(amidoamine), PAMAM) ή η PLL, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα και να μεταφέρουν RNA στα κύτταρα. Η δομή του δενδριμερούς έχει επίσης τροποποιηθεί για να προστατεύει τα νουκλεϊκά οξέα από την ενζυματική αποικοδόμηση (Bielinska et al., 1997) και να ενισχύσει την ενδοσωματική διαφυγή (Sonawane et al., 2003).

Κεφάλαιο 2: Εγκεκριμένες RNA θεραπείες από τον FDA για μονογονιδιακά νοσήματα

2.1 Νωτιαία μυϊκή ατροφία

Η νωτιαία μυϊκή ατροφία (Spinal muscular atrophy, SMA) χαρακτηρίζεται από προοδευτική μυϊκή αδυναμία και ατροφία των μυών του αναπνευστικού συστήματος, των βολβών και των άκρων που οφείλεται σε απώλεια κινητικών νευρώνων στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού. Η SMA είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος που μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις τύπους με βάση τα αναπτυξιακά ορόσημα και τον χρόνο έναρξης. Ο τύπος IV ξεκινά κατά την ενήλικη ζωή, ενώ οι άλλοι τρεις τύποι ξεκινούν στην παιδική ηλικία. Ο πιο σοβαρός είναι ο τύπος I, ο οποίος αντιπροσωπεύει περίπου το 60% των ασθενών, ενώ ο τύπος III είναι σχετικά ήπιος. Η συχνότητα εμφάνισης και των τεσσάρων τύπων είναι περίπου 1:11000 ζωντανές γεννήσεις, και είναι ένας από τους πιο κοινούς γενετικούς παράγοντες για την παιδική θνησιμότητα (Hua et al., 2010).

Η SMA οφείλεται στην παρουσία ομόζυγης έλλειψης στο γονίδιο του κινητικού νευρώνα επιβίωσης 1 (survival motor neuron 1, SMN1). Το SMN1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 38-kDa η οποία λειτουργεί ως ένα μικρό πυρηνικό σωματίδιο ριβονουκλεοπρωτεΐνης (small nuclear ribonucleoprotein particle, snRNP) με ουσιαστικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων (Singh et al., 2006).

Ο κινητικός νευρώνας επιβίωσης 2 (survival motor neuron 2, SMN2) είναι ένα σχεδόν πανομοιότυπο αντίγραφο γονιδίου SMN με το SMN1 στους ανθρώπους. Και τα δύο γονίδια αποτελούνται από ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο χρωμόσωμα 5q13, και διαφέρουν σε 11 νουκλεοτίδια (Hua et al., 2007). Κατά το μάτισμα του πρώιμου mRNA, μια αντικατάσταση C>T στη θέση 6 του εξονίου 7 οδηγεί σε παράλειψη του εξονίου αυτού, οδηγώντας στη διαφοροποίηση του SMN1 σε SMN2. Η νουκλεοτιδική αυτή αλλαγή διαταράσσει έναν εξονικό ενισχυτή ματίσματος, ο οποίος εξαρτάται από τον παράγοντα ματίσματος 2/εναλλακτικό παράγοντα ματίσματος (splicing factor/alternative splicing factor, SF2/ASF) που υπάρχει στο εξόνιο 7 του SMN1 ως μοτίβο επταμερούς (νουκλεοτίδια +6 έως +13, CAGACAA). Ένας εξονικός αποσιωπητής ματίσματος (exonic splicing silencer, ESS) στο SMN2 δημιουργείται επίσης από τη νουκλεοτιδική αλλαγή C>T στην οποία η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP) A1, μια γνωστή πρωτεΐνη καταστολέα, συνδέεται με την ESS για να αναστέλλει το μάτισμα (Kashima & Manley, 2003). Το εξόνιο 7 αποκλείεται και μια ασταθής κολοβωμένη πρωτεΐνη παράγεται στο 80–90% των μεταγραφών που αποικοδομούνται ταχέως (Cartegni & Krainer, 2002). Η

παράλειψη του εξονίου 7 έχει ως αποτέλεσμα το SMN2 να μην μπορεί να συμπληρώσει την απώλεια του SMN1, προκαλώντας την εμφάνιση SMA.

Ως αποτέλεσμα, η διόρθωση του ματίσματος του εξονίου 7 στο SMN2 αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο για θεραπεία, καθώς όλοι οι ασθενείς με SMA έχουν λειτουργικό το γονίδιο SMN2. Το 2006 ανακαλύφθηκε από τους Singh, et al. (2006), ένας ιντρονικός αποσιωπητής του ματίσματος (intronic splicing silencers, ISS) για το ιντρόνιο-7 του SMN2, που ονομάζεται ISS-N1, στα ανθρώπινα γονίδια SMN1/2. Ο ISS-N1 είναι ένα ιντρονικό cis-στοιχείο που βρίσκεται στην 5' θέση ματίσματος, καθοδικά του εξονίου 7 και στο μη συντηρημένο τμήμα του τελικού ιντρονίου 7 του SMN στους ανθρώπους. Αυτό το στοιχείο θεωρείται απαραίτητο συστατικό που ρυθμίζει το εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 7 των SMN σε ένα ρυθμιστικό δίκτυο που σχετίζεται με την παθογένεση της SMA. Ο ISS-N1 λειτουργεί για να στρατολογήει κανονικά συναρμογημένους καταστολείς hnRNP A1 και A2 που αναστέλλουν την ένταξη του εξονίου 7.

2.1.1 Nusinersen

Το Nusinersen είναι ένα 18-μερές ASO τροποποιημένο από φωσφοροθειοϊκό 2'-O-2-μεθοξυαιθυλεστέρα για να το προστατεύει από ταχεία αποικοδόμηση. Σχεδιάστηκε για να εμποδίζει τη δέσμευση του hnRNP A1 στο μοτίβο N1-(ISS-N1) του ιντρονικού σιγαστήρα ματίσματος στο εσόνιο 7 του γονιδίου SMN2. Η παρεμπόδιση της σύνδεσης του hnRNP A1 σε αυτόν τον τομέα με τη σειρά του διαταράσσει μια θέση αναστολέα ματίσματος και έτσι προάγει την ένταξη του εξονίου 7 στο pre-mRNA που προέρχεται από το γονίδιο SMN2 (Hua et al., 2008). Λόγω του μεγέθους τους, τα ASO δεν μπορούν να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και πρέπει να εφαρμοστούν με ενδορραχιαία χορήγηση, ώστε να μπορούν να προσληφθούν στους κινητικούς νευρώνες από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Το Nusinersen ήταν το πρώτο φάρμακο που εγκρίθηκε για τη θεραπεία της SMA από τον FDA τον Δεκέμβριο του 2016. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 31 κλινικές δοκιμές από το <https://clinicaltrials.gov>. Στη συνέχεια αναφέρονται ορισμένες από αυτές που επικεντρώνονται στην εύρεση δόσης με δεδομένα που έχουν ήδη δημοσιευτεί.

Η πρώτη κλινική δοκιμή φάσης I με Nusinersen (CS1, NCT01494701 και CS10, NCT01780246) διεξήχθη με 28 ασθενείς (ηλικίας 2 έως 14 ετών) με SMA τύπου 2 και τύπου 3. Αυτή η μελέτη παρείχε στοιχεία ότι η ενδορραχιαία χορήγηση μιας εφάπαξ δόσης Nusinersen (1 mg, 3 mg, 6 mg ή 9 mg) είναι ασφαλής και καλά ανεκτή. Το Nusinersen υπερδιπλασίασε τα επίπεδα πρωτεΐνης SMN στο ENY στις ομάδες θεραπείας των 6 mg και 9 mg. Αυτό συνοδεύτηκε από μια σημαντική αύξηση της κινητικής λειτουργίας που

απεικονίζεται από τις βαθμολογίες Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSSE) στην ομάδα των 9 mg (Chiriboga et al., 2016). Μια επακόλουθη ανοιχτή μελέτη φάσης II (CS3A, NCT01839656) με ασθενείς με SMA τύπου 1 (ηλικίας 3 εβδομάδων έως 6 μηνών) με 2–3 αντίγραφα SMN2 διεξήχθη με πολλαπλές δόσεις Nusinersen. Τέσσερις ασθενείς έλαβαν αύξουσες δόσεις από 6 έως 12 mg και 16 ασθενείς έλαβαν ενδορραχιαία ένεση 12 mg. Οι ασθενείς στην ομάδα των 12 mg παρουσίασαν αυξητικά επιτεύγματα στα αναπτυξιακά κινητικά ορόσημα στη βαθμολογία Hammersmith Infant Neurological Examination-2 (HINE-2) (από την έναρξη έως την τελευταία επίσκεψη $p < 0,0001$), βελτίωση στις βαθμολογίες κινητικής λειτουργίας στο Children’s Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND) ($p = 0,0013$) και σημαντικά αυξημένη δυνατότητα δράσης σύνθετων μυών για τον απαγωγό του μικρού δακτύλου και τον πρόσθιο κνημιαίο μυ μέσω διέγερσης του ωλένιου νεύρου ή του περονιαίου νεύρου. Η εξέταση του μεταθανάτιου ιστού αποκάλυψε μια ομοιόμορφη κατανομή του Nusinersen σε όλο το νωτιαίο μυελό, συμπεριλαμβανομένων των κινητικών νευρώνων και του εγκεφάλου ενώ ταυτόχρονα υπήρχε με μια ενισχυμένη συμπερίληψη του εξονίου 7 στο SMN2 και αύξηση της πρωτεΐνης SMN (Finkel et al., 2016).

Μεταγενέστερες μελέτες με θεραπεία με Nusinersen σε 28 ασθενείς με SMA τύπου 2 και τύπου 3 (ηλικία 2-5 ετών) για περίπου 3 χρόνια έδειξαν μακροπρόθεσμο όφελος (CS2, NCT01703988 και CS12, NCT02052791). Οι ασθενείς ξεκίνησαν με αύξουσες δόσεις (3, 6, 9, 12 mg σε 253 ημέρες) ακολουθούμενη από μια περίοδο θεραπείας με 12 mg κάθε 6 μήνες για περισσότερα από δύο χρόνια (CS12) (Darras et al., 2019). Ακολούθησε η μελέτη SHINE (NCT02594124) με συνεχιζόμενες εφαρμογές 12 mg Nusinersen για την αξιολόγηση των μακροπρόθεσμων κλινικών επιπτώσεων του Nusinersen. Η θεραπεία κατά τα πρώτα τρία χρόνια είχε ως αποτέλεσμα βελτιώσεις της κινητικής λειτουργίας και σταθεροποίηση της δραστηριότητας της νόσου που διέφεραν σημαντικά από το φυσικό ιστορικό της νόσου. Οι συμμετέχοντες με μεταγενέστερη έναρξη SMA στο CS2/CS12/SHINE εμφάνισαν αυξήσεις στις αποστάσεις περπατήματος που δεν παρατηρήθηκαν σε κούρτες ελέγχου (Montes et al., 2018) με σταθεροποίηση στην κόπωση και βελτιώσεις της περιπατητικής λειτουργίας κατά την περίοδο της θεραπείας με Nusinersen (~ 5,5 χρόνια) (Montes et al., 2019).

Τα αποτελέσματα της φάσης I/II οδήγησαν στον σχεδιασμό δύο μεγάλων, τυχαιοποιημένων, ελεγχόμενων μελετών φάσης III με Nusinersen: ENDEAR (NCT02193074) σε ασθενείς με SMA τύπου 1 και CHERISH (NCT02292537) σε ασθενείς με SMA τύπου 2. Η μελέτη ENDEAR (NCT02193074) περιελάμβανε 122 ασθενείς με SMA τύπου 1 σε ηλικία 7 μηνών ή μικρότερη. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν πολλαπλές ενδορραχιαίες δόσεις

Nusinersen ή μια εικονική διαδικασία σε αναλογία 2 προς 1 (Finkel et al., 2017). Στη μελέτη CHERISH (NCT02292537) 126 παιδιά χωρίστηκαν τυχαία, σε αναλογία 2:1, για να λάβουν πολλαπλές δόσεις των 12 mg Nusinersen ή μια εικονική διαδικασία. Η διάμεση ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης ήταν 4 έτη (2-9 έτη) στην ομάδα Nusinersen και 3 έτη (2-7 έτη) στην ομάδα ελέγχου (Mercuri et al., 2018). Και στις δύο μελέτες, τα παιδιά που έλαβαν θεραπεία παρουσίασαν σημαντική βελτίωση στην κινητική λειτουργία σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Στη μελέτη ENDEAR η συνολική επιβίωση ήταν υψηλότερη στην ομάδα που έλαβε Nusinersen από ό,τι στην ομάδα ελέγχου. Έγινε μια πολύ εντυπωσιακή παρατήρηση, καθώς τα βρέφη με μικρότερη διάρκεια νόσου κατά την έναρξη της μελέτης ήταν πιο πιθανό να ωφεληθούν από το Nusinersen από εκείνα με μεγαλύτερη διάρκεια νόσου. Ο κρίσιμος χρόνος έναρξης της θεραπείας με Nusinersen για μέγιστο θεραπευτικό όφελος βρίσκεται επί του παρόντος υπό διερεύνηση σε μια μελέτη φάσης II με προσυμπτωματικούς ασθενείς (NURTURE, NCT02386553). Οι 25 ασθενείς που περιλαμβάνονται είναι ακόμη ζωντανοί και είναι σε θέση να κάθονται χωρίς υποστήριξη και επιτυγχάνουν βάδιση με ή χωρίς υποστήριξη και ακόμα δεν χρειάζονται υποστήριξη αερισμού (De Vivo et al., 2019).

Τον Δεκέμβριο του 2016 το Nusinersen/Spinraza™ έγινε διαθέσιμο σε συνιστώμενη δόση 12 mg ανά θεραπεία για όλους τους ασθενείς. Επί του παρόντος, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των υψηλότερων δόσεων βρίσκονται στο επίκεντρο της μελέτης DEVOTE (NCT04089566). Η DEVOTE υποδιαιρείται σε μέρη: A, B, Γ. Το Μέρος A είναι μια μελέτη ανοιχτής επισημάνσης που επικεντρώνεται στην ασφάλεια και την ανεκτικότητα του Nusinersen (3 × 28 mg δόσεις φόρτωσης και 2 × 28 mg δόσεις συντήρησης). Το Μέρος B θα πρέπει να καταδεικνύει ότι οι υψηλότερες δόσεις βελτιώνουν τα αποτελέσματα των συμμετεχόντων που μετρώνται με βάση το CHOP INTEND και την ικανότητα κινητικών δεξιοτήτων. Αυτό το μέρος έχει σχεδιαστεί ως μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη με ενεργό δράση μελέτη σε ασθενείς με SMA με έναρξη στη βρεφική ηλικία ή αργότερα. Οι ασθενείς θα λάβουν δόσεις φόρτισης 4 × 12 mg, ακολουθούμενες από δόσεις συντήρησης 2 × 12 mg ή δόσεις φόρτισης 2 × 50 mg και δόσεις συντήρησης 2 × 28 mg. Οι συμμετέχοντες που λαμβάνουν τα εγκεκριμένα από τον FDA 12 mg Nusinersen θα χρησιμεύσουν ως μάρτυρες. Το ανοιχτό μέρος Γ θα αξιολογήσει την ασφάλεια και την ανεκτικότητα των ασθενών σε μετάβαση που έχουν ήδη λάβει θεραπεία με Nusinersen για τουλάχιστον ένα χρόνο. Θα λάβουν μια εφάπαξ αρχική δόση 20 mg ακολουθούμενη από δύο δόσεις συντήρησης των 28 mg σε τέσσερις και οκτώ μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας. Στη συνέχεια, τη δοκιμή DEVOTE θα ακολουθήσει η ανοιχτή μελέτη επέκτασης ONWARD (NCT04729907) ως μακροπρόθεσμη επέκταση.

Προγράμματα διευρυμένης πρόσβασης για το Nusinersen είχαν ξεκινήσει σε αρκετές χώρες για την επαλήθευση του θεραπευτικού οφέλους με βελτιώσεις στην κινητική λειτουργία (Gidaro & Servais, 2019). Δύο μελέτες σε ασθενείς με SMA με έναρξη στην ενήλικη ζωή (μέση ηλικία 16–65 και 18–72) αναφέρθηκαν πρόσφατα από τους Hagenacker et al. (2020) και Maggi et al. (2020). Το πρωταρχικό αποτέλεσμα και στις δύο μελέτες ήταν η αύξηση της βαθμολογίας HFMSE. Οι Maggi et al. ανέφεραν επιπλέον ότι η βαθμολογία Revised Upper Limb Module (RULM) βελτιώθηκε σημαντικά σε άτομα που κάθονται (Maggi et al., 2020). Και οι δύο μελέτες παρέχουν στοιχεία για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του Nusinersen σε ασθενείς με SMA τύπου 2 και τύπου 3.

Σε ορισμένους ασθενείς, η υδροκεφαλία έχει αναφερθεί ως πιθανή παρενέργεια (Gidaro & Servais, 2019). Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού και δυσκοιλιότητα σε βρέφη SMA, ενώ πονοκέφαλος, έμετος και πόνος στην πλάτη παρατηρούνται επίσης σε ασθενείς με SMA με μεταγενέστερη έναρξη. Σε ασθενείς με SMA με σημαντική σκολίωση ή ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική σπονδυλοδεσία, η ενδορραχιαία εφαρμογή του Nusinersen είναι δύσκολη. Συνήθως απαιτεί τη χρήση καθοδήγησης τομογραφίας υπολογιστή, αγγειογραφίας, υπερήχων ή εναλλακτικών τεχνικών χορήγησης όπως υποδόριοι ενδορραχιαίους καθετήρες (Weaver et al., 2018). Ωστόσο, τέτοιες νέες συσκευές για τη διαχείριση του Nusinersen δεν έχουν εγκριθεί μέχρι στιγμής από τις αρμόδιες ρυθμιστικές αρχές.

Για άγνωστους λόγους, ορισμένοι ασθενείς ανταποκρίνονται καλύτερα στο ASO από άλλους (Darras et al., 2019). Ένα ζήτημα με το Nusinersen/Spinraza™ είναι η έλλειψη συστηματικής διαθεσιμότητας και η πιθανή έλλειψη αποτελεσματικότητας για την εξουδετέρωση των μακροπρόθεσμων ανεπιθύμητων ενεργειών των χαμηλών επιπέδων SMN στους περιφερικούς ιστούς. Το Nusinersen αποκαθιστά την έκφραση SMN μόνο στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Υπάρχουν προκλινικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η αποκατάσταση των επιπέδων πρωτεΐνης SMN μπορεί επίσης να είναι σημαντική για περιφερικούς ιστούς όπως το ήπαρ, τα νεφρά, οι μύες και η καρδιά (Hamilton & Gillingwater, 2013).

2.2 Μυϊκή δυστροφία Duchenne

Ο Γάλλος νευρολόγος, Guillaume B. A. Duchenne, ανέφερε για πρώτη φορά έναν ασθενή με νευρομυϊκή επιπλοκή το 1869, με τη νόσο να ονομάζεται στη συνέχεια ως μυϊκή δυστροφία Duchenne (Duchenne muscular dystrophy, DMD) (O'Brien & Kunkel, 2001). Στους ασθενείς με DMD παρατηρείται απώλεια της ικανότητας βάδισης σε μικρή ηλικία, σταδιακά

ακολουθούν καρδιακή και αναπνευστική ανεπάρκεια ως τελευταία στάδια της νόσου. (Hanson et al., 2021). Η DMD προκαλείται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο DMD που εντοπίζεται στο Xp21.2–p21.1 στο χρωμόσωμα X και επηρεάζει 1: 3.600-5.000 αγόρια παγκοσμίως (Hanson et al., 2021). Μεταξύ των προσβεβλημένων ατόμων, τα δύο τρίτα των ασθενών κληρονομούν μεταλλαγμένο DMD από μια ετερόζυγη μητέρα που δεν γνωρίζει ότι είναι φορέας, ενώ το υπόλοιπο ένα τρίτο των περιπτώσεων προκύπτουν από de novo μεταλλάξεις στο γονίδιο DMD (Aoki & Wood, 2021). Το DMD είναι το μεγαλύτερο ανθρώπινο γονίδιο (~2,3 εκατομμύρια βάσεις), που περιλαμβάνει 79 κωδικοποιητικές αλληλουχίες (εξόνια) με διατηρημένα μοτίβα συναρμογής μεταξύ των σπονδυλωτών (Hanson et al., 2021). Αυτό το διατηρημένο μοτίβο συναρμογής επιτρέπει στους ερευνητές να εφαρμόσουν ό,τι μαθαίνουν από ζωικά μοντέλα στους ανθρώπους.

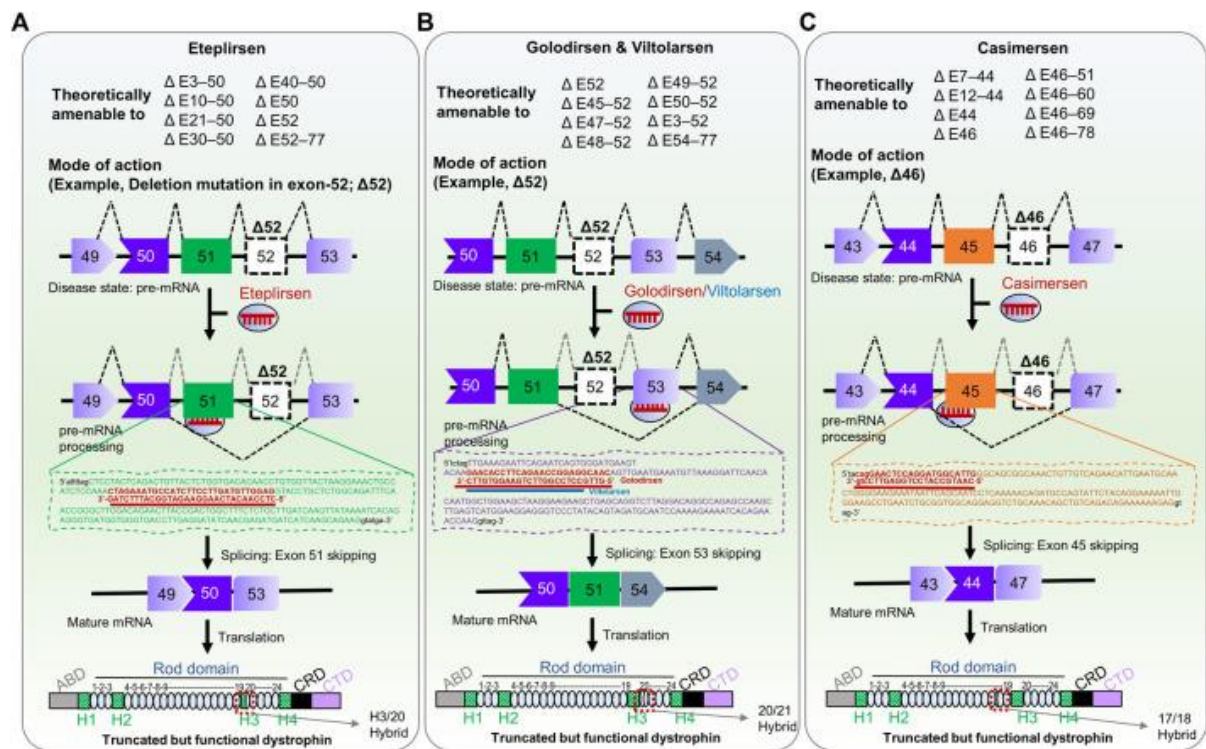
Το γονίδιο DMD κωδικοποιεί τη δυστροφίνη, μια υποσαρκολεμική πρωτεΐνη με ραβδοειδές σχήμα (427 kDa) που απαιτείται για την ακεραιότητα των μυϊκών ινών και την προστασία από τραυματισμό που προκαλείται από συστολές (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019). Απουσία δυστροφίνης, οι μυϊκές ίνες τραυματίζονται κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής, οδηγώντας σε προοδευτική μυϊκή απώλεια, επακόλουθη απώλεια της ικανότητας βάδισης και αναπνευστικές και καρδιακές βλάβες (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019). Η μοριακή βάση για την ανάπτυξη της DMD περιλαμβάνει περισσότερες από 7.000 διαφορετικές μεταλλάξεις (Bladen et al., 2015). Η πιο συχνή μετάλλαξη (60-70%) είναι η διαγραφή ενός ή περισσότερων εξονίων, που οδηγεί σε απώλεια δυστροφίνης (Olson, 2021). Άλλες, συμπεριλαμβανομένων των μη νοηματικών μεταλλάξεων, των γονιδιωματικών αναδιατάξεων και των διπλασιασμών, είναι λιγότερο συχνές (Dzierlega & Yokota, 2020). Οι διαγραφές εξονίων από το DMD συνήθως συγκεντρώνονται σε δύο συγκεκριμένα «hotspots», συμπεριλαμβανομένων των εξονίων 2–20 και 43–55 (Juan-Mateu et al., 2015). Η μυϊκή δυστροφία Becker (Becker muscular dystrophy, BMD) είναι μια λιγότερο σοβαρή εκδοχή του φαινοτύπου της νόσου, που προκύπτει από μια πρωτεΐνη, η οποία αν και κολοβωμένη, εξακολουθεί να διαθέτει τις κρίσιμες N- και C-τερματικές περιοχές δέσμησης, παρά την έλλειψη ορισμένων εσωτερικών περιοχών της ράβδου (Dowling et al., 2021). Αυτή η κολοβωμένη δυστροφίνη έχει ως αποτέλεσμα έναν λιγότερο σοβαρό φαινότυπο, με μεταγενέστερη έναρξη και βραδύτερη εξέλιξη των συμπτωμάτων από τη DMD (Dowling et al., 2021). Για το λόγο αυτό, μια από τις πιο κοινές θεραπευτικές στρατηγικές για τη DMD είναι η αποκατάσταση της δυστροφίνης που μοιάζει με BMD.

