



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΝΕΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΩΤΙΑΙΑΣ ΜΥΙΚΗΣ  
ΑΤΡΟΦΙΑΣ»**

ΓΑΪΤΑΝΙΔΗ ΜΑΡΙΑ

ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΡΑΔΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευρογενετικής, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)

ΤΣΕΖΟΥ Α ΣΠΑΣΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, ΕΤΟΣ 2019



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«ADVANCES IN GENE THERAPY FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY»**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία\_ Κλινικά και Γενετικά Στοιχεία

1.1. Στοιχεία Γενετικής-Γενετική Βάση της Νόσου

1.2. Κλινικά Χαρακτηριστικά\_Κλινικοί Τύποι

1.3. Γενετική Διάγνωση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία\_Συμπτωματική Θεραπεία

2.1 Κλινική Διαχείριση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία\_ Γενετική Θεραπεία

3.1 Στοιχεία Γενετικής Θεραπείας

3.1.1 Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια

3.1.2 Nusinersen\_2016

3.1.3 Γονιδιακή Θεραπεία

3.1.4 Zolgensma\_2018

3.1.5 Μελλοντικά θεραπευτικά πρωτόκολλα

Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

## Περίληψη

Η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία είναι μια αυτοσωματική-υπολειπόμενη παιδιατρική νευροεκφυλιστική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από απώλεια των κατώτερων κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Προκαλείται από ομόζυγη μεταλλαγή στο γονίδιο επιβίωσης του κινητικού νευρώνα 1 (SMN1) που οδηγεί σε απώλεια της πρωτεΐνης SMN. Το γονίδιο SMN1 φαίνεται ότι είναι σημαντικό για διάφορες λειτουργίες των νευρικών κυττάρων και κυρίως του RNA-ματίσματος, της snRNP-βιογένεσης και του RNA-trafficking. Η κλινική βαρύτητα της νόσου επηρεάζεται κυρίως από την έκφραση του γονιδίου SMN2 το οποίο είναι κατά 99% ομόλογο του SMN1.

Μέχρι και πριν από 2-3 χρόνια δεν υπήρχε εγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή επί της παθολογίας της SMA και η αντιμετώπισή της περιοριζόταν σε συμπτωματική και παρηγορητική αγωγή. Η ραγδαία εξέλιξη στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας και της γενετικής μηχανικής, που επιτεύχθηκε τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην έγκριση δύο γενετικών φαρμακευτικών σκευασμάτων του Nusinersen (2016) και του Zolgensma (2018) από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration (FDA or USFDA) τα οποία φαίνεται ότι επιδρούν αποτελεσματικά επί της παθολογίας της νόσου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ολοκληρωμένη και έγκυρη ενημέρωση κατά πρώτον περί των κλινικών και γενετικών χαρακτηριστικών της Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας και κατά δεύτερον και κυριότερον περί των θεραπευτικών δεδομένων που αφορούν στην νόσο, όπως αυτά προκύπτουν μέσα από τη βιβλιογραφία των τελευταίων χρόνων.

Συμπερασματικά η μελέτη έδειξε ότι η χρήση φαρμάκων νέας γενιάς φαίνεται να βελτιώνει σημαντικά το φαινότυπο της νόσου SMA και ότι το υψηλό κόστος αποτελεί ένα από τα κύρια μειονεκτήματά τους. Ο άμεσος γενετικός έλεγχος των νεογνών καθίσταται πλέον αναγκαίος για την εφαρμογή έγκαιρης θεραπευτικής αγωγής.

## **Abstract**

Spinal Muscle Atrophy is an autosomal recessive pediatric neurodegenerative disorder characterized by loss of motoneurons in the spinal cord. In the majority of cases, it is caused by homozygous deletion of the survival motor neuron 1 gene (SMN1) that results in loss of the SMN protein. The SMN1 gene appears to play an essential role affecting various cell pathways that regulate RNA-splicing, snRNP-biogenesis and RNA-trafficking. The clinical severity of the disease is mainly influenced by the expression of the SMN 2 gene, which is 99% homologous with SMN1.