Μέχρι σήμερα, η ισχύς των εγκεκριμένων θεραπειών για τη DMD είναι πολύ περιορισμένη και επί του παρόντος δεν υπάρχει φάρμακο παρά τις εξαιρετικές ερευνητικές προσπάθειες. Τα

κορτικοστεροειδή χρησιμοποιούνται συνήθως για ασθενείς με DMD. Αυτά έχουν δυσμενείς παρενέργειες και ελάχιστη αποτελεσματικότητα (Manzur et al., 2008). Έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπευτικών RNA για την αποκατάσταση της λειτουργικής δυστροφίνης σε ασθενείς με DMD. Μεταξύ αυτών, η παράκαμψη εξονίων με χρήση συνθετικού ASO είναι επί του παρόντος η κορυφαία θεραπευτική προσέγγιση για τη DMD (Wagner et al., 2021). Το εναλλακτικό μάτισμα χρησιμοποιείται για την αποκατάσταση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (open reading frame, ORF) που έχει υποστεί ζημιά από διαγραφές εκτός πλαισίου. Άλλες στρατηγικές περιλαμβάνουν ικούς φορείς που εκφράζουν ανασυνδυασμένη δυστροφίνη (Duan, 2018), θεραπεία με βάση τα κύτταρα (Garcia et al., 2018), εκτομή εξονίου ή επιδιόρθωση μεταλλάξεων χρησιμοποιώντας CRISPR/Cas9 (Nelson et al., 2019). Επιπλέον, μια αναδυόμενη νέα προσέγγιση είναι η αποκατάσταση ενός κωδικονίου ανάγνωσης από μια μη νοηματική μετάλλαξη στο γονίδιο DMD χρησιμοποιώντας το σύστημα MCP-ADAR (Katrekar et al., 2019).

2.2.1 Eteplirsen

Το Eteplirsen αναπτύχθηκε από τη Sarepta Therapeutics, Inc. (Cambridge, MA, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής). Αν και η συμβουλευτική επιτροπή του FDA ψήφισε να μην εγκρίνει το Eteplirsen στην αρχή, ο FDA το υπερέβη διοικητικά και έδωσε ταχεία έγκριση το 2016 ως το πρώτο γενετικό φάρμακο για την DMD (FDA, 2016). Είναι ένα 30-bp, συνθετικό, μονόκλωνο, αντιπληροφοριακό ολιγονουκλεοτίδιο, τροποποιημένο με PMO με την αλληλουχία 5'-CTCCAACATCAAG GAAGATGGCATTCTAG-3' (Mendell et al., 2016). Σε αντίθεση με το DNA ή το RNA, οι βάσεις PMO συνδέονται με ένα τμήμα μορφολίνης και οι υπομονάδες συνδέονται μέσω ουδέτερα φορτισμένου φωσφοροδιαμιδικού (Kole & Krieg, 2015). Το Eteplirsen οδηγεί σε παράλειψη του εξονίου 51 στο γονίδιο DMD. Το Eteplirsen είναι ένα φάρμακο ευρέος φάσματος που καλύπτει περίπου το 20,5% των μεταλλάξεων διαγραφής σε αυτό το γονίδιο, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το ~ 13% όλων των ασθενών με DMD (Bladen et al., 2015).



Εικόνα 10: Εγκεκριμένες από τον FDA θεραπείες RNA για ασθενείς με επιβεβαιωμένες, ειδικές μεταλλάξεις DMD (Saifullah et al., 2022).

Το Eteplirsen υβριδοποιείται με τη συμπληρωματική αλληλουχία του εξονίου 51, οδηγώντας στην αποκοπή του εξονίου 51 στο ORF κατά τη διάρκεια του ματισματος του pre-mRNA, αποκαθιστώντας τελικά τη λειτουργική, αν και συντομευμένη, δυστροφίνη (Εικόνα 10Α) (Lim et al., 2017). Η αποτελεσματικότητα του Eteplirsen εξετάστηκε σε ένα ποντίκι Dmd KO που φέρει το ανθρώπινο γονίδιο DMD (Echigoia et al., 2017a). Με βάση την επιτυχή παράκαμψη του εξονίου 51 στο μοντέλο ποντικίου, αυτό το φάρμακο έχει προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές, αποκτώντας προφίλ αποτελεσματικότητας και ασφάλειας. Στη δοκιμή (NCT01396239), ασθενείς ηλικίας 7 έως 13 ετών που έλαβαν θεραπεία με 30 mg/kg/εβδομάδα αναλόγου Eteplirsen έδειξαν 23% αποκατάσταση των θετικών σε δυστροφίνη μυοϊνών με βάση το αποτέλεσμα ανοσοϊστοχημείας ($p \leq 0,002$) στις 24 εβδομάδες, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου εικονικού φαρμάκου (Mendell et al., 2013). Η ίδια ομάδα δόσεων έδειξε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα αποκατάστασης της δυστροφίνης (52%) στις 48 εβδομάδες. Δεδομένου ότι ο FDA βρήκε αμφίβολη τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας για τον προσδιορισμό της έκφρασης της δυστροφίνης, έγινε επανέλεγχος χρησιμοποιώντας Western blot από βιοψίες μυών, δείχνοντας μέση αποκατάσταση 0,44% σε σύγκριση με υγιή άτομα. Παρόμοιος βαθμός αποκατάστασης (0,22%–0,32%) παρατηρήθηκε στις 48 εβδομάδες αγωγής 30 mg/kg/εβδομάδα σε 13 ασθενείς στη μελέτη παρέμβασης NCT02255552. Ωστόσο, δεν υπήρχε

σημαντική διαφορά στο αποτέλεσμα της δοκιμής βάδισης 6 λεπτών (6-min walk test, 6 MWT). Η κοόρτη υψηλότερης δόσης (50 mg/kg/εβδομάδα) έδειξε σημαντική ικανότητα βάδισης 6 λεπτών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p \leq 0,001$).

Η NCT01396239 και άλλες κλινικές δοκιμές του Eteplirsen βρήκαν μόνο καθυστέρηση στην ανάπτυξη της νόσου παρά οποιαδήποτε ουσιαστική βελτίωση στα συμπτώματα της νόσου, με σχετικά χαμηλή αποτελεσματικότητα, με βάση τα αποτελέσματα βιοψίας μυών (Mendell et al., 2016). Μια ανησυχία ήταν ότι 2 από τους 12 ασθενείς έχασαν την ικανότητα βάδισης (Dzierlega & Yokota, 2020). Παράγοντες που πιθανώς συνδέονται με αυτό το κακό αποτέλεσμα περιλαμβάνουν α) κακώς επιλεγμένες αλληλουχίες ASO, με βάση μια βιοπληροφορική ανάλυση (Echigoia et al., 2017a), β) τη φύση ουδέτερου φορτίου του PMO, που μπορεί να μειώσει την πρόσληψη του ASO λόγω ταχείας κάθαρσης (Lim et al., 2017), γ) ένας φραγμός συνδετικού ιστού που εμπόδιζε το φάρμακο να φτάσει στα μυϊκά κύτταρα στόχους (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019), δ) δυσκολίες στη διασταύρωση μεμβρανών (Dzierlega & Yokota, 2020) και ε) ετερογένεια της ηλικίας του υποκειμένου (καθώς η ηλικία μπορεί να αλλάξει τη σοβαρότητα και την ανταπόκριση στο φάρμακο). Το 2018, ο EMA αρνήθηκε να διαθέσει στην αγορά το Eteplirsen για τη θεραπεία ασθενών με DMD λόγω έλλειψης επαρκούς αποτελεσματικότητας (Aartsma-Rus & Goemans, 2019).

2.2.1 Golodirsen

Το 2019, ο FDA χορήγησε ταχεία έγκριση για ένα άλλο γενετικό φάρμακο που ονομάζεται Golodirsen, που αναπτύχθηκε από τη Sarepta Therapeutics, Inc., για τη θεραπεία ασθενών με επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις που επιδέχονται παράλειψη του εξονίου 53 του DMD (FDA, 2019). Το Golodirsen είναι ένα συνθετικό PMO μήκους 25 bp (μικρότερο από το Eteplirsen) με την αλληλουχία 5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3' (Dzierlega & Yokota, 2020). Το Golodirsen είναι χρήσιμο για λιγότερους ασθενείς με μεταλλάξεις DMD (~8%) από το Eteplirsen (Frank et al., 2020).

Το Golodirsen δεσμεύεται στο εξόνιο 53 του pre-mRNA του DMD μέσω ζευγαρώματος βάσεων και αποκαθιστά το πλαίσιο ανάγνωσης του μεταγράφου σε ασθενείς με μεταλλάξεις DMD, παράγοντας μια περικομμένη αλλά λειτουργική δυστροφίνη (Εικόνα 4B). Σε κλινικές δοκιμές φάσης I/II (NCT02310906), οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με 30 mg/kg/εβδομάδα Golodirsen αύξησαν τις θετικές σε δυστροφίνη ίνες από 0,10 σε 1,02% (~16 φορές) σε σύγκριση με την αρχική τιμή στις 48 εβδομάδες (Frank et al., 2020). Μετά τη θεραπεία, η de novo δυστροφίνη επιβεβαιώθηκε στο σαρκόλημμα με σημαντική αύξηση 10,47% (Frank et al.,

2020). Ωστόσο, τα κλινικά οφέλη δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί σε κλινική δοκιμή φάσης III (FDA, 2019). Αυτή η μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση του κλινικού οφέλους του Golodirsen όσον αφορά τις κινητικές λειτουργίες (NCT02500381). Σε αυτήν την διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο παρέμβαση, 30 mg/kg/εβδομάδα Golodirsen θα χορηγούνται μέσω ενδοφλέβιας έγχυσης για έως και 96 εβδομάδες σε >200 συμμετέχοντες. Ο εκτιμώμενος χρόνος ολοκλήρωσης αυτής της δοκιμής είναι ο Απρίλιος του 2024.

Οι βιοψίες μυών έδειξαν 1% αποκατάσταση δυστροφίνης μετά από περίπου ένα χρόνο συστηματικής χορήγησης δόσης, η οποία είναι ανεπαρκής για να αποφέρει σημαντικά κλινικά οφέλη. Ο καλύτερος σχεδιασμός αλληλουχίας, η χημική τροποποίηση ή η χορήγηση φαρμάκου είναι απαραίτητα για να αναδειχθούν και κλινικά οφέλη.

2.2.1 Vitolarsen

Το Vitolarsen (κωδικό όνομα: NS-065/NCNP-01) είναι ένα μονόκλωνο, αντιπληροφοριακό PMO συμπληρωματικό του εξονίου 53 του DMD, που αναπτύχθηκε από κοινού από τη Nippon Shinyaku Co., Ltd. και το Εθνικό Κέντρο Νευρολογίας και Ψυχιατρικής (National Center of Neurology and Psychiatry, NCNP) του Τόκιο (Clemens et al., 2020). Το Vitolarsen είναι 4 bp (5'-GTTG-3') πιο κοντό στο 5' άκρο από το Golodirsen, με την ίδια θέση στόχου (5'-CCT CCGTTCTGAAGGTGTTC-3' (Dzierlega & Yokota, 2020). Η στόχευση του εξονίου 53 με θεραπεία παράκαμψης εξονίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ασθενείς με μεταλλάξεις διαγραφής των εξονίων 52, 45-52, 47-52, 48-52, 49-52 ή των εξονίων 50-52 (Watanabe et al., 2018). Ως εκ τούτου, το Vitolarsen θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του 10,1% όλων των ασθενών με DMD (Watanabe et al., 2018).

Όπως το Golodirsen, το Vitolarsen παρουσιάζει παρόμοιο τρόπο δράσης για την παράλειψη του εξονίου 53 (Εικόνα 4B). Οι Watanabe et al. (2018) διερεύνησαν εκτενώς τη θέση, το μήκος και την αποτελεσματικότητα των PMO που στοχεύουν το εξόνιο 53 σε κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με DMD και το Vitolarsen αποδείχθηκε ο καλύτερος υποψήφιος, με βάση την αποτελεσματικότητα αποκατάστασης δυστροφίνης (87,1%). Τώρα προχωρά σε κλινικές δοκιμές Φάσης I για ασφάλεια, ανεκτικότητα και φαρμακοκινητικό προφίλ (Komaki et al., 2018). Σε μια δοκιμή φάσης I, 1,25, 5 ή 20 mg/kg/εβδομάδα Vitolarsen χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως για 12 εβδομάδες, χωρίς σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Ωστόσο, υπήρχαν 72 ανησυχίες, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης των συγκεντρώσεων ιντερλευκίνης και N-ακετυλο-β-D-γλυκοζαμινιδάσης (N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG), πρωτεϊνουρία, λευκωματουρία και αναιμία (Komaki et al., 2018). Το Vitolarsen δεν προκάλεσε σημαντική

νεφρική τοξικότητα ή ανοσογονικότητα σε κανέναν ασθενή, υποδηλώνοντας την ασφάλεια και την ανεκτικότητα του για τους ασθενείς και η αποτελεσματικότητά του ήταν δοσοεξαρτώμενη. Οι θετικές σε δυστροφίνη ίνες ανιχνεύθηκαν σε 2/10 ασθενείς. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα που παρατηρήθηκε σε αυτή τη δοκιμή φάσης I μπορεί να οφείλεται σε χαμηλότερες δόσεις και μικρότερη διάρκεια. Παραδόξως, η παράλειψη εξονίων επιβεβαιώθηκε σε επτά στους δέκα ασθενείς, με έναν ασθενή να έχει 47,5% παράλειψη εξονίων (Komaki et al., 2018).

Σε μια παρέμβαση φάσης II στην οποία συμμετείχαν 16 αγόρια, το Viltolarsen (NCT02740972) χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε δόσεις 40 mg/kg/εβδομάδα και 80 mg/kg/εβδομάδα για έως και 24 εβδομάδες (Clemens et al., 2020). Σε σύγκριση με την αρχική τιμή, τα επίπεδα της *de novo* δυστροφίνης αυξήθηκαν κατά μέσο όρο κατά 5,7% και 5,9%, αντίστοιχα. Οι ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο παρουσίασαν σημαντική βελτίωση στη 6 MWT κατά ~29 m σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (65,3 m), όπως αναφέρθηκε από τους Clemens et al., 2020. Οι αντενδείξεις του Viltolarsen περιλάμβαναν αντίδραση στο σημείο της ένεσης, πυρετό και λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, χωρίς σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ή θανάτους. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα δυστροφίνης που προκαλούνται από το Viltolarsen είναι τα υψηλότερα που έχουν αναφερθεί σε κλινικές μελέτες θεραπειών παράκαμψης εξονίων μέχρι σήμερα (Muntoni et al., 2018). Με βάση το εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας, ανεκτικότητας και αποτελεσματικότητάς του, ο Οργανισμός Φαρμακευτικών και Ιατρικών Συσκευών (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA) της Ιαπωνίας και ο FDA χορήγησε έγκαιρη υπό όρους έγκριση τον Μάρτιο του 2020 και επιτάχυνε την έγκριση του Viltolarsen τον Αύγουστο του 2020 για ασθενείς με DMD με επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις που επιδέχονται παράλειψη του εξονίου 53 (FDA, 2020; PMDA, 2020). Ωστόσο, περαιτέρω κλινικές πρόοδοι, που προτείνονται και από τους δύο ρυθμιστικούς φορείς, πρέπει να διερευνηθούν στις δοκιμές φάσης III. Αντίστοιχα, μια δοκιμή φάσης III (NCT04768062) βρίσκεται σε εξέλιξη για το προφίλ της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του Viltolarsen σε 74 ασθενείς με DMD. Οι συμμετέχοντες θα λάβουν 80 mg/kg/εβδομάδα Viltolarsen ενδοφλεβίως για έως και 96 εβδομάδες. Η αναμενόμενη ημερομηνία ολοκλήρωσης είναι τον Ιούνιο του 2026.

2.2.1 Casimersen

Ο FDA χορήγησε τον Φεβρουάριο του 2021 ταχεία έγκριση για τη θεραπεία της DMD και για ένα άλλο θεραπευτικό φάρμακο RNA που ονομάζεται Casimersen (Amondys 45) για ασθενείς που φέρουν επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις που επιδέχονται παράλειψη εξονίου 45 (Εικόνα 4C) (FDA, 2021). Η βασική ακολουθία του Casimersen είναι 5'- CAATGCCATCCTGGAGTT

CCTG-3'. Το Casimersen θα καλύπτει το 8% όλων των ασθενών με DMD (Aartsma-Rus et al., 2009). Στη διπλά τυφλή παρέμβαση τιτλοποίησης δόσης φάσης I/II, χορηγήθηκαν ενδοφλέβια 30 mg/kg Casimersen σε συμμετέχοντες ηλικίας 7-20 ετών. Το φάρμακο έδειξε μια αξιοσημείωτη αποκατάσταση του επιπέδου δυστροφίνης σε σύγκριση με τους ελέγχους που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιελάμβαναν λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού, πυρετό, βήχα, πόνο στο λαιμό, πόνο στις αρθρώσεις και κεφαλαλγία (FDA, 2021). Επί του παρόντος βρίσκεται σε εξέλιξη μια ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο παρέμβαση φάσης III με τον ίδιο αριθμό κλινικής δοκιμής με το Golodirsen (NCT02500381). Αυτή η μελέτη θα συγκεντρώσει περαιτέρω στοιχεία σχετικά με τα κλινικά οφέλη, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα, ειδικά για περιπατητικούς ασθενείς.

2.3 Οικογενής υπερχοληστερολαιμία

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (familial hypercholesterolemia, FH) είναι μια από τις πιο κοινές γενετικές ασθένειες στον κόσμο, με τεκμηριωμένη επικράτηση της ετερόζυγης FH (HeFH) και της ομόζυγης FH (HoFH), στον πληθυσμό, περίπου 1/311 και 1/160.000-300.000, αντίστοιχα (Hu et al., 2020). Η FH χαρακτηρίζεται από σημαντικά αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεϊνικής χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C), τενοντιακά ξανθώματα και πρόωρη στεφανιαία νόσο (premature coronary heart disease, PCHD). Υπάρχουν τρία κύρια αιτιολογικά γονίδια για την FH: υποδοχέας λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein receptor, LDLR: που ευθύνεται για το 80-85% των παραγόντων που οδηγούν σε διαταραχές του μεταβολισμού της LDL), απολιποπρωτεΐνη B100 (apolipoprotein B100, apoB100, 5-10%) και προπρωτεϊνική κονβερτάση σουμπτιλίσιν/κεξίνη τύπου 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9, 2%) (Nordestgaard et al., 2013). Η FH επηρεάζει δεκάδες εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο και επιφέρει βαρύ οικονομικό βάρος στις οικογένειες και την κοινωνία. Είναι ενδιαφέρον ότι η αντίληψη αυτής της ασθένειας ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό σε διάφορες περιοχές του κόσμου, και υπάρχουν ακόμη πολλοί ασθενείς σε ορισμένες περιοχές που δεν έχουν διαγνωστεί και δεν αντιμετωπίζονται σωστά (Jiang et al., 2018).

Η τρέχουσα βάση θεραπείας για την FH είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα PCSK9 ή η στατίνη, μόνη της ή σε συνδυασμό με εξετιμίμπη. Μια μελέτη ανέφερε ότι η συνδυαστική θεραπεία με Mipomersen οδήγησε σε επιπλέον μείωση κατά 25% της LDL-C σε ασθενείς με HoFH (Raal et al., 2010). Ένα άλλο νέο φάρμακο, το Lomitapide, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα της LDL-C κατά 50% σε ασθενείς με HoFH. Ωστόσο, οι γαστρεντερικές παρενέργειες και η

πιθανή ηπατική βλάβη περιορίζουν την κλινική χρήση του (Cuchel et al., 2013). Η αφαίρεση λιποπρωτεϊνών μπορεί να μειώσει την LDL-C κατά περισσότερο από 65% σε ασθενείς. Ωστόσο, οι πιθανές παρενέργειες και το ακριβό κόστος το καθιστούν συχνά μη προσιτό για τους περισσότερους ασθενείς (Gidding et al., 2015). Η μεταμόσχευση ήπατος είναι επί του παρόντος ο μόνος τρόπος για τη γρήγορη διαχείριση των επιπέδων LDL-C των ασθενών με HoFH ώστε να φτάσουν σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα, αλλά δεν είναι μια θεραπεία ρουτίνας, λόγω των σημαντικών ανοσολογικών προκλήσεων της μεταμόσχευσης οργάνων και της ακραίας έλλειψης δότη (Moyle & Tate, 2004). Συνολικά, οι τρέχουσες θεραπείες έχουν περιορισμένα θεραπευτικά αποτελέσματα έναντι της σοβαρής FH, ιδιαίτερα των HoFH και HeFH, με επιβλαβείς μεταλλάξεις του LDLR.

2.3.1 Mipomersen

Το Mipomersen (Kynamro) είναι ένα 20-νουκλεοτιδικό ASO δεύτερης γενιάς που συνδέεται με το mRNA ApoB100 στο ήπαρ και δημιουργεί ένα υπόστρωμα για ενδοηπατικές ενδονουκλεάσες. Στη συνέχεια, τα μετάγραφα του ApoB100 αποικοδομούνται, μειώνοντας έτσι τις συγκεντρώσεις της LDL-C στο πλάσμα (Rader & Kastelein, 2014). Το ApoB100 είναι μία από τις δύο ισομορφές που προκύπτουν από το RNA μετάγραφο του ανθρώπινου γονιδίου *ApoB*, το οποίο έχει μεγάλη σημασία στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Και, το ApoB100 είναι ένα ζωτικής σημασίας δομικό συστατικό της λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low-density lipoprotein, VLDL) και της LDL, οι οποίες συντίθενται από το ανθρώπινο ήπαρ. Στην πρώιμη φάση της αθηροσκλήρωσης, τα δυσλειτουργικά αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα επιτρέπουν στην LDL να εισέλθει στην ενδοθηλιακή στιβάδα και στη συνέχεια να προσκολληθεί στις πρωτεογλυκάνες του εσωτερικού χιτώνα μέσω της ApoB, όπου συσσωρεύεται σταδιακά στην εσωτερική στιβάδα (Borén et al., 1998). Η γενετική βάση της υποβηταλιποπρωτεϊναιμίας της οικογενούς non-ApoB (family hypobetalipoproteinemia, FHBL) υποδηλώνει την πιθανότητα της ApoB να αποτελεί έναν καλό στόχο για θεραπεία μείωσης των λιπιδίων (Schonfeld et al., 2005). Η FHBL είναι μια αυτοσωματική επικρατούσα νόσος που χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα LDL-C και ApoB, τα οποία μπορεί να οφείλονται στη μετάλλαξη του *ApoB* (Schonfeld et al., 2005).

Το Mipomersen περιλαμβάνει 10 τροποποιήσεις 2'-O-μεθοξυαιθυλίου και υπάρχουν πέντε τροποποιήσεις σε κάθε άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου που αυξάνουν τη συγγένεια της δέσμευσης του στόχου, παρατείνουν τον χρόνο ημιζωής στο όργανο στόχο και αντιστέκονται στην αποικοδόμηση από τις νουκλεάσες (Altmann et al., 1996). Στο κέντρο, τα φωσφοροθειοικά νουκλεοτίδια προάγουν τη διάσπαση με τη μεσολάβηση της RNase H (Bell et al., 2011). Οι συγκεντρώσεις του Mipomersen στο πλάσμα κορυφώνονται εντός 4 ωρών

μετά τη χορήγηση. Το Mirumersen μεταβολίζεται στους ιστούς ως μεταβολίτης βραχείας αλύσου, ο οποίος αρχικά πέπτεται από ενδονουκλεάσες και παράγει ολιγονουκλεοτίδια που δεν έχουν περαιτέρω φαρμακολογικές επιδράσεις. Τα μικρότερα ολιγονουκλεοτίδια πέπτονται περαιτέρω από τις εξωνουκλεάσες και απεκκρίνονται κυρίως στα ούρα (Yu et al., 2007). Μελέτες έχουν δείξει ότι σε υγιείς ενήλικες, το Mirumersen θα μπορούσε να αυξήσει τον κλασματικό καταβολικό ρυθμό της ApoB τόσο σε VLDL όσο και σε LDL, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoB (Reyes-Soffer et al., 2016). Μελέτες φάσης I και II έδειξαν ότι το Mirumersen προκάλεσε δοσοεξαρτώμενες μειώσεις σε όλες τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν ApoB. Σε δοκιμές φάσης III, το Mirumersen ήταν αποτελεσματικό σε ασθενείς με HoFH και σε ασθενείς με HeFH (Li et al., 2014). Σε μια πρωτογενή μελέτη φάσης III, ασθενείς ηλικίας άνω των 12 ετών που είχαν κλινικά διαγνωστεί ή είναι γενετικά επιβεβαιωμένο ότι έχουν HoFH έλαβαν τη μέγιστη ανεκτή δόση ενός φαρμάκου μείωσης των λιπιδίων και έλαβαν Mirumersen 200 mg ή εικονικό φάρμακο εβδομαδιαίως (Parham & Goldberg, 2019). Παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της LDL-C σε ποσοστό περίπου 25% σε όλους τους συμμετέχοντες μετά από 6μηνη χορήγηση (Raal et al., 2010). Σε τυχαιοποιημένες δοκιμές και στην ανοιχτή φάση επέκτασης, η μακροχρόνια θεραπεία με Mirumersen της FH μείωσε τα επίπεδα των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών και οδήγησε σε μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων (Duell et al., 2016).

Ωστόσο, το Mirumersen είναι εγκεκριμένο μόνο για την HoFH και η ανταπόκριση ποικίλλει ευρέως μεταξύ των ασθενών. Η απώλεια της ApoB σχετίζεται επίσης με ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η ηπατική στεάτωση, πιθανώς επειδή στοχεύονται όλες οι λιποπρωτεΐνες που περιέχουν ApoB και μπορεί να μην υπάρχει μηχανισμός με τον οποίο το ήπαρ καθαρίζει το υπερβολικό λίπος. Η χρήση του Mirumersen περιπλέκεται από τις παρενέργειές του. Για παράδειγμα, η ηπατοτοξικότητα, οι παρενέργειες που σχετίζονται με την ένεση, το ηπατικό λίπος και το υψηλό κόστος του φαρμάκου είναι επίσης περιοριστικοί παράγοντες (Santos et al., 2015).

2.3.2 Inclisiran

Μέχρι και σήμερα η χορήγηση στατινών, αποτελεί τον κύριο τρόπο αντιμετώπισης της υπερχοληστερολαιμίας (Jing Pang et al., 2020). Η εξέλιξη των RNA θεραπειών τα τελευταία χρόνια οδήγησε στο σχεδιασμό ενός νέου φαρμάκου, του Inclisiran, το οποίο έχει εγκριθεί ήδη από το 2021 από τον FDA. Το Inclisiran, ένα χημικά τροποποιημένο μικρό μόρια RNA παρεμβολής, μεταφέρεται στα κύτταρα μέσω της GalNac και έχει ως στόχο την PCSK9. Καθώς προσδένεται ειδικά στο πρόδρομο mRNA της PCSK9, το οποίο και αποδομείται, οδηγεί σε

μείωση της έκφραση της πρωτεΐνης (Iveta Mercier et al., 2022). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα, έδειξαν επίτευξη μείωσης τόσο του mRNA της PCSK9 όσο και της ίδιας της πρωτεΐνης μέχρι και 70%. Επιπροσθέτως παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της LDL κατά 60%. Σε αντιδιαστολή με τις στατίνες, οι οποίες πρέπει να χορηγούνται ημερησίως, φαίνεται πως η χορήγηση Inclisiran δύο φορές το χρόνο είναι αρκετή για τη διατήρηση της LDL των ασθενών σε φυσιολογικά επίπεδα (Oluwakemi Ebenezer et al., 2023).

2.4 Κληρονομική αμυλοείδωση από τρανσθυρετίνη

Η ΑΤΤΡ προκαλείται από κακή αναδίπλωση της πρωτεΐνης τρανσθυρετίνης (transthyretin, TTR). Η TTR είναι ένα τετραμερές που συντίθεται φυσικά από το ήπαρ και μια πρωτεΐνη φυσιολογικής μεταφοράς για τη θυροξίνη και τη ρετινόλη. Η ασθένεια εμφανίζεται όταν η TTR αναδιπλώνεται λανθασμένα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ινίδια αμυλοειδούς (Fontana et al., 2019). Ο *in vitro* σχηματισμός των ινιδίων ΑΤΤΡ συμβαίνει όταν η τετραμερής μορφή της TTR γίνεται ασταθής και διασπάται σε μονομερή ή διασπάται ενζυματικά. Η αστάθεια της TTR φαίνεται να προάγεται από οξειδωτικές τροποποιήσεις, απορύθμιση ομοιοστατικών μηχανισμών σχετιζόμενη με την ηλικία, μεταλλικά κατιόντα και κληρονομικές/γενετικές μεταλλάξεις (Porcari et al., 2023).

Η αμυλοείδωση ΑΤΤΡ μπορεί να είναι είτε άγριου τύπου ΑΤΤΡ (wild type ΑΤΤΡ, ΑΤΤΡwt), που εμφανίζεται δευτερογενώς σε μια επίκτητη παθολογία διαδικασία που σχετίζεται με τη γήρανση, είτε κληρονομική αμυλοείδωση ΑΤΤΡ (hereditary ΑΤΤΡ, hΑΤΤΡ), η οποία εμφανίζεται δευτερογενώς σε μια κληρονομική μετάλλαξη του γονιδίου TTR. Η hΑΤΤΡ τυπικά εμφανίζεται σε μικρότερη ηλικία με μεικτό φαινότυπο που περιλαμβάνει ΑΤΤΡ-PN και/ή περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια. Κάθε παθολόγος παραλλαγή TTR προκαλείται από μια αλλαγή μεμονωμένου νουκλεοτιδίου με αποτέλεσμα μια εσφαλμένη μετάλλαξη που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο με μεταβλητή διεισδυτικότητα της νόσου. Πάνω από 130 παθολόγες παραλλαγές TTR έχουν εντοπιστεί, αλλά ένας μικρός αριθμός αυτών είναι υπεύθυνος για την πλειονότητα των περιπτώσεων (Coelho et al., 2013). Αν και υπάρχει σημαντική επικάλυψη, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παραλλαγής TTR, του κλινικού φαινοτύπου και της πρόγνωσης. Ωστόσο, υπάρχει φαινοτυπική ποικιλομορφία, όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών παραλλαγών TTR αλλά και εντός των παραλλαγών (Rowczenio et al., 2014).

Η εναπόθεση ΑΤΤΡ στο μυοκάρδιο οδηγεί σε περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια, που χαρακτηρίζεται από πάχυνση του αμφικοιλιακού τοιχώματος, σκλήρυνση του μυοκαρδίου και

ανάπτυξη συστολικής και διαστολικής δυσλειτουργίας (Ioannou et al., 2023). Οι εξωκαρδιακές θέσεις διήθησης αμυλοειδούς σχετίζονται με το σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα, τη στένωση της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης και τις τενοντοπάθειες (Geller et al., 2017). Αν και η ATTR-PN προκαλεί σοβαρά συμπτώματα αναπηρίας, η καρδιακή συμμετοχή είναι ο κύριος μοχλός θνησιμότητας (Arruda-Olson et al., 2013).

Η έγκαιρη διάγνωση και έναρξη θεραπείας τροποποίησης της νόσου είναι υψίστης σημασίας και σχετίζεται με μειωμένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Πριν από την ανάπτυξη ειδικών θεραπειών τροποποίησης της νόσου, είχε επιτευχθεί επιτυχής θεραπεία μέσω μεταμόσχευσης ήπατος, η οποία καταστέλλει την παραγωγή της μεταλλαγμένης TTR και σταματά την εναπόθεση ινιδίων ATTR στα νεύρα. Τα επιτυχή αποτελέσματα μετά τη μεταμόσχευση ήπατος υποστήριξαν την υπόθεση ότι η μείωση ή η διακοπή της παραγωγής TTR θα μπορούσε να αποτρέψει την εξέλιξη της νόσου (Porcari et al., 2022). Την τελευταία δεκαετία σημειώθηκαν πολλαπλές πρόοδοι στη θεραπεία της ATTR, με τις θεραπείες RNA να αποτελούν σημαντικό κομμάτι αυτών.

2.4.1 Inotersen

Το Inotersen είναι ένα 2'-Ο-μεθοξυαιθυλο-τροποποιημένο ASO που δεσμεύεται στο 3' αμετάφραστο τμήμα του συμπληρωματικού mRNA, προάγοντας την αποικοδόμηση του mRNA που προκαλείται από τη ριβονουκλεάση H1. Το Inotersen ήταν το πρώτο ASO που αναπτύχθηκε για την ATTR και εγκρίθηκε από τον FDA και τον EMA το 2018 για τη θεραπεία της hATTR-PN (Keam, 2018). Σε μια τυχαίοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη φάσης I σε 65 υγιείς εθελοντές, το Inotersen χορηγήθηκε σε διάφορες δόσεις σε περίοδο 4 εβδομάδων. Το Inotersen μείωσε τα επίπεδα TTR με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, με τη δόση των 300 mg να επιτυγχάνει μέγιστο knockdown της TTR κατά 96%. Το Inotersen έχει μακροχρόνια δράση, με τους συμμετέχοντες στη δοκιμή να παρουσιάζουν μέση μείωση της TTR κατά 30% 10 εβδομάδες μετά τη λήψη της τελευταίας τους δόσης (Ackermann et al., 2016).

Η δοκιμή NEURO-TTR ήταν μια φάση III, τυχαίοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διπλή-τυφλή μελέτη 225 ασθενών που αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της ινοτερσένης στο hATTR-PN. Η μελέτη πέτυχε τα κύρια καταληκτικά της σημεία με τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία να επιτυγχάνουν σημαντική μείωση από την αρχική τιμή στις βαθμολογίες modified Neuropathy Impairment Score +7 (mNIS+7) και Norfolk Quality of Life Questionnaire-Diabetic Neuropathy (Norfolk QOL-DN) σε σύγκριση με ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Μια σταθερή κατάσταση της κυκλοφορούσας συγκέντρωσης TTR

επιτεύχθηκε στις 13 εβδομάδες, οπότε η μέση μείωση της TTR από την αρχική τιμή ήταν 84% (Benson et al., 2018).

Συνολικά 109 ασθενείς που ολοκλήρωσαν τη δοκιμή NEURO-TTR συμμετείχαν σε μια ανοιχτή μελέτη επέκτασης, με σκοπό την αξιολόγηση της μακροπρόθεσμης αποτελεσματικότητας και ασφάλειας του Inotersen για 3 χρόνια. Η ομάδα που συνέχισε το Inotersen (n = 70) έδειξε σταθερό όφελος, όπως μετρήθηκε με τις κλίμακας mNIS+7, Norfolk QOL-DN και 36-Item Short-Form Health Survey (ερωτηματολόγιο αξιολόγησης της ποιότητας ζωής), σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο- ομάδα ινοτέρσεν (n = 39) (Brannagan et al., 2022).

Στη μελέτη NEURO-TTR εντάχθηκαν και 108 ασθενείς με καρδιακή αμυλοείδωση. Η θεραπεία με Inotersen δεν οδήγησε σε καμία σημαντική αλλαγή στις ηχοκαρδιογραφικές παραμέτρους (Benson et al., 2018). Μια μικρή μελέτη ασθενών με ATTR με καρδιομυοπάθεια (ATTR-cardiomyopathy, ATTR-CM) (n = 30) έδειξε ότι 12 μήνες θεραπείας με Inotersen σταθεροποίησε την καρδιακή νόσο με βάσει τις αξιολογήσεις με 6 MWT, ολική επιμήκη παραμόρφωση (global longitudinal strain, GLS) και το πάχος τοιχώματος και τη μάζα αριστερής κοιλίας (left ventricular, LV) που μετρήθηκε με καρδιαγγειακό μαγνητικό συντονισμό (cardiovascular magnetic resonance, CMR) (Benson et al., 2017). Μια άλλη μικρή μελέτη ασθενών με ATTR-CM (n = 33) έδειξε ότι το Inotersen είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη μάζα LV και βελτίωση στο 6 MWT τόσο στα 2 όσο και στα 3 έτη (Dasgupta et al., 2020).

Στη δοκιμή NEURO-TTR η πλειονότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν ήπιες/μέτριες και περιελάμβαναν ναυτία, πυρετό, πονοκέφαλο, αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης και θρομβοπενία, η οποία εμφανίστηκε σε τουλάχιστον 20% των ασθενών που έλαβαν Inotersen. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν η πιο κοινή αιτία διακοπής και οδήγησαν σε απόσυρση του 14% των ασθενών στην ομάδα του Inotersen. Υπήρχαν πέντε θάνατοι στη μελέτη (όλοι στην ομάδα Inotersen), τέσσερις από τους οποίους αποδίδονταν στην εξέλιξη της νόσου. Ένας ασθενής εμφάνισε θανατηφόρα ενδοκρανιακή αιμορραγία. Η θρομβοπενία που προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα που προκαλείται από Inotersen πιστεύεται ότι είναι ο πιο πιθανός μηχανισμός για αυτό το φαινόμενο (Benson et al., 2018). Η σπειραματονεφρίτιδα εμφανίστηκε σε τρεις ασθενείς που έλαβαν Inotersen, και όλοι έφεραν την παραλλαγή TTR p.(Val50Met). Όλοι οι ασθενείς στη δοκιμή NEURO-TTR έλαβαν συμπληρώματα βιταμίνης A και παρόλο που δεν αναφέρθηκαν κλινικές εκδηλώσεις ανεπάρκειας βιταμίνης A, η λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης A εξακολουθεί να απαιτείται (Keam, 2018).

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην ανοιχτή επέκταση, με το 22% να διακόπτει τη θεραπεία μετά ανεπιθύμητες ενέργειες, αν και μόνο το 4% θεωρήθηκε ότι σχετίζεται με τη

λήψη Inotersen. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιελάμβαναν θρομβοπενία, ρίγη, υπέρταση και μια τρανσαμινίτιδα που υποχώρησαν με τη διακοπή της θεραπείας. Δεν αναφέρθηκαν περιπτώσεις σπειραματονεφρίτιδας στην ανοιχτή μελέτη επέκτασης. Καταγράφηκαν 16 θάνατοι, κανένας από τους οποίους δεν αποδόθηκε στο Inotersen (Brannagan et al., 2022).

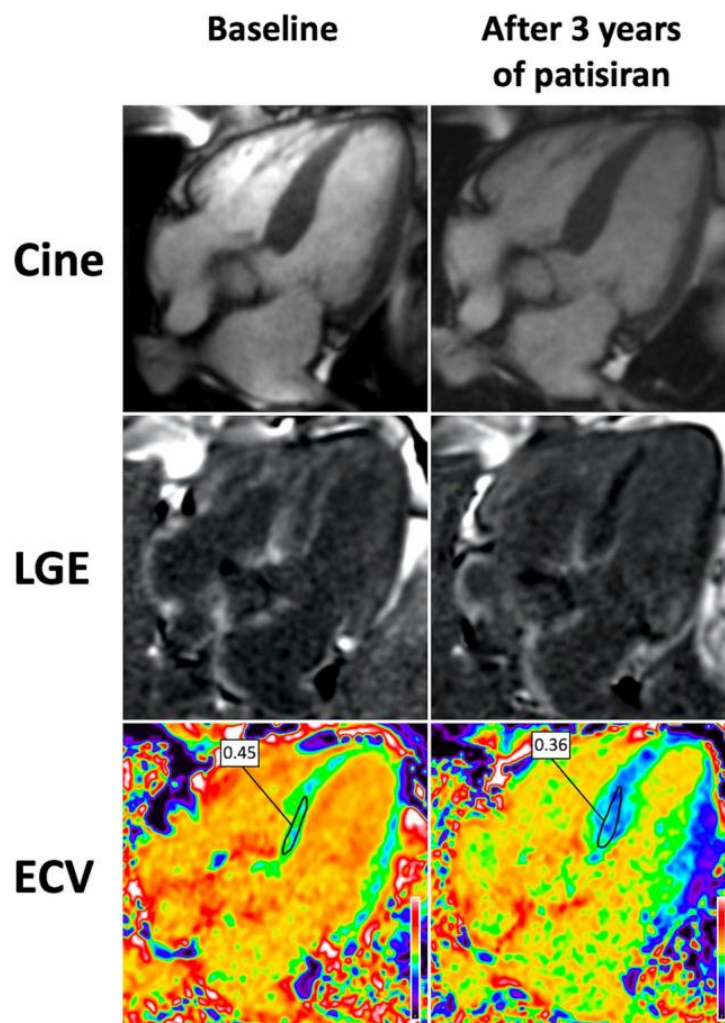
2.4.2 Patisiran

Το Patisiran ήταν το πρώτο siRNA που αναπτύχθηκε για την ΑΤΤΡ και εγκρίθηκε από τον FDA και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission, EC) το 2018 για τη θεραπεία της hΑΤΤΡ-PN. Το Patisiran διαμορφώνεται σε ένα λιπιδικό νανοσωματίδιο για να εξασφαλίσει την παράδοση στο ηπατοκύτταρο. Μόλις απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα του ηπατοκυττάρου, το δίκλωνο siRNA διασπάται σε μονόκλιωνα RNA που δεσμεύουν συμπληρωματικό mRNA. Η δέσμευση πυροδοτεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης τεμαχιστή Argonaute, η οποία αποικοδομεί το mRNA, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση TTR (Urits et al., 2020). Σε μια μελέτη φάσης I του Patisiran, εφάπαξ χορήγηση 0,3 mg/kg πέτυχε μέγιστη μείωση της συγκέντρωσης TTR στον ορό κατά 87,6% (Coelho et al., 2013). Η ήπια/μέτρια νεφρική ανεπάρκεια ή η ήπια ηπατική δυσλειτουργία φάνηκε να μην έχει καμία επίδραση στη φαρμακοκινητική ή στη μείωση της TTR (Urits et al., 2020) και έκτοτε το Patisiran είναι καλά ανεκτή θεραπεία σε ασθενείς με hΑΤΤΡ-PN που υποβλήθηκαν προηγουμένως σε μεταμόσχευση ήπατος (Schmidt et al., 2022).

Η δοκιμή φάσης 3 APOLLO ήταν μια τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διπλή-τυφλή μελέτη διάρκειας 18 μηνών με 225 ασθενείς, η οποία αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του Patisiran στην hΑΤΤΡ-PN. Η μελέτη πέτυχε το πρωτεύον καταληκτικό της σημείο, το οποίο ήταν μια βελτίωση από την έναρξη του τροποποιημένου mNIS+7 στην ομάδα θεραπείας σε σύγκριση με την ομάδα εικονικού φαρμάκου, και πέτυχε πολλαπλά δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία, συμπεριλαμβανομένης μιας βελτίωσης μεταξύ των ασθενών που έλαβαν θεραπεία σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο στη βαθμολογία Norfolk QOL-DN και την ταχύτητα βάδισης (Adams et al., 2018). Υπήρξε επίσης σημαντικό όφελος μεταξύ των ασθενών που έλαβαν Patisiran σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο σε όλα τα κύρια συστατικά της κλίμακας COMPASS-31, η οποία αξιολογεί την αυτόνομη νευροπάθεια (González-Duarte et al., 2020).

Μια υπομελέτη 126 ασθενών από τη δοκιμή APOLLO που κρίθηκε ότι είχαν καρδιακή αμυλοείδωση με βάση προκαθορισμένα κριτήρια πάχους τοιχώματος LV ≥ 13 mm απουσία νόσου της αορτικής βαλβίδας ή υπέρτασης, αναλύθηκε για να εκτιμηθεί ο αντίκτυπος της

θεραπείας Patisiran στην ATTR-CM. Οι ασθενείς που έλαβαν Patisiran είχαν μειωμένη πάχυνση του τοιχώματος της LV, αυξημένο τελοδιαστολικό όγκο της LV και πιο ευνοϊκή αλλαγή στην GLS κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης σε σύγκριση με εκείνους που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Η ομάδα που έλαβε θεραπεία είχε επίσης σημαντική μείωση στο N-τερματικό pro B-τύπου νατριουρητικό πεπτίδιο (N-terminal pro B-type natriuretic peptide, NT-proBNP) και αύξηση στην ταχύτητα βάδισης στη δοκιμής βάδισης 10 μέτρων σε σύγκριση με την ομάδα εικονικού φαρμάκου (Solomon et al., 2019).



Εικόνα 11: Καρδιακή μαγνητική τομογραφία που δείχνει καρδιακή παλινδρόμηση μετά από 3 χρόνια θεραπείας με Patisiran . Μετά από 3 χρόνια θεραπείας, υπήρξε μείωση της ποσότητας της υποενδοκαρδιακής όψιμης ενίσχυσης του γαδολινίου και μείωση του εξωκυτταρικού όγκου. Cine: ακολουθία απεικόνισης που αποκτήθηκε για την καταγραφή της κίνησης, ECV: εξωκυτταρικός όγκος, LGE: ενίσχυση όψιμου γαδολινίου (Ioannou et al., 2023b).

Αυτά τα ευρήματα υποστηρίχθηκαν από μια μικρή μελέτη 16 ασθενών που έλαβαν θεραπεία με Patisiran και diflunisal, η οποία κατέδειξε μείωση του εξωκυτταρικού όγκου που

υπολογίζεται από CMR (Εικόνα 11), TTR ορού και NT-proBNP και βελτίωση στη 6MWT μετά από 12 μήνες θεραπείας. Το σειριακό σπινθηρογράφημα οστών έδειξε μείωση της καρδιακής πρόσληψης μετά από θεραπεία (Εικόνα 12). Αν και η μειωμένη καρδιακή πρόσληψη έδειξε αναμφισβήτητα μια ευνοϊκή βιολογική επίδραση του Patisiran, η δυναμική και η κινητική της δέσμευσης του ραδιοϊχνηλάτη στα οστά, τους μαλακούς ιστούς και το μυοκάρδιο διαφέρουν και μια αλλαγή σε οποιοδήποτε από αυτά τα διαμερίσματα θα επηρεάσει την εμφάνιση και τον υπολογισμό της αναλογικής καρδιακής πρόσληψης. Η μειωμένη καρδιακή πρόσληψη στο σπινθηρογράφημα οστών θα πρέπει να υποστηρίζεται από βελτιώσεις σε άλλους τρόπους καρδιακής απεικόνισης, καρδιακούς βιοδείκτες ή/και λειτουργικά μέτρα προτού αποδοθούν αποκλειστικά σε μείωση της επιβάρυνσης της καρδιακής αμυλοείδωσης (Fontana et al., 2021).



Εικόνα 12: Scintigraphy planar and single-photon emission computed tomography (SPECT) οστών που καταδεικνύουν μειωμένη πρόσληψη καρδιακών ραδιοϊχνηλατών μετά από 3 χρόνια θεραπείας με Patisiran (Ioannou et al., 2023b).

Η δοκιμή APOLLO-B (NCT03997383) είναι μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή φάσης III που σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα του Patisiran στη θεραπεία της ATTR-CM. Σε αυτή τη δοκιμή συμμετείχαν ασθενείς με ATTRwt-CM ή hATTR-CM, ενδείξεις καρδιακής ανεπάρκειας και NT-proBNP ορού μεταξύ 300 και 8500 ng/L που παρακολουθήθηκαν για 12 μήνες. Το APOLLO-B πέτυχε το κύριο καταληκτικό του σημείο με βελτίωση του 6MWT μεταξύ των ασθενών που έλαβαν θεραπεία σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο για 12 μήνες. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί, και ως εκ τούτου απαιτούνται περισσότερες λεπτομέρειες πριν εξαχθούν επίσημα συμπεράσματα.

Το Patisiran χορηγείται παράλληλα με προφαρμακευτική αγωγή με δεξαμεθαζόνη, παρακεταμόλη, ρανιτιδίνη και ένα αντιισταμινικό για τη μείωση του κινδύνου αντιδράσεων

που σχετίζονται με την έγχυση. Στη δοκιμή φάσης I με το Patisiran , υπήρξαν ήπιες/μέτριες αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση στο 21% των ατόμων, με τις ήπιες αντιδράσεις να υποχωρούν αυθόρμητα και τις μέτριες αντιδράσεις να υποχωρούν με προσωρινή διακοπή της χορήγησης και στη συνέχεια συνέχιση της έγχυσης με βραδύτερο ρυθμό (Coelho et al., 2013). Το Patisiran προκάλεσε αποτελεσματικά την πτώση της TTR και η συνεχιζόμενη χρήση για > 18 μήνες συσχετίστηκε με μείωση της βιταμίνης A κατά 62%, αντικατοπτρίζοντας τη λειτουργία της TTR ως φορέα πρωτεΐνης που δεσμεύει τη ρετινόλη που μεταφέρει τη βιταμίνη A. Ως εκ τούτου, όλοι οι ασθενείς που λαμβάνουν Patisiran συνταγογραφούνται τακτικά συμπλήρωμα βιταμίνης A (2500 IU την ημέρα) (Urits et al., 2020). Στη δοκιμή φάσης III APOLLO δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά ανεπιθύμητων ενεργειών μεταξύ των ασθενών που έλαβαν Patisiran και εικονικό φάρμακο. Συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίστηκαν πιο συχνά στην ομάδα του Patisiran ήταν το περιφερικό οίδημα και οι αντιδράσεις που σχετίζονται με την έγχυση, οι οποίες εκδηλώθηκαν ως πόνος στην πλάτη, έξαψη, κοιλιακό άλγος και/ή ναυτία. Η συχνότητα εμφάνισης σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν χαμηλή. Υπήρχαν επτά θάνατοι στην ομάδα Patisiran , όλοι θεωρήθηκαν ότι συνάδουν με τη φυσική πορεία της hATTR και δεν σχετίζονται με το Patisiran (Adams et al., 2018).

2.4.3 Vutrisiran

Το Vutrisiran είναι ένα άλλο siRNA που χρησιμοποιεί με σύστημα μεταφοράς στα κύτταρα μέσω GalNAc. Σε μια μελέτη φάσης I με υγιείς εθελοντές, το Vutrisiran απορροφήθηκε ταχέως με τις μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα να επιτυγχάνονται σε 3–5 ώρες. Το Vutrisiran πέτυχε δόσοεξαρτώμενο knockdown της TTR. Μια εφάπαξ υποδόρια δόση 25 mg οδήγησε σε μέγιστη μείωση της TTR κατά 80%, η οποία διατηρήθηκε για 90 ημέρες (Habtemariam et al., 2021).

Η δοκιμή HELIOS-A ήταν μια ανοιχτή, πολυκεντρική μελέτη που τυχαιοποίησε 164 ασθενείς hATTR-PN σε Vutrisiran ή Patisiran και συνέκρινε τα αποτελέσματα με μια εξωτερική ομάδα εικονικού φαρμάκου από τη δοκιμή APOLLO. Στους 18 μήνες παρακολούθησης, η θεραπεία με Vutrisiran οδήγησε σε βελτίωση των βαθμολογιών mNIS+7 και Norfolk QOL-DN σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. Το knockdown TTR με το Vutrisiran σημειώθηκε εντός 3 εβδομάδων και διατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου μελέτης των 18 μηνών. Το Vutrisiran παρήγαγε μια μέση κορύφωση TTR knockdown 88%, μέση κατώτερη πτώση TTR 81% και δεν ήταν κατώτερη από το Patisiran (Adams et al., 2022). Τα ευρήματα από το

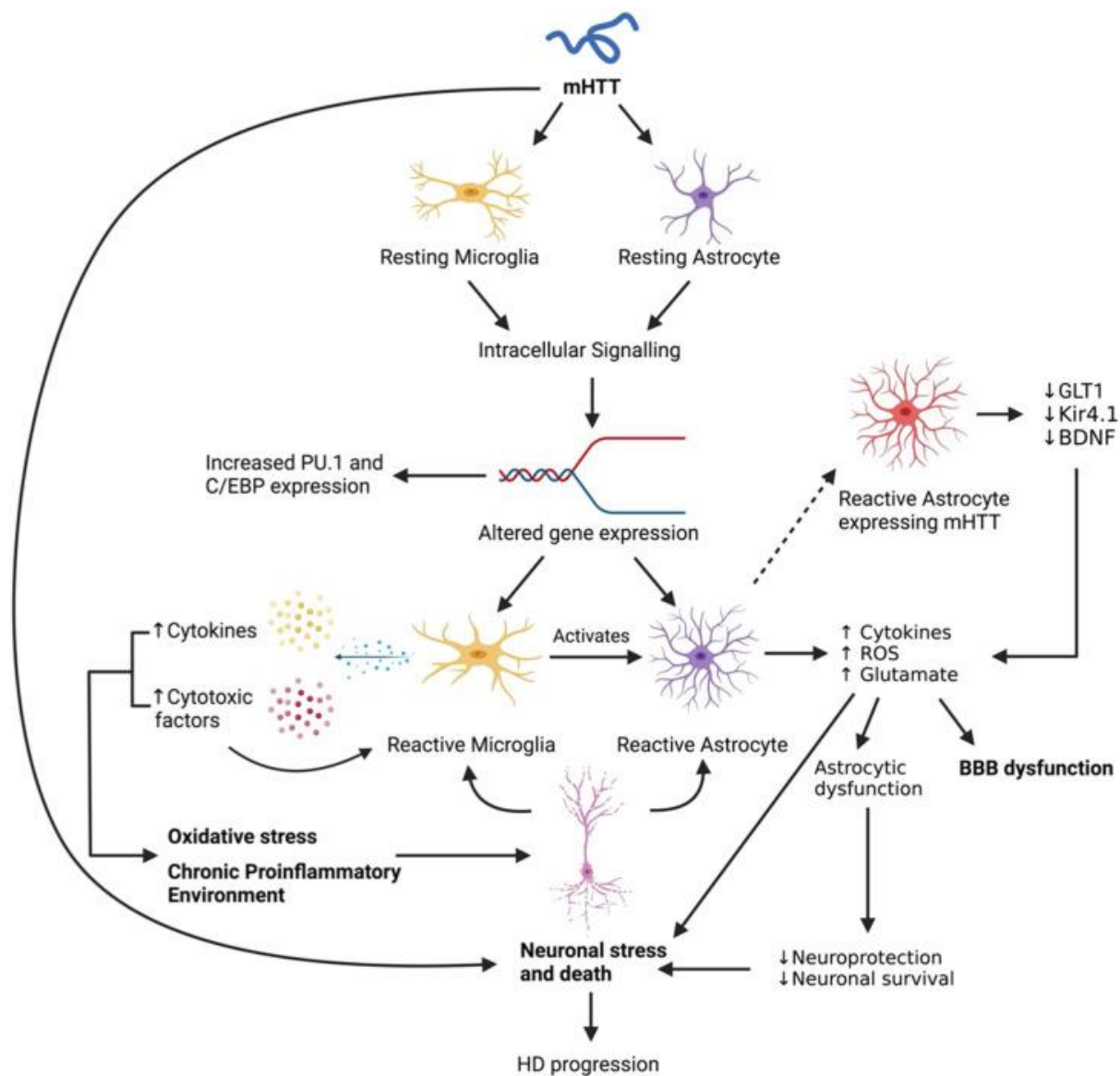
HELIOS-A οδήγησαν στην έγκριση του Vutrisiran από τον FDA και τον EMA για τη θεραπεία της hATTR-PN το 2022 (Keam, 2022).