Up to 2-3 years ago there was no approved treatment for the pathogenesis of SMA and the clinical care was limited to symptomatic and palliative measures. The rapid evolution of molecular biology and genetic engineering achieved in recent years has led to the approval of two novel therapies, Nusinersen (2016) and Zolgensma (2018), by the US Food and Drug Administration, which appear to influence the pathogenicity of the disease.

The purpose of the present study is to provide comprehensive and valid information firstly on the clinical and genetic characteristics of spinal muscular atrophy and secondly on the newly approved therapies for SMA, as evidenced by recent literature

In conclusion, the study showed that the use of new generation drugs seems to significantly improve the phenotype of SMA and that high costs is one of their major disadvantages. The addition of SMA in newborn screening is now considered as urgent for the early diagnosis and treatment of the disease.

## Εισαγωγή

Η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (Spinal Muscular Atrophy, SMA) είναι μια σοβαρή νευροεκφυλιστική ασθένεια που έχει ως αποτέλεσμα τον εκφυλισμό και τον κυτταρικό θάνατο των κατώτερων κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού και αποτελεί την πιο συχνή γενετική αιτία παιδικής θνησιμότητας. Πρόκειται για μια αυτοσωματική-υπολειπόμενη νόσο με συχνότητα 1:6.000-1:11.000 ζώντων γεννήσεων.

Η SMA προκαλείται κατά 95% από ομόζυγη έλλειψη και κατά 5% από ετερόζυγο συνδυασμό έλλειψης και σημειακής μεταλλαγής του γονιδίου Επιβίωσης του Κινητικού Νευρώνα 1 (Survival Motor Neuron 1, SMN1) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Επιβίωσης του Κινητικού Νευρώνα (SMN). Η νόσος SMA χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική και κλινική ετερογένεια στην οποία συμβάλλει σημαντικά ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου Επιβίωσης του Κινητικού Νευρώνα 2 (Survival Motor Neuron 2, SMN2). Ο αριθμός των αντιγράφων του SMN2 που φέρει ένας ασθενής συσχετίζεται αντιστρόφως με τη βαρύτητα της ασθένειας.

Ανάλογα με την ηλικία έναρξης και τη βαρύτητα των κλινικών συμπτωμάτων της SMA διακρίνεται σε πέντε κλινικούς τύπους 0, 1, 2, 3 και 4. Μέχρι και πριν από 2-3 χρόνια δεν υπήρχε εγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή επί της παθογένειας της SMA και η αντιμετώπισή της περιοριζόταν σε συμπτωματική και παρηγορητική αγωγή. Η ραγδαία εξέλιξη στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας και της γενετικής μηχανικής, που επιτεύχθηκε τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην έγκριση δύο γενετικών φαρμακευτικών σκευασμάτων του Nusinersen (2016) και του Zolgensma (2018) από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration (FDA or USFDA) τα οποία φαίνεται ότι επιδρούν αποτελεσματικά επί της παθογένειας της νόσου. Η έρευνα συνεχίζεται με εντατικούς ρυθμούς και φαρμακευτικές θεραπείες με θετικά υποσχόμενα αποτελέσματα βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια κλινικών δοκιμών. Ο θεραπευτικός στόχος στην πλειονότητα αυτών των δοκιμών είναι η αύξηση της ποσότητας της λειτουργικής πρωτεΐνης SMN (Wertz and Sahin, 2016, 1366(1), pp.5-19)

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ολοκληρωμένη και έγκυρη ενημέρωση κατά πρώτον περί των κλινικών και γενετικών χαρακτηριστικών της νόσου SMA και κατά δεύτερον και κυριότερον περί των θεραπευτικών δεδομένων που αφορούν στην νόσο, όπως αυτά προκύπτουν μέσα από τη βιβλιογραφία των τελευταίων χρόνων.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, αναζητήθηκε βιβλιογραφία από την βάση δεδομένων Pubmed με την χρήση των λέξεων και φράσεων κλειδιών όπως για παράδειγμα: spinal muscular atrophy, genetics of SMA, gene therapy in SMA, gene therapy, antisense oligonucleotides κ.α. Ακολούθησε μελέτη, επεξεργασία της βιβλιογραφίας και συγγραφή της εργασίας η οποία παρατίθεται αναλυτικά στις σελίδες που ακολουθούν