Το Vutrisiran είναι καλά ανεκτό και έχει αποδεκτό προφίλ ασφάλειας. Σε αντίθεση με το Patisiran, οι ασθενείς δεν χρειάζονται προφάρμακευτική αγωγή, αν και όλοι οι ασθενείς χρειάζονται συμπλήρωμα βιταμίνης A. Η πλειονότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών στη δοκιμή φάσης I του Vutrisiran ήταν ήπιες και περιελάμβαναν ρινοφαρυγγίτιδα, κεφαλαλγία και αντιδράσεις στο σημείο της ένεσης. Μια παροδική ασυμπτωματική υποκλινική αύξηση της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (alanine aminotransferase, ALT) (ALT < 3 φορές το ανώτερο όριο του φυσιολογικού) παρατηρήθηκε σε ορισμένους ασθενείς στους οποίους συνταγογραφήθηκαν ≥ 100 mg και ένας ασθενής στον οποίο χορηγήθηκαν 200 mg ανέπτυξε μια κλινικά σημαντική ασυμπτωματική τρανσαμινίτιδα (ALT > 3 φορές το ανώτερο όριο του φυσιολογικού), που σχετίζεται με μια προσωρινή αύξηση της κινάσης της κρεατίνης που πιστεύεται ότι είναι δευτερογενής σε υπερβολική σωματική δραστηριότητα (Adams et al., 2022). Η δοκιμή HELIOS-A ανέφερε επίσης ενθαρρυντική ασφάλεια και ανεκτικότητα, με την πλειονότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών να είναι ήπιες ή μέτριες. Υπήρξαν δύο θάνατοι στην ομάδα Vutrisiran και τρεις στην ομάδα Patisiran. Ένας επιπλέον ασθενής διέκοψε τη θεραπεία με Vutrisiran λόγω σοβαρής ανεπιθύμητης ενέργειας. Σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που οδήγησαν σε θάνατο/διακοπή ήταν η πνευμονία COVID-19, η οξεία καρδιακή ανεπάρκεια και η απόφραξη της λαγόνιας αρτηρίας, καμία από τις οποίες δεν θεωρήθηκε σχετιζόμενη με τη θεραπεία. Μόνο δύο σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες αποδόθηκαν στο Vutrisiran: δυσλιπιδαιμία και λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος (Adams et al., 2022).

Κεφάλαιο 3: RNA θεραπείες που βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο

3.1. Νόσος Huntington

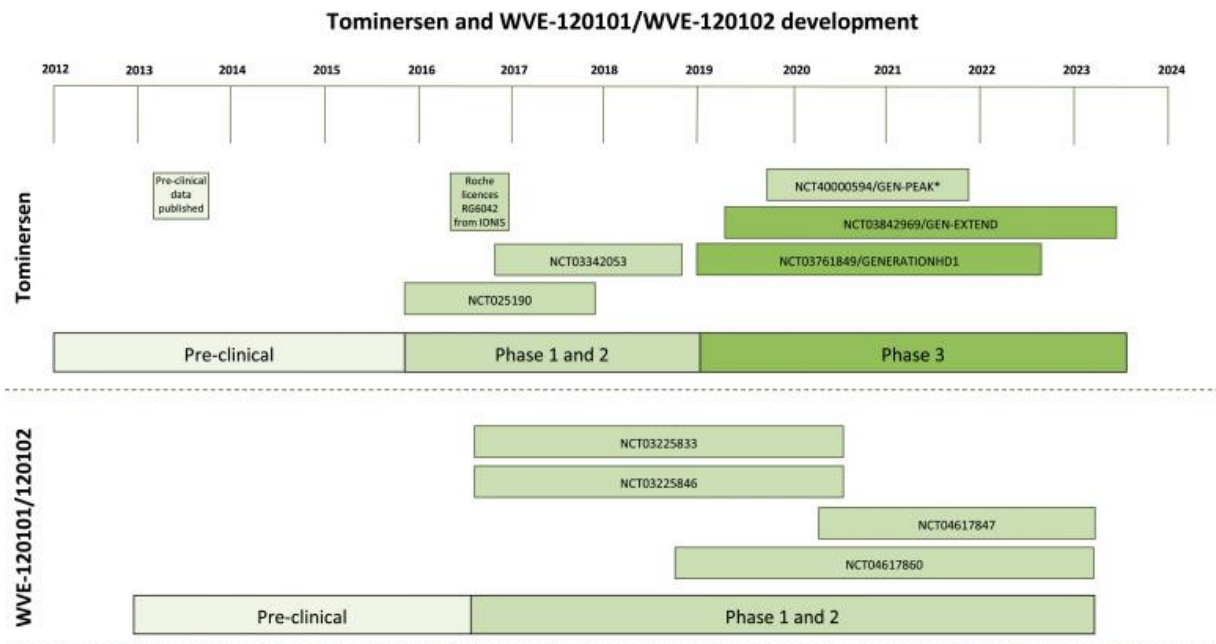
Η νόσος Huntington (Huntington disease, HD) είναι μια αυτοσωμική επικρατούσα νευροεκφυλιστική νόσος που επί του παρόντος δεν έχει εγκεκριμένη θεραπεία. Η HD χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό επαναλήψεων τρινουκλεοτιδίων CAG στο γονίδιο huntingtin (HTT) στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 4. Υψηλός αριθμός επαναλήψεων CAG στο γονίδιο HTT σχετίζεται άμεσα με μεγαλύτερη πιθανότητα έναρξης της HD. Άτομα με περισσότερες από 36 επαναλήψεις CAG έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης HD, ενώ οι ασθενείς με περισσότερες από 40 επαναλήψεις θα παρουσιάσουν τη νόσο κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Nance, 2017). Το γονίδιο HTT κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη huntingtin (HTT) (Hoffner & Djian, 2002). Ένας μεγάλος αριθμός επαναλήψεων CAG οδηγεί σε μια δυσλειτουργική πρωτεΐνη mHTT, σχηματίζοντας συσσωματώματα πρωτεΐνης στους νευρώνες και σε άλλους κυτταρικούς τύπους (Scherzinger et al., 1999). Αυτά τα συσσωματώματα, είναι υπεύθυνα για τον εκφυλισμό των νευρώνων λόγω οξειδωτικού στρες και χρόνιας φλεγμονής (Εικόνα 13) (Palpagama et al., 2019). Η έναρξη της HD εμφανίζεται συνήθως στη μέση ηλικία, ωστόσο, τα συμπτώματα της HD μπορεί να εμφανιστούν οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της ζωής (Roos, 2010). Παγκοσμίως, ο επιπολασμός της HD είναι 2,71 ανά 100.000, ωστόσο, ο αριθμός αυτός αυξάνεται σε 5,70 ανά 100.000 σε χώρες του Δυτικού κόσμου όπως η Ευρώπη, οι Η.Π.Α. και η Αυστραλία (Pringsheim et al., 2012).



Εικόνα 13: Μηχανισμοί παθογένεσης της νόσου του Huntington (Ferguson et al., 2022).

3.1.1. Θεραπείες με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια

Υπάρχουν 3 ASO σε κλινικές δοκιμές επί του παρόντος για HD – Tominersen (μη ειδικό ASO για κάθε αλληλόμορφο του γονιδίου HTT), WVE-120101 και WVE-120102 (ASO για συγκεκριμένα για αλληλόμορφα του γονιδίου HTT) (Tabrizi et al., 2020) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης θεραπείας Tominersen και WVE-120101/WVE-120102.

Tominersen

Το Tominersen,, όπως και τα WVE-120101 και WVE-120102, λειτουργεί με συμπληρωματικό ζευγάρι βάσεων με στόχο το pre-mRNA, προκαλώντας αποικοδόμηση που προκαλείται από την RNase H1. Μειώνουν τα επίπεδα mHTT mRNA, επομένως, μειώνουν τη σύνθεση πρωτεΐνης mHTT. Η χορήγηση γίνεται μέσω ενδορραχιαίας ένεσης στο ENY μέσω οσφυϊκής παρακέντησης, επιτρέποντας την κατανομή στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Marxreiter et al., 2020).

Το Tominersen Hoffman-La Roche's RO7234292 ή Tominersen (προηγουμένως ονομαζόταν IONIS-HTTRx/RG6042; IONIS Pharmaceuticals) είναι ένα ASO που συνδέεται με το άγριο τύπου HTT (wtHTT) και mHTT mRNA, προκαλώντας αποικοδόμηση (Marxreiter et al., 2020). Αυτή τη στιγμή είναι το πιο ανεπτυγμένο θεραπευτικό ASO για τη HD (Rodrigues & Wild, 2020).

Το Tominersen κατανεμήθηκε καλά σε ποντίκια και εγκεφάλους πρωτεύοντων πλην του ανθρώπου κατά τη διάρκεια προκλινικών πειραμάτων. Μείωσε το mHTT mRNA και την πρωτεΐνη mHTT με δοσοεξαρτώμενο, σταθερό τρόπο. Το Tominersen ανέστρεψε τον φαινότυπο της HD, βελτίωσε την επιβίωση και μείωσε την ατροφία του εγκεφάλου σε ποντίκια (Kordasiewicz et al., 2012). Αυτά τα πειράματα ενημέρωσαν τον ακόλουθο σχεδιασμό κλινικής δοκιμής φάσης Ib/IIa.

Στην αρχική τυχαίοποιημένη, διπλά τυφλή κλινική δοκιμή φάσης Ib/IIa (NCT02519036), οι συμμετέχοντες (n = 46) χωρίστηκαν σε 5 ομάδες αύξουσας δόσης και μια ομάδα εικονικού

φαρμάκου. Το Tominersen χορηγήθηκε κάθε 28 ημέρες σε 4 δόσεις και οι συμμετέχοντες παρακολούθηθηκαν μετά από 4 μήνες. Δεν εμφανίστηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες και η συχνότητα εμφάνισης δευτερευόντων ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν παρόμοια για τις ομάδες Tominersen και εικονικού φαρμάκου. Το mHTT του ENY μειώθηκε κατά 40% κατά μέσο όρο στις δόσεις των 90 mg και 120 mg και το Tominersen παρουσίασε εξάρτηση από τη δόση (Dhuri et al., 2020). Έκτοτε έχουν ξεκινήσει πολλαπλές δοκιμές τα αποτελέσματα των οποίων δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί.

WVE-120101 και WVE-120102

Τα Wave Life Sciences's WVE-120101 και WVE-120102 είναι ειδικά αλληλόμορφα, στερεότυπα ASO. Στοχεύουν σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphisms, SNP) που είναι ειδικοί για γονότυπους HD – το WVE-120101 στοχεύει το rs362307 (SNP1) και το WVE-120102 το rs362331 (SNP2) (Hersch et al., 2017). Είναι ειδικά για αλληλόμορφα, γεγονός που θεωρείται ότι δυνητικά αποφεύγει τις μακροπρόθεσμες αρνητικές επιπτώσεις, καθώς δεν μειώνουν το wtHTT (Kaemmerer & Grondin, 2019). Καθώς στοχεύουν SNP, το WVE-120101 και το WVE-120102 δεν μπορούν να θεραπεύσουν όλους τους ασθενείς με HD – αλλά η συνδυασμένη χρήση θα μπορούσε να στοχεύσει στο 80% των Ευρωπαίων ασθενών με HD (Rodrigues & Wild, 2018). Μη δημοσιευμένα προκλινικά πειράματα έδειξαν ότι μείωσαν το mHTT mRNA χωρίς να αλλάξουν σημαντικά το mRNA του wtHTT και την πρωτεΐνη σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από ασθενείς. Αυτό οδήγησε σε τυχαιοποιημένες, διπλά τυφλές κλινικές δοκιμές φάσης Ib/IIa (PRECISION-HD1 και PRECISION-HD2; NCT03225833, NCT03225846), οι οποίες στρατολόγησαν συμμετέχοντες με πρώιμη έκδηλη HD και rs362307 (SNP1) ή rs362331 (SNP2). Οι συμμετέχοντες (n = 60 ανά δοκιμή) χωρίστηκαν σε 6 ομάδες – δόσεις 2 mg, 4 mg, 8 mg, 16 mg ή 32 mg WVE-120101/WVE-120102 ή εικονικό φάρμακο (0,9% NaCl) (Marxreiter et al., 2020). Οι παράλληλες μελέτες είχαν σκοπό τη μέτρηση ανεπιθύμητων ενεργειών, ανεκτικότητας, φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής (Hersch et al., 2017).

Τα πρώτα αποτελέσματα της PRECISION-HD2 έδειξαν ότι το WVE-120102 μείωσε την πρωτεΐνη mHTT του CSF κατά 12,4% σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο σε όλες τις ομάδες (n = 44). Αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό σε υψηλότερες δόσεις και παρουσίασε εξάρτηση από τη δόση. Το συνολικό HTT δεν άλλαξε μεταξύ των ομάδων. Δεν υπήρξαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ παρατηρήθηκαν και μέτριες ανεπιθύμητες ενέργειες για το WVE-120102 (72%) από το εικονικό φάρμακο (83%) (Marxreiter et al., 2020). Ωστόσο, στις αρχές του 2021 η Wave Life Sciences ανακοίνωσε την τριάδα PRECISION-HD2 Τα δεδομένα

έδειξαν ότι το WVE-120102 δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στο mHTT σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. Τα δεδομένα PRECISION-HD1 έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα, επομένως και οι δύο δοκιμές σταμάτησαν (Ferguson et al., 2022).

Ξεκίνησαν εκτεταμένες μελέτες (Open label extension studies) για ασθενείς που συμμετείχαν στις δοκιμές PRECISION (NCT04617847 για WVE-120101, NCT04617860 για WVE-120102). Έλαβαν πολλαπλές δόσεις 8 mg ή 16 mg WVE-120101/WVE-120102 (Marxreiter et al., 2020). Τα αποτελέσματα της δοκιμής επέκτασης ανοιχτής ετικέτας για το PRECISION-HD2 έδειξαν ελαφρά αλλά ασυνεπή μείωση του mHTT, χωρίς τη δυνατότητα σταθερής μείωσης του mHTT με αυξημένες δόσεις. Η δοσολογία στις μελέτες επέκτασης έχει σταματήσει για τα WVE-120101 και WVE-120102 δεδομένης της αδυναμίας τους να μειώσουν σημαντικά το mHTT και επομένως να έχουν κλινικό όφελος (Ferguson et al., 2022). Το WVE-003 της Wave Life Science είναι ένα προκλινικό ASO που στοχεύει ένα απροσδιόριστο SNP (SNP3) σε mRNA mHTT. Το WVE-003 μείωσε το mHTT mRNA *in vitro* και πέτυχε knockdown του mHTT mRNA *in vivo*. Η αίτηση για κλινική δοκιμή υποβλήθηκε στα τέλη του 2020 (Dale et al., 2020).

Άλλα

Το BioMarin's (CUG)⁷ είναι ένα προκλινικό ειδικό για αλληλόμορφο ASO που στοχεύει διευρυμένες επαναλήψεις CAG στο mRNA mHTT (Wild & Tabrizi, 2017). Μετά από πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε ινοβλάστες που προέρχονται από ασθενείς με HD (Evers et al., 2011), οι ερευνητές βρήκαν ότι το (CUG)⁷ μείωσε τη συγκέντρωση πρωτεΐνης mHTT σε ποντίκια μοντέλων R6/2 και Q175 HD κατά 15-60%, βελτίωσε τα κινητικά συμπτώματα και αύξησε τον όγκο του φλοιού (Datson et al., 2017). Τα ποντίκια R6/2 είναι διαγονιδιακά μοντέλα HD που δημιουργούνται με την έκφραση του εξονίου ενός του ανθρώπινου γονιδίου mHTT, που περιέχει 150 επαναλήψεις CAG (Li et al., 2005). Τα Q175 HD knock-in ποντίκια εκφράζουν ανθρώπινο mHTT εντός του γονιδίου *HD* του ποντικού, που περιέχει 179 επαναλήψεις CAG (Menalled et al., 2012).

Ένας αριθμός περαιτέρω προκλινικών θεραπειών της HD με ASO είναι επί του παρόντος υπό ανάπτυξη. Ορισμένες ομάδες ερευνούν ASO που στοχεύουν SNP που σχετίζονται με αλληλόμορφα HD, επομένως, στοχεύοντας στην επιλεκτική καταστολή της έκφρασης mHTT (Skotte et al., 2014; Southwell et al., 2014). Τα αποτελέσματα σε νευρώνες μοντέλου ποντικών HD (Skotte et al., 2014), και *in vivo* με χρήση ποντικών μοντέλου HD ήταν θετικά (Southwell et al., 2014). Τα μειωτικά των ολικών HTT και των ειδικών για mHTT ASO βελτίωσαν τα γνωστικά και συμπεριφορικά ελλείμματα σε ποντίκια μοντέλα της HD με ασφάλεια και

ανεκτικότητα και μείωσαν την HTT στον φλοιό και τις μεταιχμιακές δομές σε εγκεφάλους πρωτεύοντων πλην του ανθρώπου (όπου προέρχονται σε μεγάλο βαθμό τα γνωστικά και συμπεριφορικά συμπτώματα) (Southwell et al., 2018). Ένα άλλο ASO επάγει την παράκαμψη του εξονίου 12 στο pre-mRNA του HTT, αποτρέποντας την έκφραση θέσεων διάσπασης, δημιουργώντας επομένως θραύσματα 586 υπολειμάτων στην N-τερματική HTT. Μελέτες σε τρωκτικά έδειξαν επιτυχή παράλειψη εξονίων, μικρότερη πρωτεΐνη HTT και μειωμένα θραύσματα HTT στο 586 N-τελικό αμινοξύ (Evers et al., 2014).

Ορισμένα ASO δεν στοχεύουν HTT, όπως το TTX-3360 της Triplet Therapeutics. Στοχεύει το MSH3 εντός του μονοπατιού DNA Damage Response, το οποίο συχνά εμπλέκεται στην επαναλαμβανόμενη επέκταση. Το TTX-3360 είναι ασφαλές και ανεκτό σε ποντίκια μοντέλα της HD, και κατά 50% το knockdown MSH3 μείωσε ή ανέστειλε την επανάληψη της επέκτασης του mHTT. Μια διερευνητική αίτηση για νέο φάρμακο/κλινική δοκιμή έχει γίνει στα τέλη του 2021 (Ferguson et al., 2022).

3.1.2. Θεραπείες παρεμβολής RNA

AMT-130

Το AMT-130 (UniQure Biopharma B.V., που ονομάζεται AAV5-miHTT σε προκλινικές μελέτες) είναι μια γονιδιακή θεραπεία με βάση το RNAi. Είναι η μόνη γονιδιακή θεραπεία που βρίσκεται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές για τη HD (Rodrigues & Wild, 2020). Το AMT-130 περιέχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα miRNA, το οποίο μεταφέρεται μέσω του αδενο-σχετιζόμενου ιικού φορέα ορότυπου 5 (adeno-associated virus vector serotype 5, AAV5). Το AMT-130 ενεργοποιεί το RISC, το οποίο σταματά την πρωτεϊνική σύνθεση του mHTT (και wtHTT). Το AMT-130 χορηγείται μέσω ενδοραβδικής ένεσης (Evers & Konstantinova, 2020).

Σε ένα μοντέλο HD αρουραίου, ποντίκια Hu128/21 με HD και νευρώνες που προέρχονται από ασθενείς με HD, το AAV5-miHTT μείωσε τα επίπεδα mHTT mRNA και πρωτεΐνης (Keskin et al., 2019). Τα ποντίκια Hu128/21 HD προκύπτουν από τη διασταύρωση ενός μοντέλου ποντικού της HD, YAC128, με ένα μοντέλο wtHTT, BAC21, δίνοντάς τους 2 πλήρους μήκους ανθρώπινα μετάγραφα HTT που είναι ετερόζυγα για τη μετάλλαξη HD (Southwell et al., 2017). Η ισχυρή καταστολή του mHTT διατηρήθηκε για 7 μήνες μετά την ένεση σε ποντικούς Hu128/21 HD (Caron et al., 2020). Σε ποντικούς HD Q175, το AAV5-miHTT μείωσε την ανθρώπινη πρωτεΐνη HTT και τα συσσωματώματα mHTT του ραβδωτού σώματος (39%) και του φλοιού 12 μήνες μετά την ένεση. Τα ποντίκια R6/2 HD εμφάνισαν βελτίωση των κινητικών συμπτωμάτων και παρατεταμένη επιβίωση (Spronck et al., 2019). Συσσωματώματα mHTT

καταστέλλονται σε ένα μοντέλο αρουραίου HD - μειώνοντας τη νευρωνική δυσλειτουργία (Miniarikova et al., 2017). Το AAV5-miHTT μείωσε το ανθρώπινο mHTT mRNA (72,8%) και την πρωτεΐνη (85,3%) στον εγκέφαλο των μικρών χοιριδίων και έδειξε εξάρτηση από τη δόση (Evers et al., 2018). Το AAV5-miHTT δεν δημιούργησε αποτελέσματα εκτός στόχου που προκαλούνται από γονιδιακή δυσρύθμιση ή εσφαλμένη επεξεργασία σε νευρώνες που προέρχονται από ασθενείς με HD (Keskin et al., 2019), αλλά σε υψηλές δόσεις προκάλεσαν αστρογλοίωση σε ποντικούς Hu128/21 (Caron et al., 2020). Το AMT-130 έδειξε ασφάλεια, ανεκτικότητα και ευρεία κατανομή στον εγκέφαλο πρωτεύοντων πλην του ανθρώπου (Spronck et al., 2021).

Οι κλινικές δοκιμές φάσης Ib/IIa θα δοκιμάσουν την ασφάλεια και την απόδειξη της λειτουργίας του AMT-130 σε 26 εμφανείς ασθενείς HD (NCT04120493). Σε κάποιους θα χορηγηθεί χαμηλή ή υψηλή δόση μέσω αμφοτερόπλευρης ενδοραβδικής ένεσης καθοδηγούμενη από μαγνητική τομογραφία και σε άλλους θα χορηγηθεί εικονικό φάρμακο (χειρουργική απομίμησης) (Rodrigues & Wild, 2020). Οι ερευνητές μετρούν τις ανεπιθύμητες ενέργειες, τους βιοδείκτες ENY, το AMT-130 στο ENY, τη συγκέντρωση mHTT και τις αλλαγές στην κλινική κλίμακα (όπως το UHDRS) κατά τη διάρκεια της βασικής περιόδου της μελέτης και παρακολουθούν. Δεδομένα από τους αρχικούς 6 μήνες της δόσης σε 2 ασθενείς και δεδομένα 90 ημερών από τους επόμενους 2 ασθενείς έδειξαν ότι το AMT-130 ήταν ασφαλές. Αυτό προκάλεσε την πλήρη εγγραφή της πρώτης κοόρτης δοσολογίας (n = 10). Η μελέτη αναμένεται να ολοκληρωθεί το 2026 (Ferguson et al., 2022).

Άλλες RNAi θεραπείες

Το VY-HTT01 της Voyager Therapeutics είναι μια γονιδιακή θεραπεία που βασίζεται σε αλληλόμορφο μη ειδικό RNAi. Ένα miRNA εκφράζεται και διανέμεται μέσω AAV1, στοχεύοντας στην αποικοδόμηση του HTT mRNA. Χορηγείται με ενδοκρανιακή ένεση (Wild & Tabrizi, 2017). Σε διαγονιδιακούς ποντικούς HD YAC128, που εκφράζουν την ανθρώπινη HTT πλήρους μήκους με 128 επαναλήψεις CAG, το VY-HTT01 μείωσε την πρωτεΐνη HTT του ραβδωτού σώματος κατά 40%, διόρθωσε εν μέρει τα κινητικά και συμπεριφορικά συμπτώματα, μείωσε τα συσσωματώματα HTT και έδειξε αποτελεσματική κατανομή ραβδωτού σώματος (Ghilan et al., 2014). Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα δείχνουν ότι το VY-HTT01 μείωσε το ραβδωτό (67%) και το θαλαμικό (73%) HTT mRNA σε πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου. Αιτήσεις κλινικών δοκιμών υποβλήθηκαν στα τέλη του 2020, αλλά βρίσκονται σε αναμονή για την επίλυση ζητημάτων χημείας, κατασκευής και ελέγχου (Ferguson et al., 2022).

Η Spark Therapeutics αναπτύσσει επίσης ένα φάρμακο με βάση το RNAi, χρησιμοποιώντας ένα shRNA που μεταφέρεται με AAV1 (AAV.shHD2.1) (Wild & Tabrizi, 2017). Μελέτες σε τρωκτικά έδειξαν βελτίωση των κινητικών συμπτωμάτων, μειωμένη έκφραση του ανθρώπινου mHTT (Harper et al., 2005) και νευροπροστασία κατά τη χορήγηση με AAV.shHD2.1 (Franich et al., 2008). Σε πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου, η μείωση της έκφρασης της HTT μέσω RNAi δεν οδήγησε σε νευρωνικό εκφυλισμό ή σε ανοσοαπόκριση για 6 εβδομάδες μετά την ένεση στο κέλυφος φακοειδούς πυρήνα, υποστηρίζοντας το RNAi ως πιθανή θεραπεία HD (McBride et al., 2011). Κλινικές δοκιμές δεν έχουν ακόμη ξεκινήσει (Tabrizi et al., 2020).

3.1.3. Θεραπείες με CRISPR

Στην HD οι θεραπείες CRISPR/Cas9 μπορούν να αφαιρέσουν εκτεταμένες επαναλήψεις CAG για να διορθώσουν τα αλληλόμορφα HD, να αδρανοποιήσουν τα αλληλόμορφα που σχετίζονται με την HD ή να στοχεύσουν το ίδιο το γονίδιο HTT, μειώνοντας μη ειδικά την HTT. Πολλαπλές ομάδες ερευνούν το CRISPR προκλινικά για τη HD (Ferguson et al., 2022). Η αποτελεσματικότητα του CRISPR/Cas9 έχει αξιολογηθεί σε κυτταρικές σειρές. Μια ζευγοποιημένη στρατηγική με Cas9 nickase πέτυχε εκτομή εκτεταμένων επαναλήψεων CAG στο εξόνιο 1 του γονιδίου HTT σε 3 διακριτές γραμμές ινοβλαστών που προέρχονται από ασθενείς με HD, απενεργοποιώντας το HTT. Οι nickases προκαλούν θραύσματα μονής έλικας, μειώνοντας τα αποτελέσματα εκτός στόχου λόγω αυξημένης ειδικότητας. Κάθε κυτταρική σειρά που υποβλήθηκε σε θεραπεία με Cas9-nickases είχε διαφορετικά μήκη επαναλήψεων CAG και παρουσίασε περίπου 70% μείωση της πρωτεΐνης HTT (Dabrowska et al., 2018). Μια στρατηγική που χρησιμοποιεί CRISPR-Cas9 και τρανσποζόνιο piggyBac ήταν επίσης επιτυχής σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τον άνθρωπο, διορθώνοντας το αλληλόμορφο mHTT και τροποποιώντας φαινοτυπικά ελαττώματα που προκαλούνται από την HD (Xu et al., 2017).

Μια προσέγγιση CRISPR/Cas9 που βασίζεται στο SNP που μεταβάλλει το PAM, που σχετίζεται με mHTT, βρίσκεται επίσης υπό ανάπτυξη. Αυτή η θεραπεία προκαλεί μια μετάλλαξη διαγραφής που αδρανοποιεί το αλληλόμορφο mHTT, αφήνοντας ένα άθικτο αλληλόμορφο wtHTT. Σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από ασθενείς με HD, η εκτομή των επαναλήψεων CAG που σχετίζονται με τα αλληλόμορφα mHTT ήταν επιτυχής (Shin et al., 2016).

Ορισμένες ομάδες έχουν ερευνήσει το CRISPR σε μοντέλα ζώων της HD. Η διαγραφή του τομέα mHTT polyQ με χρήση στρατηγικής βασισμένης στο αλληλόμορφο μη ειδικό CRISPR/Cas9 κατέστηλε επιτυχώς την έκφραση του ανθρώπινου mHTT στο ραβδωτό σώμα

ποντικών HD140Q-knock-in, τα οποία εκφράζουν ανθρώπινο mHTT πλήρους μήκους με εξόνιο 1 που περιέχει 140 επαναλήψεις CAG. Το CRISPR χορηγήθηκε μέσω ραβδωτής ένεσης. Αυτή η προσέγγιση μείωσε την έκφραση του mHTT, τα συσσωματώματα mHTT, την αντιδραστικότητα των αστροκυττάρων και βελτίωσε τα κινητικά συμπτώματα (Yang et al., 2017). Μια άλλη ομάδα έκανε ένεση SpCas9 ή sgRNA που χορηγήθηκαν από ανασυνδυασμένα AAV (συντομογραφία rAAV.SpCas9 και rAAV.sgHD1/i3, αντίστοιχα) στο δεξί ημισφαίριο ποντικών BACHD. Το ανθρώπινο εξόνιο HTT 1 διαγράφηκε, μειώνοντας το ανθρώπινο mHTT mRNA κατά 40%. Το αριστερό ημισφαίριο χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος και δεν έδειξε μειωμένη έκφραση mHTT (Monteys et al., 2017). Μια άλλη ομάδα διερεύνησε την *in vivo* ραβδωτή ένεση των θεραπειών CRISPR/Cas9 (AAV1-SaCas9-HTT για τη στόχευση του ανθρώπινου HTT ή AAV1-SaCas9-mRosa26 ως μάρτυρας) σε ποντικούς R6/2 HD. Βρήκαν ότι το AAV1-SaCas9-HTT μείωσε τα εγκλείσματα πρωτεΐνης mHTT κατά 40%, μείωσε τη συνολική πρωτεΐνη mHTT κατά 50% και βελτίωσε τη διάρκεια ζωής και τα κινητικά συμπτώματα (Ekman et al., 2019).

3.2. Κυστική ίνωση

Η κυστική ίνωση (cystic fibrosis, CF) είναι μια χρόνια και προοδευτική διαταραχή των εκκριτικών επιθηλιακών κυττάρων, που προκαλείται από μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου CFTR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ελαττώματα στη σύνθεση ή/και διακίνηση του καναλιού ανιόντων CFTR στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων που οδηγούν σε αποφράξεις στους αεραγωγούς των πνευμόνων και στους παγκρεατικούς πόρους περισσότερων από 70.000 ανθρώπων παγκοσμίως (Cutting et al., 2015). Ιδιαίτερα αποτελεσματικοί ρυθμιστές/φάρμακα είναι πλέον διαθέσιμοι για περίπου 90% των ατόμων με CF, αλλά το υπόλοιπο 10% έχει παραλλαγές CFTR που δεν ανταποκρίνονται σε αυτά τα φάρμακα.

3.2.1. Θεραπεία με mRNA

Το mRNA που κωδικοποιεί την επιθυμητή πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, είναι εννοιολογικά η απλούστερη θεραπεία με βάση το νουκλεϊκό οξύ για την CF. Επιπλέον, ένα πλεονέκτημα του mRNA είναι ότι η άμεση χορήγηση του μηνύματος σημαίνει ότι δεν υπάρχει εξάρτηση από ένα μόριο DNA που πρέπει να εκφράσει το μήνυμα, το οποίο ήταν μέχρι σήμερα περιοριστικός παράγοντας κλινικών δοκιμών με βάση το DNA για την CF. Μια πρόιμη μελέτη της προσέγγισης mRNA σε κύτταρα CFBE41o⁻ και πρωτογενή ανθρώπινα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα έδειξε ότι το *in vitro* μεταγραμμένο mRNA με πολύ-A ουρά 120 βάσεων είχε ως

αποτελεσμα την έκφραση της πρωτεΐνης CFTR στην κορυφαία μεμβράνη και αποκατέστησε τα επαγόμενα από το cAMP κανάλια CFTR (Bangel-Ruland et al., 2013). Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν με ένα χημικά τροποποιημένο mRNA (όλες οι ουριδίνες αντικαταστάθηκαν με ψευδοουριδίνες και όλες οι κυτιδίνες με 5-μεθυλοκυτιδίνες) σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από ασθενή (Robinson et al., 2018) και σε επιθηλιακούς αεραγωγούς σε ποντίκια CFTR knockout, με μέγιστη δραστηριότητα CFTR 55% της καθαρής εκροής Cl⁻ ποντικών άγριου τύπου) τρεις ημέρες μετά τη διαμόλυνση. Η βελτιωμένη μεταφορά mRNA έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας το πεπτιδίο διεϊσδυσης κυττάρων (cell penetrating peptide, CPP) Xentry συντηγμένο σε μια περικομμένη μορφή της πεπτιδικής πρωταμίνης (Bell et al., 2018), ή με mRNA φορτωμένο στις επιφανειακές νανοκάψουλες χιτοζάνης για την αποκατάσταση της λειτουργίας του CFTR σε επιμολυσμένα κύτταρα CFBE41o⁻ (Kolonko et al., 2020).

Οι αρχικές αναφορές από την κλινική δοκιμή πρώτης φάσης I/II, στην οποία χορηγήθηκε CFTR mRNA (MRT5005) με νεφελοποίηση περιέγραφαν αυξήσεις στο FEV1 (αναγκαστικός εκπνευστικός όγκος σε 1 δευτερόλεπτο / forced expiratory volume in 1 s) σε μια μικρή ομάδα ενηλίκων με CF σε μια μελέτη εφάπαξ δόσης 16 mg (NCT03375047). Ωστόσο, μια μεταγενέστερη ανακοίνωση ανέφερε ότι δεν μπορούσε να ανιχνευθεί μοτίβο αύξησης σε ασθενείς στη μελέτη πολλαπλής αύξουσας δόσης. Είναι σημαντικό ότι δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές παρενέργειες της επαναλαμβανόμενης δόσης του mRNA, μια παρατήρηση που έγινε επίσης σε παλαιότερη μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης με DNA (Alton et al., 2015). Η έλλειψη σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών μέχρι σήμερα αποτελεί σημαντικό σημείο αναφοράς για μελλοντικές μελέτες δοκιμών που βασίζονται σε RNA και DNA.

Δύο άλλες εμπορικές ομάδες παρουσίασαν προκλινικά δεδομένα με mRNA. Το πρώτο (RTX0001) που παρέχεται από το λιπιδικό νανοσωματίδιο SORT-LNP με αναφερόμενη αύξηση της δραστηριότητας του διαύλου ιόντων CFTR σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (Torres, 2023). Στην άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα σκεύασμα mRNA βελτιστοποιημένο με κωδικόνιο (LUNAR-hCFTR mRNA) και αναφέρθηκε αποκατάσταση του διαύλου ιόντων CFTR σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα από Ferrets με τη μετάλλαξη G551D που προκαλεί CF (Sun et al., 2019) σε επίπεδο συγκρίσιμο με τη θεραπεία με το φάρμακο ενισχυτή CF VX-770, και σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα σε επίπεδο συγκρίσιμο με τη θεραπεία με το φάρμακο διορθωτή CF VX-809. Η εφαρμογή mRNA LUNAR-hCFTR στο ρινικό μοντέλο ποντικού G542X έδωσε επίσης μικρές αλλά σημαντικές αλλαγές στη διαφορά δυναμικού της μύτης (Perez-Garcia, n.d.).

3.2.2. Θεραπεία με tRNA

Οι αλλαγές στο DNA που οδηγούν στο σχηματισμό πρώιμου κωδικονίου λήξης, είναι υπεύθυνες για περίπου το 15% των κληρονομικών νοσημάτων. Η αποσιώπηση αυτών των κωδικονίων λήξης κατά τη μετάφραση είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία γενετικών νοσημάτων όπως η κυστική ίνωση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση anticodon engineered transfer RNAs, τα οποία φέρουν ένα αντικωδικόνιο το οποίο αναγνωρίζει το κωδικόνιο λήξης, ενώ ταυτόχρονα φέρει και το σωστό αμινοξύ. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα πρώιμα κωδικόνια λήξης και να κωδικοποιούν το σωστό αμινοξύ (Ting-Yu Lin 2022). Μελέτη των Lueck et al. έδειξε ότι το ACE-tRNAGly μπορεί να αποκαταστήσει κατά 20% την CFTR που φέρει την αλλαγή G542X στα HEK (human embryonic kidney) κύτταρα, ενώ αντίστοιχα το ACE-tRNATrp μπορεί να αποκαταστήσει κατά 6% την CFTR που φέρει την αλλαγή W1282X (Lueck et al., 2019).

3.2.3. Επεξεργασία RNA

Τουλάχιστον τρεις διαφορετικές στρατηγικές υπάρχουν για την επεξεργασία RNA, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από θεραπευτικές επιλογές για ορισμένες μεταλλάξεις της CF. Δύο πιθανοί περιορισμοί όλων αυτών των στρατηγικών επεξεργασίας RNA είναι ότι κάθε μετάλλαξη θα χρειαστεί ένα ξεχωριστό οδηγό RNA και θα είναι απαραίτητη η επαναλαμβανόμενη δόση.

Η απόδειξη της ιδέας ότι η επεξεργασία RNA A-to-I θα μπορούσε να διορθώσει τις μεταλλάξεις CFTR επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ένα αντιπληροφοριακό RNA για τη στρατολόγηση της περιοχής απαμινάσης (deaminase domain, DD) από το ένζυμο ADAR2 για τη διόρθωση της παραλλαγής W496X στο mRNA. Αυτό το αντιπληροφοριακό RNA παίζει διπλό ρόλο στη στόχευση και τη δημιουργία της δίκλωνης δομής που απαιτείται για την επεξεργασία A-to-I σε αυτή τη θέση και τη μετατροπή του κωδικονίου τερματισμού UAG σε κωδικόνιο UGG στο mRNA που μεταφράζεται ως τρυπτοφάνη (Montiel-Gonzalez et al., 2013). Οι επακόλουθες βελτιώσεις σε αυτή τη συγκεκριμένη προσέγγιση περιέλαβαν τη χρήση φουρκέτες boxB στο RNA και το πεπτίδιο λN στην πρωτεΐνη για τη σύνδεση του οδηγού και μιας τροποποιημένης DD (μία αλλαγή αμινοξέος, E488Q). Ενώ η τροποποιημένη DD αύξησε τόσο την επεξεργασία εντός όσο και εκτός στόχου, η πλειονότητα των γεγονότων εκτός στόχου βελτιώθηκε στοχεύοντας τον επεξεργαστή στον πυρήνα με μια ακολουθία πυρηνικού εντοπισμού. Οι συγγραφείς ανέφεραν 50% μετατροπή του κωδικονίου Y122X στο CFTR mRNA από UAA σε UGG, το οποίο αφαιρεί αποτελεσματικά το κωδικόνιο λήξης, αλλά

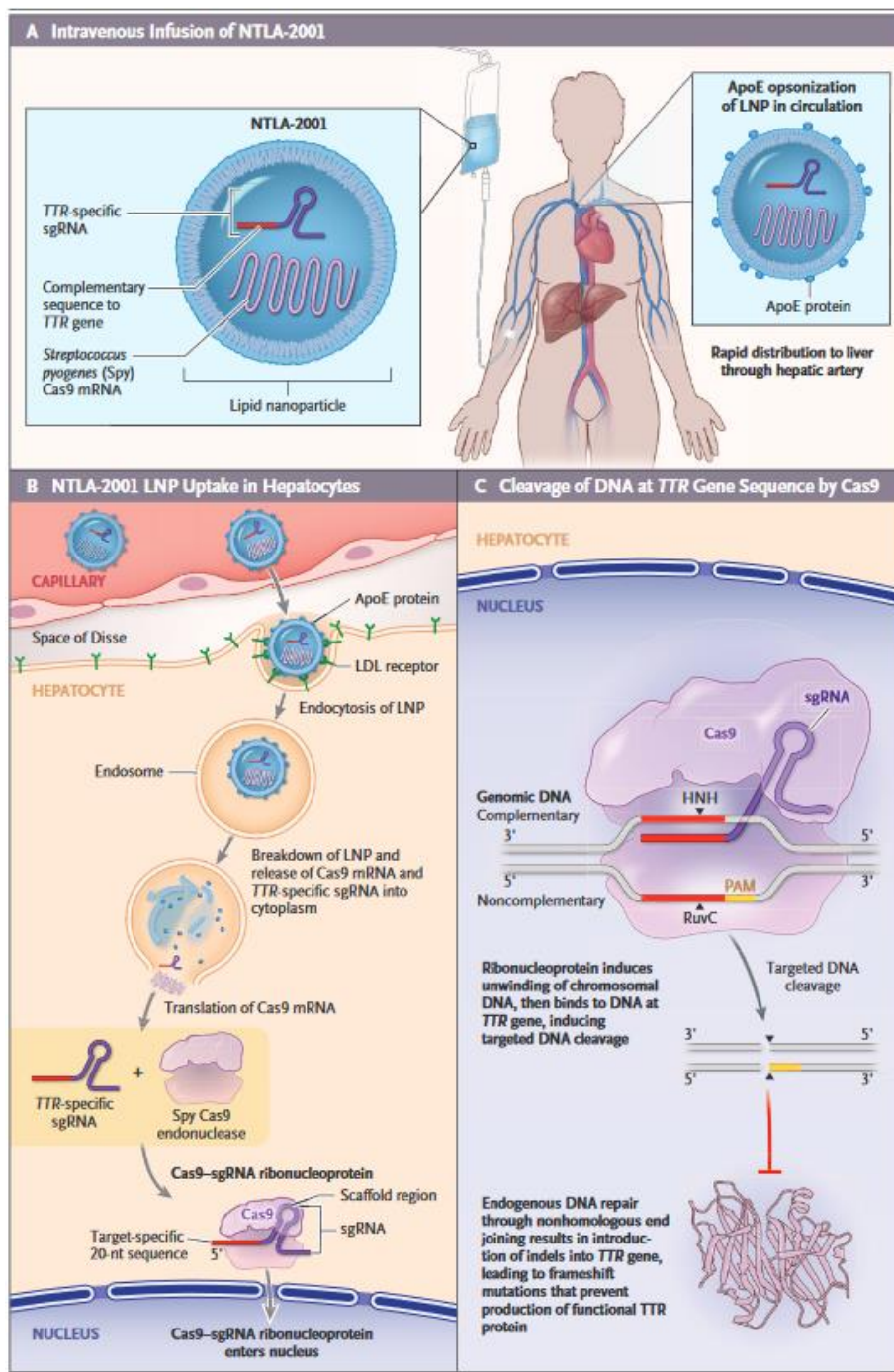
ενσωματώνει τρυπτοφάνη στην πρωτεΐνη CFTR σε αυτή τη θέση αντί της τυροσίνης (Vallecillo-Viejo et al., 2018).

Μια άλλη επιλογή για την επεξεργασία ορισμένων παραλλαγών CFTR PTC θα μπορούσε να είναι η ψευδοουριδυλίωση. Η ειδική για τη θέση μετατροπή της U στην πρώτη θέση των τριών κωδικονίων τερματισμού σε ψευδοουριδίνη (Ψ) καταλύεται από κυτταρικούς παράγοντες που κατευθύνονται από ένα βραχύ (~200 nt) αντιπληροφοριακό τεχνητό κουτί H/ACA που περιέχει μικρό πυρηνισικό RNA (small nucleolar RNA, snoRNA) που είναι ειδικό για το PTC που υπάρχει στο mRNA στόχο (Karijolich & Yu, 2011). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση τυροσίνης ή φαινυλαλανίνης σε ένα κωδικόνιο ΨGA και σερίνης ή θρεονίνης στα κωδικόνια ΨAA και ΨAG, με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεΐνης πλήρους μήκους και την καταστολή της μη νοηματικής διαμεσολαβούμενης αποσύνθεσης. Στο πλαίσιο της CF, ακόμα κι αν το υποκατεστημένο αμινοξύ δεν αποκαθιστά πλήρως τη λειτουργία της CFTR, θα μπορούσε να παράγει επαρκή πρωτεΐνη για να δράσουν τα ρυθμιστικά φάρμακα. Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι μόνο το μόριο snoRNA χρειάζεται να απελευθερωθεί καθώς οι ενδογενείς κυτταρικοί μηχανισμοί θα εκτελέσουν την ψευδοουριδυλίωση και την ανάγνωση του PTC (Adachi et al., 2021).

Πιο πρόσφατα, οι Zhang et al. έχουν αναφέρει δύο συστήματα επεξεργασίας βάσης RNA CRISPR που χρησιμοποιούν dCas13b, που ονομάζονται REPAIR (επεξεργασία A-to-I) (Cox et al., 2017) και RESCUE (επεξεργασία κυτιδίνης σε ουριδίνη (C-to-U)) (Abudayyeh et al., 2019). Μέχρι σήμερα, το σύστημα REPAIR έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη διόρθωση της μετάλλαξης CFTR W1282X στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK293FT και 32 από τους 33 άλλους στόχους PTC σε άλλα γονίδια που δοκιμάστηκαν (Cox et al., 2017) υποδηλώνοντας πιθανή εφαρμογή αυτού του συστήματος σε μια σειρά άλλων παραλλαγών που προκαλούν CF.

3.3 Κληρονομική Αμυλοείδωση από Τρανσθυρετίνη

Το NTLA-2001 είναι μια θεραπεία επεξεργασίας γονιδιώματος με βάση το CRISPR-Cas9, που μεταφέρεται εντός των κυτάρων μέσω νανοσωματιδίων λιπιδίων (LNPs). Μετά από μία μόνο χορήγηση, το NTLA-2001 οδήγησε σε σημαντική επεξεργασία του γονιδίου *TTR* ποντικού και 96% μείωση των επιπέδων TTR στον ορό που διήρκεσε τουλάχιστον 12 μήνες. Αυτά τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν σε διάφορα ζωικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένων πιθήκων *cynomolgus* και διαγονιδιακών ποντικών που έφεραν την ανθρώπινη παραλλαγή p.(Val50Met) χωρίς ανεπιθύμητα συμβάντα (Finn et al., 2018).



Gillmore et al 2021

Εικόνα 15: Μηχανισμός δράσης του NTLA-2001

Τα ενεργά συστατικά του NTLA-2001 είναι ένα μόριο mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Cas9 [a human-optimized messenger RNA (mRNA) molecule encoding *Streptococcus pyogenes* (Spy) Cas9 protein (an approximately 4400-nucleotide sequence with a molecular weight of approximately 1.5 Mda] και έναν οδηγό RNA [single guide RNA (sgRNA) molecule (molecular weight of approximately 35 kDa) ειδικό για μια περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου TTR. Το NTLA-2001 εισέρχεται ενδοφλέβια και μπαίνει στην κυκλοφορία του αίματος. Το

LNP κάνει σύζευξη με την ApoE και μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας του αίματος φτάνει στο ήπαρ. Το NTLA-2001 μέσω των τριχοειδών αγγείων μεταφέρεται στο ήπαρ και συνδέεται με τον υποδοχέα της LDL που εκφράζεται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων. Ακολουθεί ενδοκυττάρωση και σχηματισμός ενδοσωμάτων. Μετά την καταστροφή του ενδοσώματος, τα ενεργά συστατικά του NTLA-2001 (the TTR-specific sgRNA and the mRNA encoding Cas9) απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. Το μόριο Cas9 mRNA μεταφράζεται στα ριβοσώματα και παράγεται η ενδονουκλεάση Cas9. Το TTR-specific sgRNA αλληλεπιδρά με την ενδονουκλεάση Cas9 δημιουργώντας το σύμπλοκο CRISPR-Cas9 που θα εκτελέσει τη γονιδιακή τροποποίηση. Το CRISPR-Cas9 σύμπλοκο μεταφέρεται στον πυρήνα όπου αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο μοτίβο του γονιδίου TTR [protospacer-adjacent motif (PAM)] Ειδική αλληλουχία 20 νουκλεοτιδίων του sgRNA συνδέεται στη διπλή έλικα DNA σε συγκεκριμένη περιοχή, επιτρέποντας το σύμπλοκο CRISPR-Cas9 να ξετυλίξει τη διπλή έλικα ώστε να υπάρχει πρόσβαση στο γονίδιο-στόχο. Η ενδονουκλεάση Cas9 προκαλεί την ενεργοποίηση συγκεκριμένων περιοχών της (HNH and RuvC domains), με αποτέλεσμα την πέψη του DNA στη θέση του TTR γονιδίου. Οι ενδογενείς μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου συνδέουν τα άκρα που κόπηκαν από το σύμπλοκο, αφού προσθέσουν ή αφαιρέσουν βάσεις. Λόγω της προσθήκης βάσεων δημιουργούνται παρερμηνεύσιμες ή ανευρηνεύσιμες μεταλλάξεις στο mRNA που παράγεται με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής της πρωτεΐνης

Μια πολυκεντρική μελέτη δύο μερών ανοιχτής επισήμανσης, μίας δόσης, φάσης I σε ασθενείς με hATTR-PN και ATTR-CM βρίσκεται σε εξέλιξη για την αξιολόγηση της ασφάλειας, της ανεκτικότητας, της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής του NTLA-2001. Ενδιάμεσα αποτελέσματα από τη φάση αύξουσας δόσης της μελέτης έδειξαν ότι το NTLA-2001 παρήγαγε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της TTR. Οι ασθενείς έλαβαν προκαταρκτική φαρμακευτική αγωγή με κορτικοστεροειδή και αντιισταμινικά. Η έγχυση ολοκληρώθηκε σε όλους τους ασθενείς, χωρίς διακοπή, και αναφέρθηκαν λίγες σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι πιο συχνά αναφερόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη θεραπεία ήταν ήσσονος σημασίας αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση που εκδηλώθηκαν ως ναυτία, πονοκέφαλος, ρίγη και ρινόρροια. Οι ασθενείς που έλαβαν θεραπευτικές δόσεις NTLA-2001 είχαν μέση μείωση της TTR από την αρχική τιμή τουλάχιστον 90%, η οποία διατηρήθηκε μέχρι την τελευταία παρακολούθηση. Το knockdown του *TTR* με το NTLA-2001 αναμένεται να είναι μόνιμο (Gillmore et al., 2021). Η φάση επέκτασης της δόσης τόσο στο σκέλος της πολυνευροπάθειας όσο και της καρδιομυοπάθειας της δοκιμής βρίσκεται σε εξέλιξη.

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Η χρήση θεραπειών που βασίζονται σε RNA στη θεραπεία μονογονιδιακών ασθενειών φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο. Στην περίπτωση των ASOs, αρκετά φάρμακα έχουν ήδη εγκριθεί και ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δοκιμών που χρησιμοποιούν διάφορα είδη RNA βρίσκεται επί του παρόντος σε φάση σχεδιασμού, στρατολόγησης ή ενεργών φάσεων. Ωστόσο, παραμένουν ορισμένα ζητήματα που θα πρέπει να επιλυθούν. Τόσο η σταθερότητα και η ανοσογονικότητα του ωφέλιμου φορτίου του μορίου RNA όσο και η παράδοση στον πυρήνα στην περίπτωση των ASO, έχουν αντιμετωπιστεί με τη χρήση τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, αλλά εξακολουθεί να υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω βελτιστοποίηση. Η μεταφορά των θεραπευτικών RNA γίνεται επί του παρόντος με λιπίδια και νανοσωματίδια που μοιάζουν με λιπίδια, αλλά παρόλο που αυτά μπορεί να είναι κατάλληλα για παράδοση στους αεραγωγούς και το ήπαρ, άλλα όργανα-στόχοι απαιτούν εναλλακτικές στοχευμένες προσεγγίσεις. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες και η τοξικότητα φαρμάκων παραμένουν επίσης ένα ζήτημα μεταξύ των ελάχιστων εγκεκριμένων φαρμάκων αυτής της κατηγορίας: η ηπατοτοξικότητα, η τοξικότητα των νεφρών και οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας σχετίζονται με πολλά από τα εγκεκριμένα φάρμακα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα μελετών, αποτελούν πηγή πληροφοριών για την ανάπτυξη ασφαλέστερων και αποτελεσματικότερων φαρμάκων, σε αυτό που είναι σαφώς ένα πολλά υποσχόμενο νέο θεραπευτικό πεδίο και που στο μέλλον μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή φαρμάκων για έναν μεγάλο αριθμό ανίατων μέχρι σήμερα γενετικών νοσημάτων.