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:**

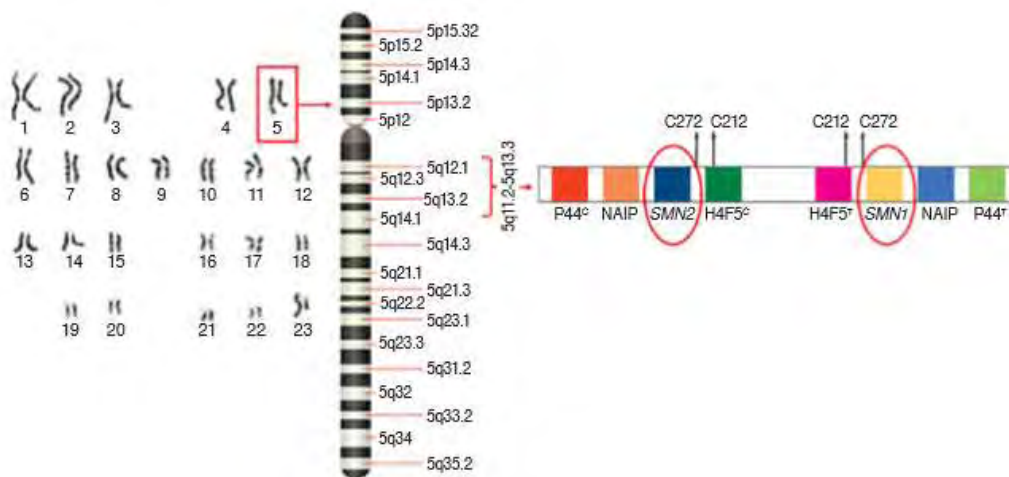
## **Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία-Κλινικά και γενετικά στοιχεία**



## 1.1. Η γενετική βάση της νόσου

Η νωτιαία μυϊκή ατροφία (spinal muscular atrophy, SMA) είναι μια γενετική διαταραχή που επηρεάζει τον έλεγχο της κίνησης των μυών. Ακολουθεί αυτοσωματική υπολειπόμενη κληρονομικότητα, γεγονός που σημαίνει ότι οι γονείς ενός πάσχοντα φέρουν ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου αλλά δεν παρουσιάζουν συμπτώματα της πάθησης (Kolb and Kissel, 2015,33(4),pp.831-841; Vamshi.etal,S(24),(12),2018; Nurputra.etal, 2013,77(5),pp.435-63)

Για πολλά χρόνια, λόγω της μεγάλης κλινικής ετερογένειας που παρουσιάζει, η νόσος SMA αποτελούσε ένα αίνιγμα για την επιστημονική ιατρική κοινότητα. Το 1995, η ραγδαία εξέλιξη στον τομέα της γενετικής και της μοριακής βιολογίας, οδήγησε στην ανακάλυψη ότι το 95% των περιπτώσεων SMA, ανεξάρτητα από τον κλινικό τύπο, οφείλονται σε μεταλλαγές του γονιδίου SMN1 (Survival Motor Neuron 1) το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 (5q13) (εικόνα 1.1) (Kolb and Kissel, 2015,33(4),pp.831-841; Vamshi.etal.2018,S(24),(12); Nurputra.etal, 2013,77(5),pp.435-63)