Βιβλιογραφία

- Aartsma-Rus, A., & Goemans, N. (2019). A Sequel to the Eteplirsen Saga: Eteplirsen Is Approved in the United States but Was Not Approved in Europe. *Nucleic acid therapeutics*, 29(1), 13–15. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0756>
- Aartsma-Rus, A., Fokkema, I., Verschuuren, J., Ginjaar, I., van Deutekom, J., van Ommen, G. J., & den Dunnen, J. T. (2009). Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human mutation*, 30(3), 293–299. <https://doi.org/10.1002/humu.20918>
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Franklin, B., Koob, J., Kellner, M. J., Ladha, A., Joung, J., Kirchgatterer, P., Cox, D. B. T., & Zhang, F. (2019). A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6451), 382–386. <https://doi.org/10.1126/science.aax7063>
- Ackermann, E. J., Guo, S., Benson, M. D., Booten, S., Freier, S., Hughes, S. G., Kim, T. W., Jesse Kwok, T., Matson, J., Norris, D., Yu, R., Watt, A., & Monia, B. P. (2016). Suppressing transthyretin production in mice, monkeys and humans using 2nd-Generation antisense oligonucleotides. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 23(3), 148–157. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1191458>
- Adachi, H., Hengesbach, M., Yu, Y. T., & Morais, P. (2021). From Antisense RNA to RNA Modification: Therapeutic Potential of RNA-Based Technologies. *Biomedicines*, 9(5), 550. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050550>
- Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O'Riordan, W. D., Yang, C. C., Ueda, M., Kristen, A. V., Tournev, I., Schmidt, H. H., Coelho, T., Berk, J. L., Lin, K. P., Vita, G., Attarian, S., Planté-Bordeneuve, V., Mezei, M. M., Campistol, J. M., Buades, J., Brannagan, T. H., 3rd, Kim, B. J., Oh, J., ... Suhr, O. B. (2018). Patisiran , an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *The New England journal of medicine*, 379(1), 11–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal716153>
- Adams, D., Tournev, I. L., Taylor, M. S., Coelho, T., Planté-Bordeneuve, V., Berk, J. L., González-Duarte, A., Gillmore, J. D., Low, S. C., Sekijima, Y., Obici, L., Chen, C., Badri, P., Arum, S. M., Vest, J., Polydefkis, M., & HELIOS-A Collaborators (2023). Efficacy and safety of Vutrisiran for patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis with polyneuropathy: a randomized clinical trial. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 30(1), 1–9. <https://doi.org/10.1080/13506129.2022.2091985>

- Allison A. C. (2009). Genetic control of resistance to human malaria. *Current opinion in immunology*, 21(5), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.04.001>
- Alnylam announces U.S. Food and Drug Administration acceptance of New Drug Application for Investigational vut.* Investor Relations | Alnylam Pharmaceuticals, Inc. (2021, June 24). <https://investors.alnylam.com/press-release?id=25811>
- Altinoglu, S., Wang, M., & Xu, Q. (2015). Combinatorial library strategies for synthesis of cationic lipid-like nanoparticles and their potential medical applications. *Nanomedicine (London, England)*, 10(4), 643–657. <https://doi.org/10.2217/nmm.14.192>
- Altmann, K. H., Fabbro, D., Dean, N. M., Geiger, T., Monia, B. P., Müller, M., & Nicklin, P. (1996). Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochemical Society transactions*, 24(3), 630–637. <https://doi.org/10.1042/bst0240630>
- Alton, E. W., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., ... & Wolstenholme-Hogg, P. (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(9), 684–691.
- Anderson, D. G., Akinc, A., Hossain, N., & Langer, R. (2005). Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters). *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 11(3), 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.11.015>
- Anderson, D. G., Lynn, D. M., & Langer, R. (2003). Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 42(27), 3153–3158. <https://doi.org/10.1002/anie.200351244>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblin, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Aoki, Y., & Wood, M. J. A. (2021). Emerging Oligonucleotide Therapeutics for Rare Neuromuscular Diseases. *Journal of neuromuscular diseases*, 8(6), 869–884. <https://doi.org/10.3233/JND-200560>
- Apgar, T. L., & Sanders, C. R. (2022). Compendium of causative genes and their encoded proteins for common monogenic disorders. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(1), 75–91. <https://doi.org/10.1002/pro.4183>

- Aquino-Jarquín G. (2020). Novel Engineered Programmable Systems for ADAR-Mediated RNA Editing. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 19, 1065–1072. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.042>
- Arruda-Olson, A. M., Zeldenrust, S. R., Dispenzieri, A., Gertz, M. A., Miller, F. A., Bielski, S. J., Klarich, K. W., Scott, C. G., & Grogan, M. (2013). Genotype, echocardiography, and survival in familial transthyretin amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 20(4), 263–268. <https://doi.org/10.3109/13506129.2013.845745>
- Balwani, M., Sardh, E., Ventura, P., Peiró, P. A., Rees, D. C., Stölzel, U., Bissell, D. M., Bonkovsky, H. L., Windyga, J., Anderson, K. E., Parker, C., Silver, S. M., Keel, S. B., Wang, J. D., Stein, P. E., Harper, P., Vassiliou, D., Wang, B., Phillips, J., Ivanova, A., ... ENVISION Investigators (2020). Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria. *The New England journal of medicine*, 382(24), 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913147>
- Bangel-Ruland, N., Tomczak, K., Fernández Fernández, E., Leier, G., Leciejewski, B., Rudolph, C., ... & Weber, W. M. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy. *The journal of gene medicine*, 15(11-12), 414-426.
- Bauer, M., Strom, M., Hammond, D. S., and Shigdar, S. (2019). Anything you can do, i can do better: can aptamers replace antibodies in clinical diagnostic applications? *Molecules*, 24:4377. <https://doi.org/10.3390/molecules24234377>
- Beam Therapeutics (2021). *Beam Therapeutics announces updated preclinical data highlighting optimized LNP delivery approaches for in vivo base editing to the liver and other tissues.* <https://investors.beamtx.com/news-releases/news-release-details/beam-therapeutics-announces-updated-preclinical-data>
- Bell, D. A., Hooper, A. J., & Burnett, J. R. (2011). Mipomersen, an antisense apolipoprotein B synthesis inhibitor. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(2), 265–272. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.547471>
- Bell, G. D., Yang, Y., Leung, E., & Krissansen, G. W. (2018). mRNA transfection by a Xentry-protamine cell-penetrating peptide is enhanced by TLR antagonist E6446. *PLoS One*, 13(7), e0201464.
- Bennett, C. F., Baker, B. F., Pham, N., Swayze, E., & Geary, R. S. (2017). Pharmacology of Antisense Drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 57, 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104846>

- Benson, M. D., Dasgupta, N. R., Rissing, S. M., Smith, J., & Feigenbaum, H. (2017). Safety and efficacy of a TTR specific antisense oligonucleotide in patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 24(4), 219–225. <https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1374946>
- Benson, M. D., Waddington-Cruz, M., Berk, J. L., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Wang, A. K., Planté-Bordeneuve, V., Barroso, F. A., Merlini, G., Obici, L., Scheinberg, M., Brannagan, T. H., 3rd, Litchy, W. J., Whelan, C., Drachman, B. M., Adams, D., Heitner, S. B., Conceição, I., Schmidt, H. H., Vita, G., ... Coelho, T. (2018). Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *The New England journal of medicine*, 379(1), 22–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716793>
- Berezhnoy, A., Stewart, C. A., Mcnamara, J. O., 2nd, Thiel, W., Giangrande, P., Trinchieri, G., & Gilboa, E. (2012). Isolation and optimization of murine IL-10 receptor blocking oligonucleotide aptamers using high-throughput sequencing. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(6), 1242–1250. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.18>
- Berntorp, E., Fischer, K., Hart, D. P., Mancuso, M. E., Stephensen, D., Shapiro, A. D., & Blanchette, V. (2021). Haemophilia. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 45. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00278-x>
- Bielinska, A. U., Kukowska-Latallo, J. F., & Baker, J. R., Jr (1997). The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1353(2), 180–190. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(97\)00069-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(97)00069-9)
- Bladen, C. L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M. E., Kekou, K., Kosma, K., Dawkins, H., Lamont, L., Roy, A. J., Chamova, T., Guerguelcheva, V., Chan, S., Korngut, L., Campbell, C., Dai, Y., Wang, J., Barišić, N., Brabec, P., Lahdetie, J., Walter, M. C., Lochmüller, H. (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human mutation*, 36(4), 395–402. <https://doi.org/10.1002/humu.22758>
- Blanchard, E. L., Vanover, D., Bawage, S. S., Tiwari, P. M., Rotolo, L., Beyersdorf, J., Peck, H. E., Bruno, N. C., Hincapie, R., Michel, F., Murray, J., Sadhwani, H., Vanderheyden, B., Finn, M. G., Brinton, M. A., Lafontaine, E. R., Hogan, R. J., Zurla, C., & Santangelo, P. J. (2021). Treatment of influenza and SARS-CoV-2 infections via mRNA-encoded Cas13a in rodents. *Nature biotechnology*, 39(6), 717–726. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00822-w>

- Borén, J., Olin, K., Lee, I., Chait, A., Wight, T. N., & Innerarity, T. L. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *The Journal of clinical investigation*, *101*(12), 2658–2664. <https://doi.org/10.1172/JCI2265>
- Brannagan, T. H., Coelho, T., Wang, A. K., Polydefkis, M. J., Dyck, P. J., Berk, J. L., Drachman, B., Gorevic, P., Whelan, C., Conceição, I., Plante-Bordeneuve, V., Merlini, G., Obici, L., Plana, J. M. C., Gamez, J., Kristen, A. V., Mazzeo, A., Gentile, L., Narayana, A., Olugemo, K., ... NEURO-T. T. R. Open-Label Extension Investigators (2022). Long-term efficacy and safety of Inotersen for hereditary transthyretin amyloidosis: NEURO-TTR open-label extension 3-year update. *Journal of neurology*, *269*(12), 6416–6427. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11276-8>
- Breunig, M., Lungwitz, U., Liebl, R., & Goepferich, A. (2007). Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(36), 14454–14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703882104>
- Caron, N. S., Southwell, A. L., Brouwers, C. C., Cengio, L. D., Xie, Y., Black, H. F., Anderson, L. M., Ko, S., Zhu, X., van Deventer, S. J., Evers, M. M., Konstantinova, P., & Hayden, M. R. (2020). Potent and sustained huntingtin lowering via AAV5 encoding miRNA preserves striatal volume and cognitive function in a humanized mouse model of Huntington disease. *Nucleic acids research*, *48*(1), 36–54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz976>
- Cartegni, L., & Krainer, A. R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nature genetics*, *30*(4), 377–384. <https://doi.org/10.1038/ng854>
- Chen, F., Alphonse, M., & Liu, Q. (2020). Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, *12*(3), e1609. <https://doi.org/10.1002/wnan.1609>
- Cheng, C. J., Tietjen, G. T., Saucier-Sawyer, J. K., & Saltzman, W. M. (2015). A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nature reviews. Drug discovery*, *14*(4), 239–247. <https://doi.org/10.1038/nrd4503>
- Cheng, Q., Wei, T., Farbiak, L., Johnson, L. T., Dilliard, S. A., & Siegwart, D. J. (2020). Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nature nanotechnology*, *15*(4), 313–320. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0669-6>

- Choi, J., Rui, Y., Kim, J., Gorelick, N., Wilson, D. R., Kozielski, K., Mangraviti, A., Sankey, E., Brem, H., Tyler, B., Green, J. J., & Jackson, E. M. (2020). Nonviral polymeric nanoparticles for gene therapy in pediatric CNS malignancies. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 23, 102115. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102115>
- Clarke, L. A., & Amaral, M. D. (2023). What Can RNA-Based Therapy Do for Monogenic Diseases?. *Pharmaceutics*, 15(1), 260. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010260>
- Clemens, P. R., Rao, V. K., Connolly, A. M., Harper, A. D., Mah, J. K., Smith, E. C., McDonald, C. M., Zaidman, C. M., Morgenroth, L. P., Osaki, H., Satou, Y., Yamashita, T., Hoffman, E. P., & CINRG DNHS Investigators (2020). Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA neurology*, 77(8), 982–991. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1264>
- Coelho, T., Adams, D., Silva, A., Lozeron, P., Hawkins, P. N., Mant, T., Perez, J., Chiesa, J., Warrington, S., Tranter, E., Munisamy, M., Falzone, R., Harrop, J., Cehelsky, J., Bettencourt, B. R., Geissler, M., Butler, J. S., Sehgal, A., Meyers, R. E., Chen, Q., ... Suhr, O. B. (2013). Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *The New England journal of medicine*, 369(9), 819–829. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208760>
- Coelho, T., Maurer, M. S., & Suhr, O. B. (2013). THAOS - The Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey: initial report on clinical manifestations in patients with hereditary and wild-type transthyretin amyloidosis. *Current medical research and opinion*, 29(1), 63–76. <https://doi.org/10.1185/03007995.2012.754348>
- Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6366), 1019–1027. <https://doi.org/10.1126/science.aag0180>
- Cox, D. B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358(6366), 1019-1027.
- Crooke S. T. (2017). Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic acid therapeutics*, 27(2), 70–77. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0656>
- Crucho, C. I. C., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 80, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>
- Cuchel, M., Meagher, E. A., du Toit Theron, H., Blom, D. J., Marais, A. D., Hegele, R. A., Averna, M. R., Sirtori, C. R., Shah, P. K., Gaudet, D., Stefanutti, C., Vigna, G. B., Du Plessis, A. M., Probert, K. J., Sasiela, W. J., Bloedon, L. T., Rader, D. J., & Phase 3 HoFH Lomitapide

- Study investigators (2013). Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*, *381*(9860), 40–46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61731-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61731-0)
- Cutting, G. R. (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics*, *16*(1), 45-56.
- Da Silva Sanchez, A., Paunovska, K., Cristian, A., & Dahlman, J. E. (2020). Treating Cystic Fibrosis with mRNA and CRISPR. *Human gene therapy*, *31*(17-18), 940–955. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.137>
- Dabrowska, M., Juzwa, W., Krzyzosiak, W. J., & Olejniczak, M. (2018). Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by Cas9 Nickases. *Frontiers in neuroscience*, *12*, 75. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00075>
- Dahlman, J. E., Barnes, C., Khan, O., Thiriot, A., Jhunjunwala, S., Shaw, T. E., Xing, Y., Sager, H. B., Sahay, G., Speciner, L., Bader, A., Bogorad, R. L., Yin, H., Racie, T., Dong, Y., Jiang, S., Seedorf, D., Dave, A., Sandu, K. S., Webber, M. J., ... Anderson, D. G. (2014). In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nature nanotechnology*, *9*(8), 648–655. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.84>
- Dale, E., Frank-Kamenetsky, M., Taborn, K., Aklilu, K., Liu, Y., Berkovitch, S., ... & Vargeese, C. (2020). Stereopure oligonucleotides for the selective silencing of mutant Huntingtin (4703).
- D'Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F. D., & Bertini, E. (2011). Spinal muscular atrophy. *Orphanet journal of rare diseases*, *6*, 71. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-71>
- Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Iannaccone, S. T., Swoboda, K. J., Montes, J., Mignon, L., Xia, S., Bennett, C. F., Bishop, K. M., Shefner, J. M., Green, A. M., Sun, P., Bhan, I., Gheuens, S., Schneider, E., Farwell, W., De Vivo, D. C., & ISIS-396443-CS2/ISIS-396443-CS12 Study Groups (2019). Nusinersen in later-onset spinal muscular atrophy: Long-term results from the phase 1/2 studies. *Neurology*, *92*(21), e2492–e2506. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007527>
- Dasgupta, N. R., Rissing, S. M., Smith, J., Jung, J., & Benson, M. D. (2020). Inotersen therapy of transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, *27*(1), 52–58. <https://doi.org/10.1080/13506129.2019.1685487>
- Datson, N. A., González-Barriga, A., Kourkouta, E., Weij, R., van de Giessen, J., Mulders, S., Kontkanen, O., Heikkinen, T., Lehtimäki, K., & van Deutekom, J. C. (2017). The expanded

CAG repeat in the huntingtin gene as target for therapeutic RNA modulation throughout the HD mouse brain. *PLoS one*, 12(2), e0171127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171127>

De Boeck K. (2020). Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 109(5), 893–899. <https://doi.org/10.1111/apa.15155>

De Vivo, D. C., Bertini, E., Swoboda, K. J., Hwu, W. L., Crawford, T. O., Finkel, R. S., Kirschner, J., Kuntz, N. L., Parsons, J. A., Ryan, M. M., Butterfield, R. J., Topaloglu, H., Ben-Omran, T., Sansone, V. A., Jong, Y. J., Shu, F., Staropoli, J. F., Kerr, D., Sandrock, A. W., Stebbins, C., ... NURTURE Study Group (2019). Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscular disorders : NMD*, 29(11), 842–856. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.09.007>

Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., & Bahal, R. (2020). Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *Journal of clinical medicine*, 9(6), 2004. <https://doi.org/10.3390/jcm9062004>

Dollins, C. M., Nair, S., Boczkowski, D., Lee, J., Layzer, J. M., Gilboa, E., & Sullenger, B. A. (2008). Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chemistry & biology*, 15(7), 675–682. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.016>

Dong, Y., Love, K. T., Dorkin, J. R., Sirirungruang, S., Zhang, Y., Chen, D., Bogorad, R. L., Yin, H., Chen, Y., Vegas, A. J., Alabi, C. A., Sahay, G., Olejnik, K. T., Wang, W., Schroeder, A., Lytton-Jean, A. K., Siegwart, D. J., Akinc, A., Barnes, C., Barros, S. A., ... Anderson, D. G. (2014). Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 3955–3960. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322937111>

Dowling, J. J., Weihl, C. C., & Spencer, M. J. (2021). Molecular and cellular basis of genetically inherited skeletal muscle disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(11), 713–732.

Duan D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(10), 2337–2356. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.011>

Duell, P. B., Santos, R. D., Kirwan, B. A., Witztum, J. L., Tsimikas, S., & Kastelein, J. J. P. (2016). Long-term Mipomersen treatment is associated with a reduction in cardiovascular events in patients with familial hypercholesterolemia. *Journal of clinical lipidology*, 10(4), 1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.04.013>

Dzierlega, K., & Yokota, T. (2020). Optimization of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Gene therapy*, 27(9), 407–416. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0156-6>

Echigoya, Y., Lim, K. R. Q., Trieu, N., Bao, B., Miskew Nichols, B., Vila, M. C., Novak, J. S., Hara, Y., Lee, J., Touznik, A., Mamchaoui, K., Aoki, Y., Takeda, S., Nagaraju, K., Mouly, V., Maruyama, R., Duddy, W., & Yokota, T. (2017). Quantitative Antisense Screening and Optimization for Exon 51 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(11), 2561–2572. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.014>

Editas Medicine (2020). *Allergan and Editas medicine announce dosing of first patient in landmark phase 1/2 clinical trial of CRISPR medicine AGN-151587 (edit-101) for the treatment of LCA10.* <https://ir.editasmedicine.com/news-releases/news-release-details/allergan-and-editas-medicine-announce-dosing-first-patient>

Ekman, F. K., Ojala, D. S., Adil, M. M., Lopez, P. A., Schaffer, D. V., & Gaj, T. (2019). CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing Increases Lifespan and Improves Motor Deficits in a Huntington's Disease Mouse Model. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 17, 829–839. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.009>

Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>

Evers, M. M., & Konstantinova, P. (2020). AAV5-miHTT gene therapy for Huntington disease: lowering both huntingtins. *Expert opinion on biological therapy*, 20(10), 1121–1124. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1792880>

Evers, M. M., Miniarikova, J., Juhas, S., Vallès, A., Bohuslavova, B., Juhasova, J., Skalnikova, H. K., Vodicka, P., Valekova, I., Brouwers, C., Blits, B., Lubelski, J., Kovarova, H., Ellederova, Z., van Deventer, S. J., Petry, H., Motlik, J., & Konstantinova, P. (2018). AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(9), 2163–2177. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.06.021>

Evers, M. M., Pepers, B. A., van Deutekom, J. C., Mulders, S. A., den Dunnen, J. T., Aartsma-Rus, A., van Ommen, G. J., & van Roon-Mom, W. M. (2011). Targeting several CAG expansion diseases by a single antisense oligonucleotide. *PloS one*, 6(9), e24308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024308>

- Evers, M. M., Toonen, L. J., & van Roon-Mom, W. M. (2015). Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.008>
- Evers, M. M., Tran, H. D., Zalachoras, I., Meijer, O. C., den Dunnen, J. T., van Ommen, G. J., Aartsma-Rus, A., & van Roon-Mom, W. M. (2014). Preventing formation of toxic N-terminal huntingtin fragments through antisense oligonucleotide-mediated protein modification. *Nucleic acid therapeutics*, 24(1), 4–12. <https://doi.org/10.1089/nat.2013.0452>
- Ewe, A., Höbel, S., Heine, C., Merz, L., Kallendrusch, S., Bechmann, I., Merz, F., Franke, H., & Aigner, A. (2017). Optimized polyethylenimine (PEI)-based nanoparticles for siRNA delivery, analyzed in vitro and in an ex vivo tumor tissue slice culture model. *Drug delivery and translational research*, 7(2), 206–216. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0306-y>
- Eygeris, Y., Patel, S., Jozic, A., & Sahay, G. (2020). Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery. *Nano letters*, 20(6), 4543–4549. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386>
- FDA (2016). FDA grants accelerated approval to first drug for Duchenne muscular dystrophy. *FDA Med Bull.* <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm521263.htm>.
- FDA (2019). FDA grants accelerated approval to first targeted treatment for rare Duchenne muscular dystrophy mutation. 2019-12-12)[2020-04-26]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grantsaccelerated-approval-new-treatment-advanced-ovarian-cancer>.
- FDA (2020). FDA approves targeted treatment for rare Duchenne muscular dystrophy mutation.
- FDA (2021). FDA Approves Targeted Treatment for Rare Duchenne Muscular Dystrophy Mutation. 2021.
- Ferguson, M. W., Kennedy, C. J., Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., & Kwakowsky, A. (2022). Current and Possible Future Therapeutic Options for Huntington's Disease. *Journal of central nervous system disease*, 14, 11795735221092517. <https://doi.org/10.1177/11795735221092517>
- Finkel, R. S., Chiriboga, C. A., Vajsar, J., Day, J. W., Montes, J., De Vivo, D. C., Yamashita, M., Rigo, F., Hung, G., Schneider, E., Norris, D. A., Xia, S., Bennett, C. F., & Bishop, K. M. (2016). Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with Nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet (London, England)*, 388(10063), 3017–3026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31408-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31408-8)

Finkel, R. S., Mercuri, E., Darras, B. T., Connolly, A. M., Kuntz, N. L., Kirschner, J., Chiriboga, C. A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., Topaloglu, H., Tulinius, M., Montes, J., Glanzman, A. M., Bishop, K., Zhong, Z. J., Gheuens, S., Bennett, C. F., Schneider, E., Farwell, W., ... ENDEAR Study Group (2017). Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England journal of medicine*, 377(18), 1723–1732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>

Finn, J. D., Smith, A. R., Patel, M. C., Shaw, L., Youniss, M. R., van Heteren, J., Dirstine, T., Ciullo, C., Lescarbeau, R., Seitzer, J., Shah, R. R., Shah, A., Ling, D., Growe, J., Pink, M., Rohde, E., Wood, K. M., Salomon, W. E., Harrington, W. F., Dombrowski, C., ... Morrissey, D. V. (2018). A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell reports*, 22(9), 2227–2235. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.014>

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>

Fontana, M., Ćorović, A., Scully, P., & Moon, J. C. (2019). Myocardial Amyloidosis: The Exemplar Interstitial Disease. *JACC. Cardiovascular imaging*, 12(11 Pt 2), 2345–2356. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.06.023>

Fontana, M., Martinez-Naharro, A., Chacko, L., Rowczenio, D., Gilbertson, J. A., Whelan, C. J., Strehina, S., Lane, T., Moon, J., Hutt, D. F., Kellman, P., Petrie, A., Hawkins, P. N., & Gillmore, J. D. (2021). Reduction in CMR Derived Extracellular Volume With Patisiran Indicates Cardiac Amyloid Regression. *JACC. Cardiovascular imaging*, 14(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2020.07.043>

Franich, N. R., Fitzsimons, H. L., Fong, D. M., Klugmann, M., During, M. J., & Young, D. (2008). AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(5), 947–956. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.50>

Frank, D. E., Schnell, F. J., Akana, C., El-Husayni, S. H., Desjardins, C. A., Morgan, J., Charleston, J. S., Sardone, V., Domingos, J., Dickson, G., Straub, V., Guglieri, M., Mercuri, E., Servais, L., Muntoni, F., & SKIP-NMD Study Group (2020). Increased dystrophin production with Golodirsén in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 94(21), e2270–e2282. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009233>

Gao, X., Yao, L., Song, Q., Zhu, L., Xia, Z., Xia, H., Jiang, X., Chen, J., & Chen, H. (2011). The association of autophagy with polyethylenimine-induced cytotoxicity in nephritic and

hepatic cell lines. *Biomaterials*, 32(33), 8613–8625.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.047>

Garcia, S. M., Tamaki, S., Lee, S., Wong, A., Jose, A., Dreux, J., ... & Pomerantz, J. H. (2018). High-yield purification, preservation, and serial transplantation of human satellite cells. *Stem Cell Reports*, 10(3), 1160-1174.