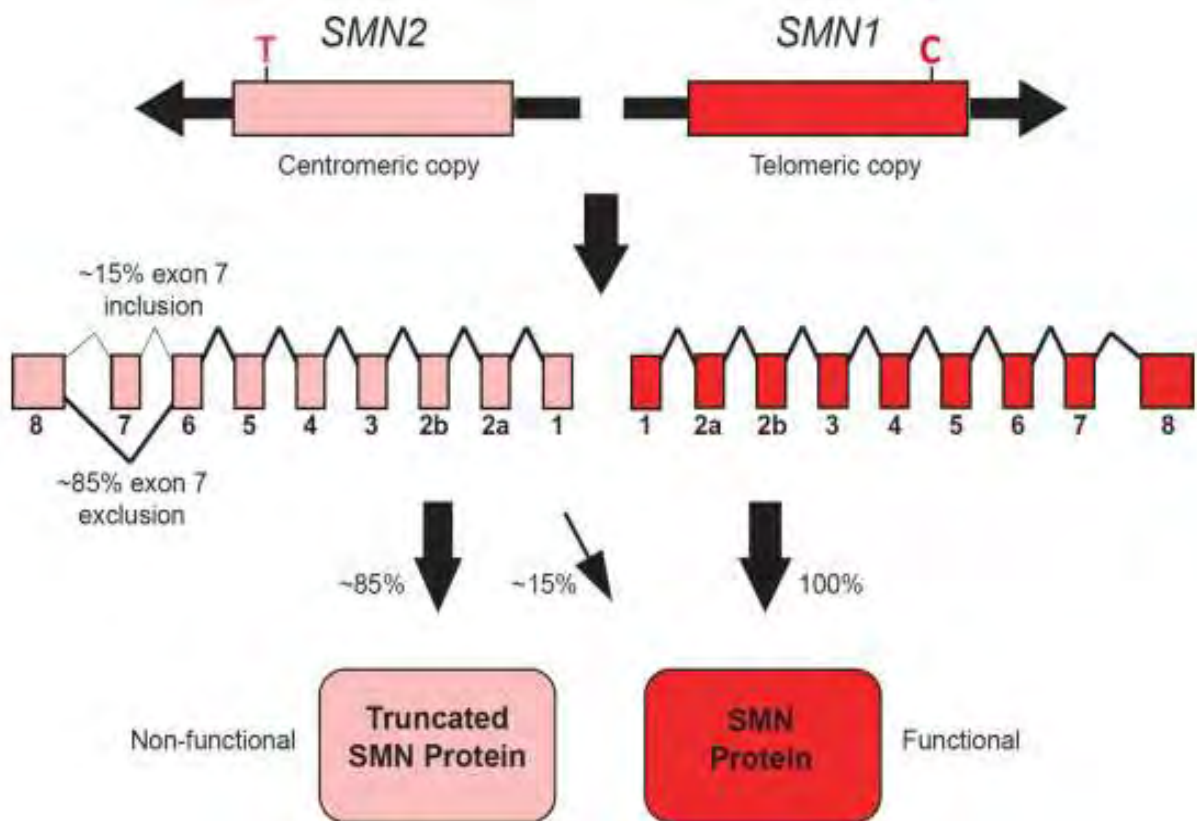
**Εικόνα 1.1:** Η θέση των γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη SMN στο χρωμόσωμα 5q (Vamshi.etal., 2018)

Οι ασθενείς με SMA φέρουν μεταλλαγή και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου SMN1 με αποτέλεσμα την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Έτσι, η νόσος SMA προκαλείται από μια ανεπάρκεια της πρωτεΐνης SMN που, για λόγους που

εξακολουθούν να είναι άγνωστοι, έχει ως αποτέλεσμα επιλεκτική απώλεια των κινητικών νευρώνων.(Vamshi.etal, 2018, S(24),(12).

Το μακρύ άκρο του χρωμοσώματος 5 στο οποίο εδράζεται τελομερικά το γονίδιο SMN1 αποτελεί μέρος ενός ανεστραμμένου διπλασιασμού μεγέθους 500 Kb. Για το λόγο αυτό στην περιοχή αυτή, και για κάθε αλληλόμορφο ξεχωριστά, εδράζεται κεντρομερικά αντίγραφο του γονιδίου SMN1 το γονίδιο SMN2. Το γονίδιο SMN2 είναι πανομοιότυπο με το γονίδιο SMN1 με εξαίρεση κάποιες μικρές διαφορές στο υδροξυτελικό του άκρο. Από αυτές η αντικατάσταση μιας βάσης κυτοσίνης (C) από θυμιδίνη (T) στη θέση +6 του εξονίου 7 (c.480C>T, NM\_000344.3 ) του γονιδίου SMN2, είναι η μόνη διαφορά σε κωδικοποιούσα περιοχή και είναι υπεύθυνη για τον αποκλεισμό του εξονίου αυτού από το ώριμο RNA (mRNA) κατά τη διαδικασία του ματίσματος. Συνήθως κάθε αλληλόμορφο έχει πάνω από ένα γονίδια SMN2. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ιδιαιτερότητα της γονιδιωματικής σύνθεσης της περιοχής που χαρτογραφούνται τα γονίδια SMN1 και SMN2 (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, αντίγραφα γονιδίων) την καθιστά επιρρεπή σε αναδιατάξεις γενετικού υλικού και ελλείψεις και προκαλεί δυσκολία στον προσδιορισμό της οργάνωσης και της λειτουργίας της. Έτσι έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις που στην εν λόγω περιοχή έχουμε διπλασιασμό και του γονιδίου SMN1 (Vamshi.etal., 2018, S(24),(12).

Η δομή των γονιδίων SMN1 και 2 απαρτίζεται από εννέα εξόνια τα οποία ονομάζονται εξόνιο 1, 2α, 2β και 3 έως 8 . Μεταλλαγές στο γονίδιο SMN1 προκαλούν τη νόσο SMA ενώ αλλαγές στη αλληλουχία του SMN2 επηρεάζουν την έκφραση της νόσου. (Vamshi.etal, 2018 ,S(24),(12).) Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το γονίδιο SMN2 παράγει σε μικρό ποσοστό (~15%) SMN και λειτουργική πρωτεΐνη SMN, πλήρους μήκους. Έτσι, η απώλεια του SMN1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων SMN στους περισσότερους ιστούς αλλά η έκφραση του SMN2 δρα συμπληρωματικά τροποποιώντας την κλινική εικόνα της SMA (εικόνα 1.2) (Burghes and Beattie, 2009, 10(8),pp597-603)