Garrelfs, S. F., Frishberg, Y., Hulton, S. A., Koren, M. J., O'Riordan, W. D., Cochat, P., Deschênes, G., Shasha-Lavsky, H., Saland, J. M., Van't Hoff, W. G., Fuster, D. G., Magen, D., Moochhala, S. H., Schalk, G., Simkova, E., Groothoff, J. W., Sas, D. J., Meliambro, K. A., Lu, J., Sweetser, M. T., ... ILLUMINATE-A Collaborators (2021). Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1. *The New England journal of medicine*, 384(13), 1216–1226. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021712>

Geller, H. I., Singh, A., Alexander, K. M., Mirto, T. M., & Falk, R. H. (2017). Association Between Ruptured Distal Biceps Tendon and Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *JAMA*, 318(10), 962–963. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.9236>

Ghilan, M., Bostrom, C. A., Hryciw, B. N., Simpson, J. M., Christie, B. R., & Gil-Mohapel, J. (2014). YAC128 Huntington's disease transgenic mice show enhanced short-term hippocampal synaptic plasticity early in the course of the disease. *Brain research*, 1581, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.06.011>

Gidaro, T., & Servais, L. (2019). Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Developmental medicine and child neurology*, 61(1), 19–24. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14027>

Gidding, S. S., Champagne, M. A., de Ferranti, S. D., Defesche, J., Ito, M. K., Knowles, J. W., McCrindle, B., Raal, F., Rader, D., Santos, R. D., Lopes-Virella, M., Watts, G. F., Wierzbicki, A. S., & American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Young Committee of Council on Cardiovascular Disease in Young, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Functional Genomics and Translational Biology, and Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health (2015). The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 132(22), 2167–2192. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000297>

Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>

Gillmore, J. D., Gane, E., Taubel, J., Kao, J., Fontana, M., Maitland, M. L., Seitzer, J., O'Connell, D., Walsh, K. R., Wood, K., Phillips, J., Xu, Y., Amaral, A., Boyd, A. P., Cehelsky, J. E., McKee, M. D., Schiermeier, A., Harari, O., Murphy, A., Kyratsous, C. A., ... Lebowitz, D. (2021). CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *The New England journal of medicine*, 385(6), 493–502. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107454>

González-Duarte, A., Berk, J. L., Quan, D., Mauermann, M. L., Schmidt, H. H., Polydefkis, M., Waddington-Cruz, M., Ueda, M., Conceição, I. M., Kristen, A. V., Coelho, T., Cauquil, C. A., Tard, C., Merkel, M., Aldinc, E., Chen, J., Sweetser, M. T., Wang, J. J., & Adams, D. (2020). Analysis of autonomic outcomes in APOLLO, a phase III trial of the RNAi therapeutic Patisiran in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Journal of neurology*, 267(3), 703–712. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09602-8>

Green, J. J., Langer, R., & Anderson, D. G. (2008). A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery. *Accounts of chemical research*, 41(6), 749–759. <https://doi.org/10.1021/ar7002336>

Griffiths, A. J. F., Doebley, J. F., Peichel, C. L., & Wassarman, D. A. (2020). 2: Single-Gene Inheritance. In *Introduction to genetic analysis* (10th ed.). essay, W.H. Freeman & Company/Macmillan Learning.

Habtemariam, B. A., Karsten, V., Attarwala, H., Goel, V., Melch, M., Clausen, V. A., Garg, P., Vaishnav, A. K., Sweetser, M. T., Robbie, G. J., & Vest, J. (2021). Single-Dose Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Transthyretin Targeting N-acetylgalactosamine-Small Interfering Ribonucleic Acid Conjugate, Vutrisiran, in Healthy Subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 109(2), 372–382. <https://doi.org/10.1002/cpt.1974>

Hagenacker, T., Wurster, C. D., Günther, R., Schreiber-Katz, O., Osmanovic, A., Petri, S., Weiler, M., Ziegler, A., Kuttler, J., Koch, J. C., Schneider, I., Wunderlich, G., Schloss, N., Lehmann, H. C., Cordts, I., Deschauer, M., Lingor, P., Kamm, C., Stolte, B., Pietruck, L., ... Kleinschnitz, C. (2020). Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy: a non-interventional, multicentre, observational cohort study. *The Lancet. Neurology*, 19(4), 317–325. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30037-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30037-5)

Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E., Hazlett, H. C., Bailey, D. B., Jr, Moine, H., Kooy, R. F., Tassone, F., Gantois, I., Sonenberg, N., Mandel, J. L., & Hagerman, P. J. (2017). Fragile X syndrome. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.65>

Hamilton, G., & Gillingwater, T. H. (2013). Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. *Trends in molecular medicine*, 19(1), 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.11.002>

Hanlon, K. S., Kleinstiver, B. P., Garcia, S. P., Zaborowski, M. P., Volak, A., Spirig, S. E., Muller, A., Sousa, A. A., Tsai, S. Q., Bengtsson, N. E., Lööv, C., Ingelsson, M., Chamberlain, J. S., Corey, D. P., Aryee, M. J., Joung, J. K., Breakefield, X. O., Maguire, C. A., & György, B. (2019). High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nature communications*, *10*(1), 4439. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12449-2>

Hanson, B., Wood, M. J. A., & Roberts, T. C. (2021). Molecular correction of Duchenne muscular dystrophy by splice modulation and gene editing. *RNA biology*, *18*(7), 1048–1062. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1874161>

Harper, S. Q., Staber, P. D., He, X., Eliason, S. L., Martins, I. H., Mao, Q., Yang, L., Kotin, R. M., Paulson, H. L., & Davidson, B. L. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(16), 5820–5825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501507102>

Herrera, M., Kim, J., Eygeris, Y., Jozic, A., & Sahay, G. (2021). Illuminating endosomal escape of polymorphic lipid nanoparticles that boost mRNA delivery. *Biomaterials science*, *9*(12), 4289–4300. <https://doi.org/10.1039/d0bm01947j>

Hersch, S., Claassen, D., Edmondson, M., Wild, E., Guercioli, R., & Panzara, M. (2017). Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1b/2a studies of WVE-120101 and WVE-120102 in patients with Huntington's disease (P2. 006).

Hoffner, G., & Djian, P. (2002). Protein aggregation in Huntington's disease. *Biochimie*, *84*(4), 273–278. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01398-6](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01398-6)

Hu, P., Dharmayat, K. I., Stevens, C. A. T., Sharabiani, M. T. A., Jones, R. S., Watts, G. F., Genest, J., Ray, K. K., & Vallejo-Vaz, A. J. (2020). Prevalence of Familial Hypercholesterolemia Among the General Population and Patients With Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation*, *141*(22), 1742–1759. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044795>

Hua, Y., Sahashi, K., Hung, G., Rigo, F., Passini, M. A., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2010). Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes & development*, *24*(15), 1634–1644. <https://doi.org/10.1101/gad.1941310>

Hua, Y., Vickers, T. A., Baker, B. F., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2007). Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS biology*, *5*(4), e73. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050073>

Hua, Y., Vickers, T. A., Okunola, H. L., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2008). Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic

mice. *American journal of human genetics*, 82(4), 834–848.

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.01.014>

Humphreys, S. C., Thayer, M. B., Campbell, J., Chen, W. L. K., Adams, D., Lade, J. M., & Rock, B. M. (2020). Emerging siRNA Design Principles and Consequences for Biotransformation and Disposition in Drug Development. *Journal of medicinal chemistry*, 63(12), 6407–6422. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01839>

Intellia Therapeutics (2021). *Intellia Therapeutics presents preclinical proof of concept for CRISPR-based in vivo editing of bone marrow at Keystone eSymposium*. <https://ir.intelliatx.com/news-releases/news-release-details/intellia-therapeutics-presents-preclinical-proof-concept-crispr>

Ioannou, A., Fontana, M., & Gillmore, J. D. (2023b). RNA Targeting and Gene Editing Strategies for Transthyretin Amyloidosis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 37(2), 127–142. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00577-7>

Ioannou, A., Patel, R. K., Razvi, Y., Porcari, A., Knight, D., Martinez-Naharro, A., Kotecha, T., Venneri, L., Chacko, L., Brown, J., Manisty, C., Moon, J., Wisniowski, B., Lachmann, H., Wechelakar, A., Whelan, C., Kellman, P., Hawkins, P. N., Gillmore, J. D., & Fontana, M. (2023a). Multi-Imaging Characterization of Cardiac Phenotype in Different Types of Amyloidosis. *JACC. Cardiovascular imaging*, 16(4), 464–477. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2022.07.008>

Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., & Ninham, B. W. (1977). Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochimica et biophysica acta*, 470(2), 185–201. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90099-2)

Iveta Merćep, Nikolina Friščić, Dominik Strikić, Željko Reiner, "Advantages and Disadvantages of Inclisiran: A Small Interfering Ribonucleic Acid Molecule Targeting PCSK9—A Narrative Review", *Cardiovascular Therapeutics*, vol. 2022, Article ID 8129513, 6 pages, 2022.

<https://doi.org/10.1155/2022/8129513>

Jayaraman, M., Ansell, S. M., Mui, B. L., Tam, Y. K., Chen, J., Du, X., Butler, D., Eltepu, L., Matsuda, S., Narayanannair, J. K., Rajeev, K. G., Hafez, I. M., Akinc, A., Maier, M. A., Tracy, M. A., Cullis, P. R., Madden, T. D., Manoharan, M., & Hope, M. J. (2012). Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 51(34), 8529–8533. <https://doi.org/10.1002/anie.201203263>

- Jiang, C., Mei, M., Li, B., Zhu, X., Zu, W., Tian, Y., Wang, Q., Guo, Y., Dong, Y., & Tan, X. (2017). A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. *Cell research*, 27(3), 440–443. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.16>
- Jiang, L., Wang, L. Y., & Cheng, X. S. (2018). Novel Approaches for the Treatment of Familial Hypercholesterolemia: Current Status and Future Challenges. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 25(8), 665–673. <https://doi.org/10.5551/jat.43372>
- Jing Pang, Dick C. Chan, Gerald F. Watt (2020). The Knows and Unknowns of Contemporary Statin Therapy for Familial Hypercholesterolemia. *Current Atherosclerosis Reports*.2020; 22(11): 64. <https://doi.org/10.1007/s11883-020-00884-2>
- Juan-Mateu, J., Gonzalez-Quereda, L., Rodriguez, M. J., Baena, M., Verdura, E., Nascimento, A., Ortez, C., Baiget, M., & Gallano, P. (2015). DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations. *PloS one*, 10(8), e0135189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135189>
- Kaczmarek, J. C., Patel, A. K., Kauffman, K. J., Fenton, O. S., Webber, M. J., Heartlein, M. W., DeRosa, F., & Anderson, D. G. (2016). Polymer-Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of mRNA to the Lungs. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 55(44), 13808–13812. <https://doi.org/10.1002/anie.201608450>
- Kaemmerer, W. F., & Grondin, R. C. (2019). The effects of huntingtin-lowering: what do we know so far?. *Degenerative neurological and neuromuscular disease*, 9, 3–17. <https://doi.org/10.2147/DNND.S163808>
- Karijolich, J., & Yu, Y. T. (2011). Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature*, 474(7351), 395-398.
- Kashima, T., & Manley, J. L. (2003). A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature genetics*, 34(4), 460–463. <https://doi.org/10.1038/ng1207>
- Katrekar, D., Chen, G., Meluzzi, D., Ganesh, A., Worlikar, A., Shih, Y. R., Varghese, S., & Mali, P. (2019). In vivo RNA editing of point mutations via RNA-guided adenosine deaminases. *Nature methods*, 16(3), 239–242. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0323-0>
- Kauffman, K. J., Dorkin, J. R., Yang, J. H., Heartlein, M. W., DeRosa, F., Mir, F. F., Fenton, O. S., & Anderson, D. G. (2015). Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano letters*, 15(11), 7300–7306. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02497>
- Kauffman, K. J., Oberli, M. A., Dorkin, J. R., Hurtado, J. E., Kaczmarek, J. C., Bhadani, S., Wyckoff, J., Langer, R., Jaklenec, A., & Anderson, D. G. (2018). Rapid, Single-Cell Analysis

- and Discovery of Vected mRNA Transfection In Vivo with a loxP-Flanked tdTomato Reporter Mouse. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 10, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.11.005>
- Kaur, H., Bruno, J. G., Kumar, A., & Sharma, T. K. (2018). Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics*, 8(15), 4016–4032. <https://doi.org/10.7150/thno.25958>
- Ke, X., Shelton, L., Hu, Y., Zhu, Y., Chow, E., Tang, H., Santos, J. L., & Mao, H. Q. (2020). Surface-Functionalized PEGylated Nanoparticles Deliver Messenger RNA to Pulmonary Immune Cells. *ACS applied materials & interfaces*, 12(32), 35835–35844. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c08268>
- Keam S. J. (2018). Inotersen: First Global Approval. *Drugs*, 78(13), 1371–1376. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0968-5>
- Keam S. J. (2022). Vutrisiran: First Approval. *Drugs*, 82(13), 1419–1425. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01765-5>
- Keskin, S., Brouwers, C. C., Sogorb-Gonzalez, M., Martier, R., Depla, J. A., Vallès, A., van Deventer, S. J., Konstantinova, P., & Evers, M. M. (2019). AAV5-miHTT Lowers Huntingtin mRNA and Protein without Off-Target Effects in Patient-Derived Neuronal Cultures and Astrocytes. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 15, 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.010>
- Khan, O. F., Kowalski, P. S., Doloff, J. C., Tsosie, J. K., Bakthavatchalu, V., Winn, C. B., Haupt, J., Jamiel, M., Langer, R., & Anderson, D. G. (2018). Endothelial siRNA delivery in nonhuman primates using ionizable low-molecular weight polymeric nanoparticles. *Science advances*, 4(6), eaar8409. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar8409>
- Kilanowska, A., & Studzińska, S. (2020). *In vivo* and *in vitro* studies of antisense oligonucleotides - a review. *RSC advances*, 10(57), 34501–34516. <https://doi.org/10.1039/d0ra04978f>
- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P., Li, Z., Peterson, R. T., Yeh, J. R., Aryee, M. J., & Joung, J. K. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523(7561), 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature14592>
- Kole, R., & Krieg, A. M. (2015). Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.008>

- Kolonko, A. K., Efung, J., González-Espinosa, Y., Bangel-Ruland, N., van Driessche, W., Goycoolea, F. M., & Weber, W. M. (2020). Capsaicin-loaded chitosan nanocapsules for wtCFTR-mRNA delivery to a cystic fibrosis cell line. *Biomedicines*, *8*(9), 364.
- Komaki, H., Nagata, T., Saito, T., Masuda, S., Takeshita, E., Sasaki, M., Tachimori, H., Nakamura, H., Aoki, Y., & Takeda, S. (2018). Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Science translational medicine*, *10*(437), eaan0713. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan0713>
- Kordasiewicz, H. B., Stanek, L. M., Wancewicz, E. V., Mazur, C., McAlonis, M. M., Pytel, K. A., Artates, J. W., Weiss, A., Cheng, S. H., Shihabuddin, L. S., Hung, G., Bennett, C. F., & Cleveland, D. W. (2012). Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron*, *74*(6), 1031–1044. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.009>
- Kozielski, K. L., Ruiz-Valls, A., Tzeng, S. Y., Guerrero-Cázares, H., Rui, Y., Li, Y., Vaughan, H. J., Gionet-Gonzales, M., Vantucci, C., Kim, J., Schiapparelli, P., Al-Kharboosh, R., Quiñones-Hinojosa, A., & Green, J. J. (2019). Cancer-selective nanoparticles for combinatorial siRNA delivery to primary human GBM in vitro and in vivo. *Biomaterials*, *209*, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.020>
- Krienke, C., Kolb, L., Diken, E., Streuber, M., Kirchhoff, S., Bukur, T., Akilli-Öztürk, Ö., Kranz, L. M., Berger, H., Petschenka, J., Diken, M., Kreiter, S., Yogev, N., Waisman, A., Karikó, K., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2021). A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science (New York, N.Y.)*, *371*(6525), 145–153. <https://doi.org/10.1126/science.aay3638>
- Kulkarni, J. A., Cullis, P. R., & van der Meel, R. (2018). Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic acid therapeutics*, *28*(3), 146–157. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0721>
- Kulkarni, J. A., Darjuan, M. M., Mercer, J. E., Chen, S., van der Meel, R., Thewalt, J. L., Tam, Y. Y. C., & Cullis, P. R. (2018). On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. *ACS nano*, *12*(5), 4787–4795. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01516>
- Legius, E., Messiaen, L., Wolkenstein, P., Pancza, P., Avery, R. A., Berman, Y., Blakeley, J., Babovic-Vuksanovic, D., Cunha, K. S., Ferner, R., Fisher, M. J., Friedman, J. M., Gutmann, D. H., Kehrer-Sawatzki, H., Korf, B. R., Mautner, V. F., Peltonen, S., Rauen, K. A., Riccardi, V., Schorry, E., ... Plotkin, S. R. (2021). Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1

and Legius syndrome: an international consensus recommendation. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 23(8), 1506–1513. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01170-5>

Li, J. Y., Popovic, N., & Brundin, P. (2005). The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(3), 447–464. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.447>

Li, N., Li, Q., Tian, X. Q., Qian, H. Y., & Yang, Y. J. (2014). Mipomersen is a promising therapy in the management of hypercholesterolemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*, 14(5), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s40256-014-0077-0>

Lim, K. H., Han, Z., Jeon, H. Y., Kach, J., Jing, E., Weyn-Vanhentenryck, S., Downs, M., Corriero, A., Oh, R., Scharner, J., Venkatesh, A., Ji, S., Liao, G., Ticho, B., Nash, H., & Aznarez, I. (2020). Antisense oligonucleotide modulation of non-productive alternative splicing upregulates gene expression. *Nature communications*, 11(1), 3501. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17093-9>

Lim, K. R. Q., Maruyama, R., & Yokota, T. (2017). Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug design, development and therapy*, 533-545.

Lim, K. R., Maruyama, R., & Yokota, T. (2017). Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug design, development and therapy*, 11, 533–545. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97635>

Lincoff, A. M., Mehran, R., Pocsic, T. J., Zelenkofske, S. L., Huang, Z., Armstrong, P. W., Steg, P. G., Bode, C., Cohen, M. G., Buller, C., Laanmets, P., Valgimigli, M., Marandi, T., Fridrich, V., Cantor, W. J., Merkely, B., Lopez-Sendon, J., Cornel, J. H., Kasprzak, J. D., Aschermann, M., ... REGULATE-PCI Investigators (2016). Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): a randomised clinical trial. *Lancet (London, England)*, 387(10016), 349–356. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00515-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00515-2)

Lokugamage, M. P., Vanover, D., Beyersdorf, J., Hatit, M. Z. C., Rotolo, L., Echeverri, E. S., Peck, H. E., Ni, H., Yoon, J. K., Kim, Y., Santangelo, P. J., & Dahlman, J. E. (2021). Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. *Nature biomedical engineering*, 5(9), 1059–1068. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00786-x>

- Love, K. T., Mahon, K. P., Levins, C. G., Whitehead, K. A., Querbes, W., Dorkin, J. R., Qin, J., Cantley, W., Qin, L. L., Racie, T., Frank-Kamenetsky, M., Yip, K. N., Alvarez, R., Sah, D. W., de Fougères, A., Fitzgerald, K., Koteliensky, V., Akinc, A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2010). Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(5), 1864–1869. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910603106>
- Lozano, T., Soldevilla, M. M., Casares, N., Villanueva, H., Bendandi, M., Lasarte, J. J., et al. (2016). Targeting inhibition of Foxp3 by a CD28 20 -Fluro oligonucleotide aptamer conjugated to P60-peptide enhances active cancer immunotherapy. *Biomaterials*, *91*, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.007>
- Lueck, J. D., Yoon, J. S., Perales-Puchalt, A., Mackey, A. L., Infield, D. T., Behlke, M. A., ... & Ahern, C. A. (2019). Engineered transfer RNAs for suppression of premature termination codons. *Nature communications*, *10*(1), 822. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08329-4>
- Maggi, L., Bello, L., Bonanno, S., Govoni, A., Caponnetto, C., Passamano, L., Grandis, M., Trojsi, F., Cerri, F., Ferraro, M., Bozzoni, V., Caumo, L., Piras, R., Tanel, R., Saccani, E., Meneri, M., Vacchiano, V., Ricci, G., Soraru', G., D'Errico, E., ... Pegoraro, E. (2020). Nusinersen safety and effects on motor function in adult spinal muscular atrophy type 2 and 3. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *91*(11), 1166–1174. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323822>
- Manzur, A. Y., Kuntzer, T., Pike, M., & Swan, A. V. (2008). Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane database of systematic reviews*, (1).
- Marxreiter, F., Stemick, J., & Kohl, Z. (2020). Huntingtin Lowering Strategies. *International journal of molecular sciences*, *21*(6), 2146. <https://doi.org/10.3390/ijms21062146>
- Mastorakos, P., da Silva, A. L., Chisholm, J., Song, E., Choi, W. K., Boyle, M. P., Morales, M. M., Hanes, J., & Suk, J. S. (2015). Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(28), 8720–8725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502281112>
- McBride, J. L., Pitzer, M. R., Boudreau, R. L., Dufour, B., Hobbs, T., Ojeda, S. R., & Davidson, B. L. (2011). Preclinical safety of RNAi-mediated HTT suppression in the rhesus macaque as a potential therapy for Huntington's disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *19*(12), 2152–2162. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.219>

Menalled, L. B., Kudwa, A. E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., Ruiz, M., Mushlin, R., Alosio, W., McConnell, K., Connor, D., Murphy, C., Oakeshott, S., Kwan, M., Beltran, J., Ghavami, A., Brunner, D., Park, L. C., Ramboz, S., & Howland, D. (2012). Comprehensive behavioral and molecular characterization of a new knock-in mouse model of Huntington's disease: zQ175. *PloS one*, 7(12), e49838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049838>

Mendell, J. R., Goemans, N., Lowes, L. P., Alfano, L. N., Berry, K., Shao, J., Kaye, E. M., Mercuri, E., & Eteplirsen Study Group and Telethon Foundation DMD Italian Network (2016). Longitudinal effect of Eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology*, 79(2), 257–271. <https://doi.org/10.1002/ana.24555>

Mendell, J. R., Rodino-Klapac, L. R., Sahenk, Z., Roush, K., Bird, L., Lowes, L. P., Alfano, L., Gomez, A. M., Lewis, S., Kota, J., Malik, V., Shontz, K., Walker, C. M., Flanigan, K. M., Corridore, M., Kean, J. R., Allen, H. D., Shilling, C., Melia, K. R., Sazani, P., ... Eteplirsen Study Group (2013). Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology*, 74(5), 637–647. <https://doi.org/10.1002/ana.23982>

Mercuri, E., Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Day, J. W., Campbell, C., Connolly, A. M., Iannaccone, S. T., Kirschner, J., Kuntz, N. L., Saito, K., Shieh, P. B., Tulinius, M., Mazzone, E. S., Montes, J., Bishop, K. M., Yang, Q., Foster, R., Gheuens, S., Bennett, C. F., Farwell, W., ... CHERISH Study Group (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England journal of medicine*, 378(7), 625–635. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710504>

Miniarikova, J., Zimmer, V., Martier, R., Brouwers, C. C., Pythoud, C., Richetin, K., Rey, M., Lubelski, J., Evers, M. M., van Deventer, S. J., Petry, H., Déglon, N., & Konstantinova, P. (2017). AAV5-miHTT gene therapy demonstrates suppression of mutant huntingtin aggregation and neuronal dysfunction in a rat model of Huntington's disease. *Gene therapy*, 24(10), 630–639. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.71>

Mitton, J. B. (2002). Heterozygous advantage. *eLS*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001760>

ModernaTx (2021). Compounds and compositions for intracellular delivery of therapeutic agents. [US patent US20170210697A1](https://www.uspto.gov/patent/US20170210697A1)

Mok, B. Y., de Moraes, M. H., Zeng, J., Bosch, D. E., Kotrys, A. V., Raguram, A., Hsu, F., Radey, M. C., Peterson, S. B., Mootha, V. K., Mougous, J. D., & Liu, D. R. (2020). A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, 583(7817), 631–637. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2477-4>

- Montes, J., Dunaway Young, S., Mazzone, E. S., Pasternak, A., Glanzman, A. M., Finkel, R. S., Darras, B. T., Muntoni, F., Mercuri, E., De Vivo, D. C., Bishop, K. M., Schneider, E., Bennett, C. F., Foster, R., Farwell, W., & CS2 and CS12 Study Groups (2019). Nusinersen improves walking distance and reduces fatigue in later-onset spinal muscular atrophy. *Muscle & nerve*, 60(4), 409–414. <https://doi.org/10.1002/mus.26633>
- Montes, J., McDermott, M. P., Mirek, E., Mazzone, E. S., Main, M., Glanzman, A. M., Duong, T., Young, S. D., Salazar, R., Pasternak, A., Gee, R., De Sanctis, R., Coratti, G., Forcina, N., Fanelli, L., Ramsey, D., Milev, E., Civitello, M., Pane, M., Pera, M. C., ... Mercuri, E. (2018). Ambulatory function in spinal muscular atrophy: Age-related patterns of progression. *PLoS one*, 13(6), e0199657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199657>
- Monteys, A. M., Ebanks, S. A., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2017). CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.010>
- Montiel-Gonzalez, M. F., Vallecillo-Viejo, I., Yudowski, G. A., & Rosenthal, J. J. (2013). Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18285–18290.
- Moyle, M., & Tate, B. (2004). Homozygous familial hypercholesterolaemia presenting with cutaneous xanthomas: response to liver transplantation. *The Australasian journal of dermatology*, 45(4), 226–228. <https://doi.org/10.1111/j.1440-0960.2004.00103.x>
- Mui, B. L., Tam, Y. K., Jayaraman, M., Ansell, S. M., Du, X., Tam, Y. Y., Lin, P. J., Chen, S., Narayanannair, J. K., Rajeev, K. G., Manoharan, M., Akinc, A., Maier, M. A., Cullis, P., Madden, T. D., & Hope, M. J. (2013). Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2(12), e139. <https://doi.org/10.1038/mtna.2013.66>
- Muntoni, F., Frank, D., Sardone, V., Morgan, J., Schnell, F., Charleston, J., ... & Servais, L. (2018). Golodirsén induces exon skipping leading to sarcolemmal dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy patients with mutations amenable to exon 53 skipping (S22.001).
- Musunuru, K., Chadwick, A. C., Mizoguchi, T., Garcia, S. P., DeNizio, J. E., Reiss, C. W., Wang, K., Iyer, S., Dutta, C., Clendaniel, V., Amaonye, M., Beach, A., Berth, K., Biswas, S., Braun, M. C., Chen, H. M., Colace, T. V., Ganey, J. D., Gangopadhyay, S. A., Garrity, R., ... Kathiresan, S. (2021). In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature*, 593(7859), 429–434. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03534-y>