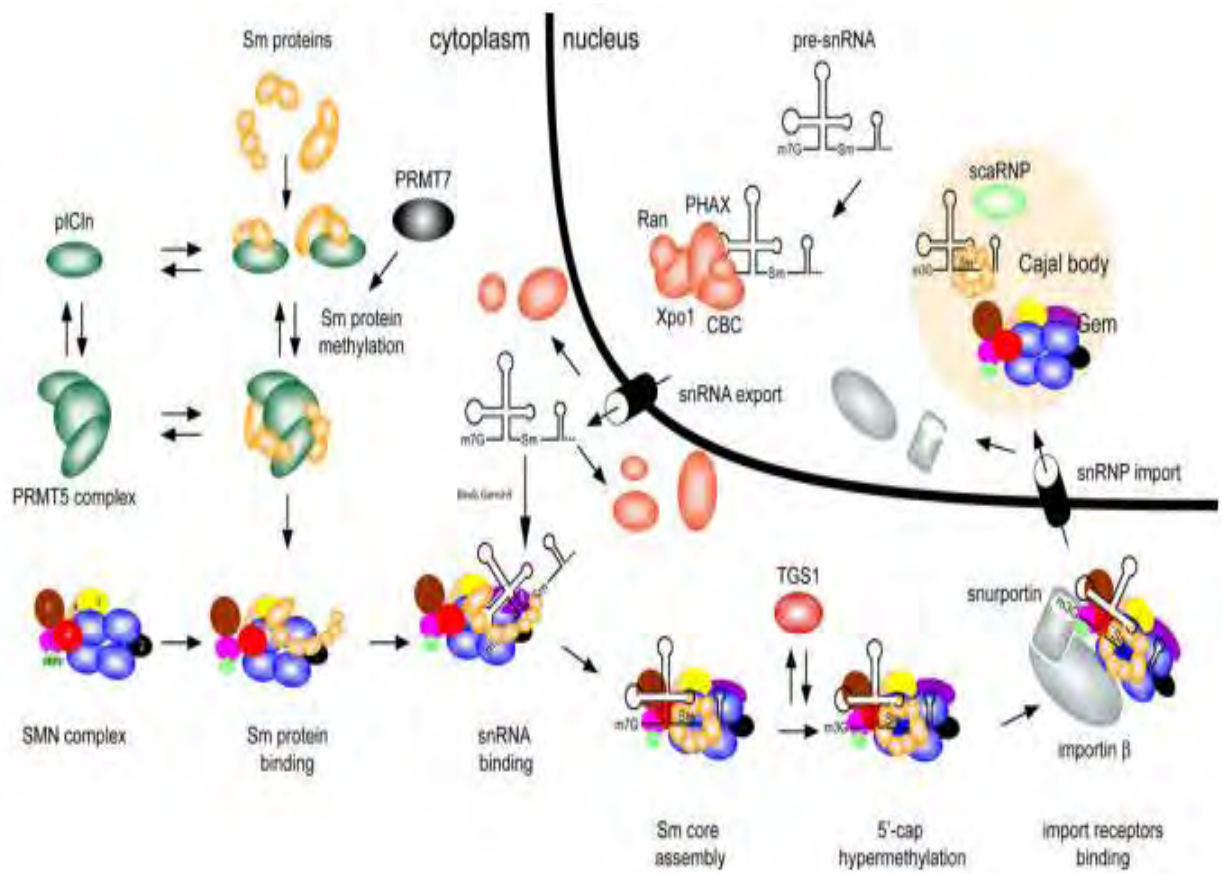


Εικόνα 1.2: Σχηματικό διάγραμμα του γονιδίου SMN (KolbandKissel, 2015)

Η πρωτεΐνη SMN έχει μοριακό βάρος 38 kD, αποτελείται από 294 αμινοξέα και εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα του κυττάρου. Μέσα στον πυρήνα, η πρωτεΐνη ολιγομερίζεται μέσα σε δομές οι οποίες ονομάζονται “GEMS” (Gemini of the coiled bodies) και συνήθως ευρίσκονται κοντά στα σωμάτια Cajal. Οι “GEMS” περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (small nucleus Ribo-nucleoproteins, snRNPs) που συμμετέχουν στην ωρίμανση του mRNA, καθώς και πρωτεΐνες οι οποίες ονομάζονται “gemins”. Οι δομές αυτές φαίνεται ότι λειτουργούν ως θέσεις ρύθμισης της παραγωγής και μεταφοράς των snRNPs. Αν και ο ρόλος της πρωτεΐνης SMN δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, φαίνεται ότι η ελάττωση της έχει επίδραση σε παράγοντες που είναι σημαντικοί για τη διαδικασία του ματίσματος, το μεταβολισμό του RNA (Vamshi.etal, 2018, S(24),(12).

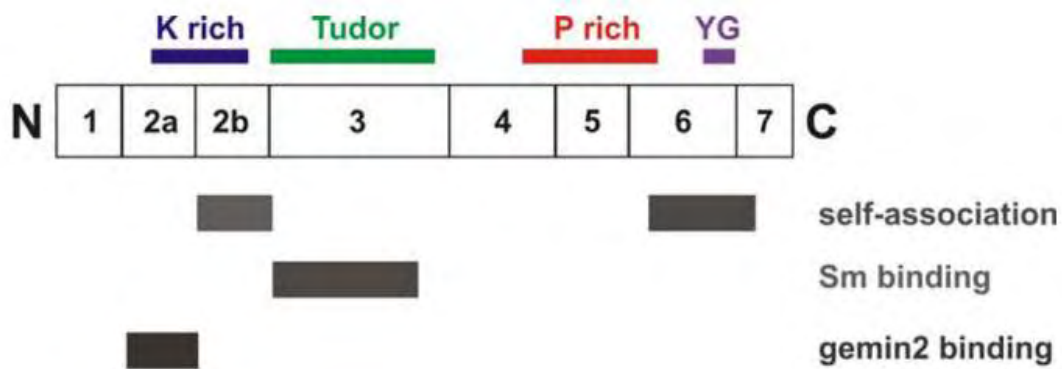
Οι snRNPs αναγνωρίζουν και αφαιρούν ιντρόνια κατά την ωρίμανση του προ-mRNA. Κάθε σωματίδιο snRNP αποτελείται από μικρό πυρηνικό RNA (snRNA) περίπου 150 νουκλεοτιδίων, αρκετές Sm πρωτεΐνες και έναν αριθμό ειδικών πρωτεϊνών που είναι μοναδικές για κάθε snRNP. Η SMN συνεργεί στη βιογένεση των snRNPs