- Nance M. A. (2017). Genetics of Huntington disease. *Handbook of clinical neurology*, 144, 3–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801893-4.00001-8>
- Nelson, C. E., Wu, Y., Gemberling, M. P., Oliver, M. L., Waller, M. A., Bohning, J. D., Robinson-Hamm, J. N., Bulaklak, K., Castellanos Rivera, R. M., Collier, J. H., Asokan, A., & Gersbach, C. A. (2019). Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nature medicine*, 25(3), 427–432. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0344-3>
- Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., & Sullenger, B. A. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 57, 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>
- Nopoulos P. C. (2016). Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues in clinical neuroscience*, 18(1), 91–98. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.1/pnopoulos>
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., Wiklund, O., Hegele, R. A., Raal, F. J., Defesche, J. C., Wiegman, A., Santos, R. D., Watts, G. F., Parhofer, K. G., Hovingh, G. K., Kovanen, P. T., Boileau, C., Aversa, M., Borén, J., Bruckert, E., ... European Atherosclerosis Society Consensus Panel (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *European heart journal*, 34(45), 3478–90a. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz273>
- NOXXON (2020a). NOX-A12. Available online at: https://www.noxxon.com/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=478 (accessed August 4, 2023).
- NOXXON (2020b). NOX-E36. Available online at: https://www.noxxon.com/index.php?option=com_content&view=article&id=20&Itemid=477 (accessed August 4, 2023).
- Nuñez, J. K., Chen, J., Pommier, G. C., Cogan, J. Z., Replogle, J. M., Adriaens, C., Ramadoss, G. N., Shi, Q., Hung, K. L., Samelson, A. J., Pogson, A. N., Kim, J. Y. S., Chung, A., Leonetti, M. D., Chang, H. Y., Kampmann, M., Bernstein, B. E., Hovestadt, V., Gilbert, L. A., & Weissman, J. S. (2021). Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell*, 184(9), 2503–2519.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.025>

- O'Brien, K. F., & Kunkel, L. M. (2001). Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Molecular genetics and metabolism*, 74(1-2), 75–88. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3220>
- Oluwakemi Ebenezer, Pietro Comoglio, Gane Ka-Shu Wong, Jack A Tuszynski. (2023). Development of Novel siRNA Therapeutics: A Review with a Focus on Inclisiran for the Treatment of Hypercholesterolemia. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 4019. <https://doi.org/10.3390/ijms24044019>
- Olson E. N. (2021). Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(22), e2004840117. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004840117>
- Origa R. (2017). β -Thalassemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 19(6), 609–619. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.173>
- Özcan, A., Krajewski, R., Ioannidi, E., Lee, B., Gardner, A., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Abudayyeh, O. O., & Gootenberg, J. S. (2021). Programmable RNA targeting with the single-protein CRISPR effector Cas7-11. *Nature*, 597(7878), 720–725. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03886-5>
- Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., & Kwakowsky, A. (2019). The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 258. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00258>
- Pardi, N., Tuyishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B. L., Tam, Y. K., Madden, T. D., Hope, M. J., & Weissman, D. (2015). Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 217, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>
- Parham, J. S., & Goldberg, A. C. (2019). Mipomersen and its use in familial hypercholesterolemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 20(2), 127–131. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1550071>
- Parums D. V. (2021). Editorial: First Full Regulatory Approval of a COVID-19 Vaccine, the BNT162b2 Pfizer-BioNTech Vaccine, and the Real-World Implications for Public Health Policy. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 27, e934625. <https://doi.org/10.12659/MSM.934625>
- Paunovska, K., Da Silva Sanchez, A. J., Sago, C. D., Gan, Z., Lokugamage, M. P., Islam, F. Z., Kalathoor, S., Krupczak, B. R., & Dahlman, J. E. (2019). Nanoparticles Containing Oxidized Cholesterol Deliver mRNA to the Liver Microenvironment at Clinically Relevant

- Doses. *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla.), 31(14), e1807748. <https://doi.org/10.1002/adma.201807748>
- Paunovska, K., Gil, C. J., Lokugamage, M. P., Sago, C. D., Sato, M., Lando, G. N., Gamboa Castro, M., Bryksin, A. V., & Dahlman, J. E. (2018). Analyzing 2000 in Vivo Drug Delivery Data Points Reveals Cholesterol Structure Impacts Nanoparticle Delivery. *ACS nano*, 12(8), 8341–8349. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03640>
- Paunovska, K., Loughrey, D., & Dahlman, J. E. (2022). Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nature reviews. Genetics*, 23(5), 265–280. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
- Perez-Garcia, C. G. (n.d.). *North American Cystic Fibrosis Conference: North american cystic fibrosis conference*. North American Cystic Fibrosis Conference | North American Cystic Fibrosis Conference. <https://www.nacfconference.org/>
- PMDA (2020). *Pharmaceutical Evaluation Division, Pharmaceutical Safety and Environmental Health Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare*. Chiyoda-ku, Tokyo, Japan: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency.
- Poolman, E. M., & Galvani, A. P. (2007). Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *Journal of the Royal Society, Interface*, 4(12), 91–98. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0154>
- Porcari, A., Fontana, M., & Gillmore, J. D. (2023). Transthyretin cardiac amyloidosis. *Cardiovascular research*, 118(18), 3517–3535. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac119>
- Porto, E. M., Komor, A. C., Slaymaker, I. M., & Yeo, G. W. (2020). Base editing: advances and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*, 19(12), 839–859. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0084-6>
- Prakash, V., Moore, M., & Yáñez-Muñoz, R. J. (2016). Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(3), 465–474. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.5>
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., & Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 27(9), 1083–1091. <https://doi.org/10.1002/mds.25075>
- Qu, L., Yi, Z., Zhu, S., Wang, C., Cao, Z., Zhou, Z., Yuan, P., Yu, Y., Tian, F., Liu, Z., Bao, Y., Zhao, Y., & Wei, W. (2019). Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR

- using engineered RNAs. *Nature biotechnology*, 37(9), 1059–1069. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0178-z>
- Raal, F. J., Santos, R. D., Blom, D. J., Marais, A. D., Charng, M. J., Cromwell, W. C., Lachmann, R. H., Gaudet, D., Tan, J. L., Chasan-Taber, S., Tribble, D. L., Flaim, J. D., & Crooke, S. T. (2010). Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 375(9719), 998–1006. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60284-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60284-X)
- Rader, D. J., & Kastelein, J. J. (2014). Lomitapide and Mipomersen: two first-in-class drugs for reducing low-density lipoprotein cholesterol in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*, 129(9), 1022–1032. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001292>
- Rai, R., Alwani, S., & Badea, I. (2019). Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications. *Polymers*, 11(4), 745. <https://doi.org/10.3390/polym11040745>
- Ray, K. K., Wright, R. S., Kallend, D., Koenig, W., Leiter, L. A., Raal, F. J., Bisch, J. A., Richardson, T., Jaros, M., Wijngaard, P. L. J., Kastelein, J. J. P., & ORION-10 and ORION-11 Investigators (2020). Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *The New England journal of medicine*, 382(16), 1507–1519. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1912387>
- Reyes-Soffer, G., Moon, B., Hernandez-Ono, A., Dionizovik-Dimanovski, M., Jimenez, J., Obunike, J., Thomas, T., Ngai, C., Fontanez, N., Donovan, D. S., Karmally, W., Holleran, S., Ramakrishnan, R., Mittleman, R. S., & Ginsberg, H. N. (2016). Complex effects of inhibiting hepatic apolipoprotein B100 synthesis in humans. *Science translational medicine*, 8(323), 323ra12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad2195>
- Robinson, E., MacDonald, K. D., Slaughter, K., McKinney, M., Patel, S., Sun, C., & Sahay, G. (2018). Lipid nanoparticle-delivered chemically modified mRNA restores chloride secretion in cystic fibrosis. *Molecular Therapy*, 26(8), 2034-2046.
- Robinson, P. N., Arteaga-Solis, E., Baldock, C., Collod-Bérourd, G., Booms, P., De Paepe, A., Dietz, H. C., Guo, G., Handford, P. A., Judge, D. P., Kielty, C. M., Loeys, B., Milewicz, D. M., Ney, A., Ramirez, F., Reinhardt, D. P., Tiedemann, K., Whiteman, P., & Godfrey, M. (2006). The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of medical genetics*, 43(10), 769–787. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.039669>

- Rodrigues, F. B., & Wild, E. J. (2018). Huntington's Disease Clinical Trials Corner: February 2018. *Journal of Huntington's disease*, 7(1), 89–98. <https://doi.org/10.3233/JHD-189001>
- Rodrigues, F. B., & Wild, E. J. (2020). Huntington's Disease Clinical Trials Corner: April 2020. *Journal of Huntington's disease*, 9(2), 185–197. <https://doi.org/10.3233/JHD-200002>
- Roos R. A. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet journal of rare diseases*, 5, 40. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>
- Rowczenio, D. M., Noor, I., Gillmore, J. D., Lachmann, H. J., Whelan, C., Hawkins, P. N., Obici, L., Westermarck, P., Grateau, G., & Wechalekar, A. D. (2014). Online registry for mutations in hereditary amyloidosis including nomenclature recommendations. *Human mutation*, 35(9), E2403–E2412. <https://doi.org/10.1002/humu.22619>
- Ruckman, J., Green, L. S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W. L., Henninger, D. D., et al. (1998). 20 -Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165) Inhibition Of Receptor Binding And Vegf-Induced Vascular Permeability Through Interactions Requiring The Exon 7- Encoded Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 20556–20567. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20556>
- Ryals, R. C., Patel, S., Acosta, C., McKinney, M., Pennesi, M. E., & Sahay, G. (2020). The effects of PEGylation on LNP based mRNA delivery to the eye. *PloS one*, 15(10), e0241006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241006>
- Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Keech, A. C., Honarpour, N., Wiviott, S. D., Murphy, S. A., Kuder, J. F., Wang, H., Liu, T., Wasserman, S. M., Sever, P. S., Pedersen, T. R., & FOURIER Steering Committee and Investigators (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *The New England journal of medicine*, 376(18), 1713–1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal615664>
- Sago, C. D., Lokugamage, M. P., Islam, F. Z., Krupczak, B. R., Sato, M., & Dahlman, J. E. (2018). Nanoparticles That Deliver RNA to Bone Marrow Identified by in Vivo Directed Evolution. *Journal of the American Chemical Society*, 140(49), 17095–17105. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08976>
- Sago, C. D., Lokugamage, M. P., Paunovska, K., Vanover, D. A., Monaco, C. M., Shah, N. N., Gamboa Castro, M., Anderson, S. E., Rudoltz, T. G., Lando, G. N., Munnilal Tiwari, P., Kirschman, J. L., Willett, N., Jang, Y. C., Santangelo, P. J., Bryksin, A. V., & Dahlman, J. E. (2018). High-throughput in vivo screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(42), E9944–E9952. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811276115>

- Saifullah, Motohashi, N., Tsukahara, T., & Aoki, Y. (2022). Development of Therapeutic RNA Manipulation for Muscular Dystrophy. *Frontiers in genome editing*, 4, 863651. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2022.863651>
- Saito, M., Ladha, A., Strecker, J., Faure, G., Neumann, E., Altae-Tran, H., Macrae, R. K., & Zhang, F. (2021). Dual modes of CRISPR-associated transposon homing. *Cell*, 184(9), 2441–2453.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.006>
- Santos, R. D., Duell, P. B., East, C., Guyton, J. R., Moriarty, P. M., Chin, W., & Mittleman, R. S. (2015). Long-term efficacy and safety of Mipomersen in patients with familial hypercholesterolaemia: 2-year interim results of an open-label extension. *European heart journal*, 36(9), 566–575. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv549>
- Santos, R. D., Raal, F. J., Catapano, A. L., Witztum, J. L., Steinhagen-Thiessen, E., & Tsimikas, S. (2015). Mipomersen, an antisense oligonucleotide to apolipoprotein B-100, reduces lipoprotein(a) in various populations with hypercholesterolemia: results of 4 phase III trials. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(3), 689–699. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304549>
- Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G. P., Lehrach, H., & Wanker, E. E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4604–4609. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4604>
- Schmidt, H. H., Wixner, J., Planté-Bordeneuve, V., Muñoz-Beamud, F., Lladó, L., Gillmore, J. D., Mazzeo, A., Li, X., Arum, S., Jay, P. Y., Adams, D., & Patisiran Post-LT Study Group (2022). Patisiran treatment in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis with polyneuropathy after liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 22(6), 1646–1657. <https://doi.org/10.1111/ajt.17009>
- Schonfeld, G., Lin, X., & Yue, P. (2005). Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(12), 1372–1378. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-4473-0>
- Schrand, B., Verma, B., Levay, A., Patel, S., Castro, I., Benaduce, A. P., Brenneman, R., Umland, O., Yagita, H., Gilboa, E., & Ishkanian, A. (2017). Radiation-Induced Enhancement of Antitumor T-cell Immunity by VEGF-Targeted 4-1BB Costimulation. *Cancer research*, 77(6), 1310–1321. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2105>

Sedic, M., Senn, J. J., Lynn, A., Laska, M., Smith, M., Platz, S. J., Bolen, J., Hoge, S., Bulychev, A., Jacquinet, E., Bartlett, V., & Smith, P. F. (2018). Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Veterinary pathology*, 55(2), 341–354. <https://doi.org/10.1177/0300985817738095>

Semple, S. C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A. P., Mui, B. L., Cho, C. K., Sah, D. W., Stebbing, D., Crosley, E. J., Yaworski, E., Hafez, I. M., Dorkin, J. R., Qin, J., Lam, K., Rajeev, K. G., Wong, K. F., Jeffs, L. B., Nechev, L., Eisenhardt, M. L., Jayaraman, M., ... Hope, M. J. (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature biotechnology*, 28(2), 172–176. <https://doi.org/10.1038/nbt.1602>

Shen, W., De Hoyos, C. L., Migawa, M. T., Vickers, T. A., Sun, H., Low, A., Bell, T. A., 3rd, Rahdar, M., Mukhopadhyay, S., Hart, C. E., Bell, M., Riney, S., Murray, S. F., Greenlee, S., Croke, R. M., Liang, X. H., Seth, P. P., & Croke, S. T. (2019). Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index. *Nature biotechnology*, 37(6), 640–650. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0106-2>

Shin, J. W., Kim, K. H., Chao, M. J., Atwal, R. S., Gillis, T., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., & Lee, J. M. (2016). Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Human molecular genetics*, 25(20), 4566–4576. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw286>

Šimčíková, D., & Heneberg, P. (2019). Refinement of evolutionary medicine predictions based on clinical evidence for the manifestations of Mendelian diseases. *Scientific reports*, 9(1), 18577. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54976-4>

Singh, N. K., Singh, N. N., Androphy, E. J., & Singh, R. N. (2006). Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Molecular and cellular biology*, 26(4), 1333–1346. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1333-1346.2006>

Skotte, N. H., Southwell, A. L., Østergaard, M. E., Carroll, J. B., Warby, S. C., Doty, C. N., Petoukhov, E., Vaid, K., Kordasiewicz, H., Watt, A. T., Freier, S. M., Hung, G., Seth, P. P., Bennett, C. F., Swayze, E. E., & Hayden, M. R. (2014). Allele-specific suppression of mutant huntingtin using antisense oligonucleotides: providing a therapeutic option for all Huntington disease patients. *PloS one*, 9(9), e107434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107434>

Slymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6268), 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>

- Solomon, S. D., Adams, D., Kristen, A., Grogan, M., González-Duarte, A., Maurer, M. S., Merlini, G., Damy, T., Slama, M. S., Brannagan, T. H., 3rd, Dispenzieri, A., Berk, J. L., Shah, A. M., Garg, P., Vaishnav, A., Karsten, V., Chen, J., Gollob, J., Vest, J., & Suhr, O. (2019). Effects of Patisiran , an RNA Interference Therapeutic, on Cardiac Parameters in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *Circulation*, *139*(4), 431–443. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035831>
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr, & Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *The Journal of biological chemistry*, *278*(45), 44826–44831. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308643200>
- Southwell, A. L., Kordasiewicz, H. B., Langbehn, D., Skotte, N. H., Parsons, M. P., Villanueva, E. B., Caron, N. S., Østergaard, M. E., Anderson, L. M., Xie, Y., Cengio, L. D., Findlay-Black, H., Doty, C. N., Fitsimmons, B., Swayze, E. E., Seth, P. P., Raymond, L. A., Frank Bennett, C., & Hayden, M. R. (2018). Huntingtin suppression restores cognitive function in a mouse model of Huntington's disease. *Science translational medicine*, *10*(461), eaar3959. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar3959>
- Southwell, A. L., Skotte, N. H., Kordasiewicz, H. B., Østergaard, M. E., Watt, A. T., Carroll, J. B., Doty, C. N., Villanueva, E. B., Petoukhov, E., Vaid, K., Xie, Y., Freier, S. M., Swayze, E. E., Seth, P. P., Bennett, C. F., & Hayden, M. R. (2014). In vivo evaluation of candidate allele-specific mutant huntingtin gene silencing antisense oligonucleotides. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *22*(12), 2093–2106. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.153>
- Southwell, A. L., Skotte, N. H., Villanueva, E. B., Østergaard, M. E., Gu, X., Kordasiewicz, H. B., Kay, C., Cheung, D., Xie, Y., Walzl, S., Dal Cengio, L., Findlay-Black, H., Doty, C. N., Petoukhov, E., Iworima, D., Slama, R., Ooi, J., Pouladi, M. A., Yang, X. W., Swayze, E. E., ... Hayden, M. R. (2017). A novel humanized mouse model of Huntington disease for preclinical development of therapeutics targeting mutant huntingtin alleles. *Human molecular genetics*, *26*(6), 1115–1132. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx021>
- Spronck, E. A., Brouwers, C. C., Vallès, A., de Haan, M., Petry, H., van Deventer, S. J., Konstantinova, P., & Evers, M. M. (2019). AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Sustained Huntingtin Lowering and Functional Improvement in Huntington Disease Mouse Models. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, *13*, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.03.002>
- Spronck, E. A., Vallès, A., Lampen, M. H., Montenegro-Miranda, P. S., Keskin, S., Heijink, L., Evers, M. M., Petry, H., Deventer, S. J. V., Konstantinova, P., & Haan, M. (2021). Intraatrial

Administration of AAV5-miHTT in Non-Human Primates and Rats Is Well Tolerated and Results in miHTT Transgene Expression in Key Areas of Huntington Disease Pathology. *Brain sciences*, 11(2), 129. <https://doi.org/10.3390/brainsci11020129>

Su, X., Fricke, J., Kavanagh, D. G., & Irvine, D. J. (2011). In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*, 8(3), 774–787. <https://doi.org/10.1021/mp100390w>

Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 99(Pt A), 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>

Sun, X., Yi, Y., Yan, Z., Rosen, B. H., Liang, B., Winter, M. C., ... & Engelhardt, J. F. (2019). In utero and postnatal VX-770 administration rescues multiorgan disease in a ferret model of cystic fibrosis. *Science translational medicine*, 11(485), eaau7531.

Tabrizi, S. J., Flower, M. D., Ross, C. A., & Wild, E. J. (2020). Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Neurology*, 16(10), 529–546. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0389-4>

Tan, L., Zheng, T., Li, M., Zhong, X., Tang, Y., Qin, M., & Sun, X. (2020). Optimization of an mRNA vaccine assisted with cyclodextrin-polyethyleneimine conjugates. *Drug delivery and translational research*, 10(3), 678–689. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00725-4>

Ting-Yu Lin, Sebastian Glatt (2022). ACEing premature codon termination using anticodon-engineered sup-tRNA-based therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 Sep 13; 29: 368–369. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.07.019>

Thompson, M. G., Burgess, J. L., Naleway, A. L., Tyner, H. L., Yoon, S. K., Meece, J., Olsho, L. E. W., Caban-Martinez, A. J., Fowlkes, A., Lutrick, K., Kuntz, J. L., Dunnigan, K., Odean, M. J., Hegmann, K. T., Stefanski, E., Edwards, L. J., Schaefer-Solle, N., Grant, L., Ellingson, K., Groom, H. C., ... Gaglani, M. (2021). Interim Estimates of Vaccine Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Health Care Personnel, First Responders, and Other Essential and Frontline Workers - Eight U.S. Locations, December 2020-March 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70(13), 495–500. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7013e3>

Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>

- Urits, I., Swanson, D., Swett, M. C., Patel, A., Berardino, K., Amgalan, A., Berger, A. A., Kassem, H., Kaye, A. D., & Viswanath, O. (2020). A Review of Patisiran (ONPATPRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurology and therapy*, 9(2), 301–315. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00208-1>
- Vallecillo-Viejo, I. C., Liscovitch-Brauer, N., Montiel-Gonzalez, M. F., Eisenberg, E., & Rosenthal, J. J. (2018). Abundant off-target edits from site-directed RNA editing can be reduced by nuclear localization of the editing enzyme. *RNA biology*, 15(1), 104-114.
- Vandenbroucke, R. E., De Geest, B. G., Bonn , S., Vinken, M., Van Haecke, T., Heimberg, H., Wagner, E., Rogiers, V., De Smedt, S. C., Demeester, J., & Sanders, N. N. (2008). Prolonged gene silencing in hepatoma cells and primary hepatocytes after small interfering RNA delivery with biodegradable poly(beta-amino esters). *The journal of gene medicine*, 10(7), 783–794. <https://doi.org/10.1002/jgm.1202>
- Verhaart, I. E. C., & Aartsma-Rus, A. (2019). Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nature reviews. Neurology*, 15(7), 373–386. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0203-3>
- Wagner, K. R., Kuntz, N. L., Koenig, E., East, L., Upadhyay, S., Han, B., & Shieh, P. B. (2021). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of Casimersen in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 45 skipping: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration trial. *Muscle & nerve*, 64(3), 285–292. <https://doi.org/10.1002/mus.27347>
- Warby, S. C., Montpetit, A., Hayden, A. R., Carroll, J. B., Butland, S. L., Visscher, H., Collins, J. A., Semaka, A., Hudson, T. J., & Hayden, M. R. (2009). CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplogroup. *American journal of human genetics*, 84(3), 351–366. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.02.003>
- Watanabe, N., Nagata, T., Satou, Y., Masuda, S., Saito, T., Kitagawa, H., Komaki, H., Takagaki, K., & Takeda, S. (2018). NS-065/NCNP-01: An Antisense Oligonucleotide for Potential Treatment of Exon 53 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 13, 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.09.017>
- Weatherall D.J. (2015). The thalassemias: disorders of globin synthesis. Kaushansky K, & Lichtman M.A., & Prchal J.T., & Levi M.M., & Press O.W., & Burns L.J., & Caligiuri M(Eds.), *Williams Hematology*, 9e. McGraw Hill. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1581§ionid=9430513>

- Weaver, J. J., Natarajan, N., Shaw, D. W. W., Apkon, S. D., Koo, K. S. H., Shivaram, G. M., & Monroe, E. J. (2018). Transforaminal intrathecal delivery of Nusinersen using cone-beam computed tomography for children with spinal muscular atrophy and extensive surgical instrumentation: early results of technical success and safety. *Pediatric radiology*, *48*(3), 392–397. <https://doi.org/10.1007/s00247-017-4031-6>
- Wei, T., Cheng, Q., Min, Y. L., Olson, E. N., & Siegwart, D. J. (2020). Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nature communications*, *11*(1), 3232. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17029-3>
- Wein, N., Alfano, L., & Flanigan, K. M. (2015). Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Pediatric clinics of North America*, *62*(3), 723–742. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.03.008>
- Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2017). Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. *The Lancet. Neurology*, *16*(10), 837–847. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30280-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30280-6)
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*, *42*, 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- Woolf L. I. (1986). The heterozygote advantage in phenylketonuria. *American journal of human genetics*, *38*(5), 773–775.
- Xiang, J. J., Tang, J. Q., Zhu, S. G., Nie, X. M., Lu, H. B., Shen, S. R., Li, X. L., Tang, K., Zhou, M., & Li, G. Y. (2003). IONP-PLL: a novel non-viral vector for efficient gene delivery. *The journal of gene medicine*, *5*(9), 803–817. <https://doi.org/10.1002/jgm.419>
- Xiao, B., Zhang, Z., Viennois, E., Kang, Y., Zhang, M., Han, M. K., Chen, J., & Merlin, D. (2016). Combination Therapy for Ulcerative Colitis: Orally Targeted Nanoparticles Prevent Mucosal Damage and Relieve Inflammation. *Theranostics*, *6*(12), 2250–2266. <https://doi.org/10.7150/thno.15710>
- Xu, X., Tay, Y., Sim, B., Yoon, S. I., Huang, Y., Ooi, J., Utami, K. H., Ziaei, A., Ng, B., Radulescu, C., Low, D., Ng, A. Y. J., Loh, M., Venkatesh, B., Ginhoux, F., Augustine, G. J., & Pouladi, M. A. (2017). Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports*, *8*(3), 619–633. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.022>
- Yamamoto, T., Mukai, Y., Wada, F., Terada, C., Kayaba, Y., Oh, K., Yamayoshi, A., Obika, S., & Harada-Shiba, M. (2021). Highly Potent GalNAc-Conjugated Tiny LNA Anti-miRNA-122 Antisense Oligonucleotides. *Pharmaceutics*, *13*(6), 817. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060817>

- Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H. E., Sun, X., Qin, Z., Jin, P., Li, S., & Li, X. J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *The Journal of clinical investigation*, *127*(7), 2719–2724. <https://doi.org/10.1172/JCI92087>
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature reviews. Genetics*, *15*(8), 541–555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>
- Yin, H., Song, C. Q., Dorkin, J. R., Zhu, L. J., Li, Y., Wu, Q., Park, A., Yang, J., Suresh, S., Bizhanova, A., Gupta, A., Bolukbasi, M. F., Walsh, S., Bogorad, R. L., Gao, G., Weng, Z., Dong, Y., Koteliensky, V., Wolfe, S. A., Langer, R., ... Anderson, D. G. (2016). Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nature biotechnology*, *34*(3), 328–333. <https://doi.org/10.1038/nbt.3471>
- Yu, R. Z., Kim, T. W., Hong, A., Watanabe, T. A., Gaus, H. J., & Geary, R. S. (2007). Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, *35*(3), 460–468. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012401>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, *163*(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zhang, H. X., Zhang, Y., & Yin, H. (2019). Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *27*(4), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.014>
- Zhang, X., Zhao, W., Nguyen, G. N., Zhang, C., Zeng, C., Yan, J., Du, S., Hou, X., Li, W., Jiang, J., Deng, B., McComb, D. W., Dorkin, R., Shah, A., Barrera, L., Gregoire, F., Singh, M., Chen, D., Sabatino, D. E., & Dong, Y. (2020). Functionalized lipid-like nanoparticles for in vivo mRNA delivery and base editing. *Science advances*, *6*(34), eabc2315. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc2315>
- Zhang, Y., Sun, C., Wang, C., Jankovic, K. E., & Dong, Y. (2021). Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery. *Chemical reviews*, *121*(20), 12181–12277. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00244>

Zhong, H., Chan, G., Hu, Y., Hu, H., & Ouyang, D. (2018). A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. *Pharmaceutics*, *10*(4), 263. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040263>

Zimmermann, T. S., Lee, A. C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Röhl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., MacLachlan, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, *441*(7089), 111–114. <https://doi.org/10.1038/nature04688>