συμμετέχοντας στη συγκέντρωση Sm πρωτεϊνών επάνω στα snRNAs ώστε να δημιουργηθεί ένα ενεργό snRNP σωματίδιο το οποίο όπως προαναφέρθηκε αποτελεί σημαντικό συστατικό των σωματιδίων ματίσματος (neucleosomes). Η βιογένεση των snRNP εκτυλίσσεται σε διάφορα στάδια. Πρώτα, το snRNA μεταγράφεται στον πυρήνα και μεταφέρεται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα SMN μεσολαβεί στη συναρμολόγηση ενός δακτυλίου πρωτεϊνών Sm γύρω από το κατάλληλο σημείο πάνω στο μόριο snRNA. Μετά την ορθή συναρμολόγηση με τις πρωτεΐνες Sm, το snRNA τροποποιείται μέσω μεθυλίωσης στο 5' άκρο. Αυτό το σύμπλεγμα στη συνέχεια μεταφέρεται ξανά στον πυρήνα όπου λαμβάνει μέρος στην ωρίμανση του προ-mRNA σε mRNA. (εικόνα 1.3).



**Εικόνα 1.3:** Η λειτουργία της SNP (BurghesandBeattie, 2009)

Στην εικόνα 1.4 φαίνεται αναλυτικά η αντιστοιχία μεταξύ των τμημάτων του γονιδίου SMN1 και των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης SMN. Έτσι το εξόνιο 2B κωδικοποιεί πρωτεϊνική περιοχή που είναι σημαντική για τη σύνδεση της πρωτεΐνης Gemin2 καθώς και για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης SMN. Η αλληλουχία των εξονίων 2A και 2B είναι ιδιαίτερα συντηρητική και πλούσια στο αμινοξύ λυσίνη (K), το εξόνιο 3 κωδικοποιεί την περιοχή Tudor η οποία παρουσιάζει ομολογία με ανάλογες περιοχές άλλων γονιδίων. Η περιοχή Tudor δεσμεύει τις Sm πρωτεΐνες. Το εξόνιο 5 και μέρος του εξονίου 6 κωδικοποιούν για περιοχή πλούσια σε προλίνη (P) που μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση προφίλνης. Η καρβοξυτελική περιοχή του εξονίου 6 περιέχει τη συντηρητική περιοχή YG box η οποία είναι σημαντική για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης. (Burghes and Beattie, 2009, 10(8),pp597-603)



**Εικόνα 1.4:** Οι επικράτειες της πρωτεΐνης SMN (BurghesandBeattie, 2009)

## 1.2 Κλινικά Χαρακτηριστικά-Κλινικοί Τύποι

Η SMA περιγράφηκε αρχικά το 1890 και το 1891 από τους GuidoWerdning και Johan Hoffman αντίστοιχα, ως ένα σύνδρομο με προοδευτική ατροφία, αδυναμία και θάνατο στην παιδική ηλικία, παιδιών από υγιείς γονείς. Και οι δύο ιατροί είχαν παρατηρήσει σοβαρή ατροφία και είχαν ιστολογικά ευρήματα που έδειχναν απώλεια των εμπρόσθιων κεράτων των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. (Iannaccone ST., 1998, Semin.Neurol, 18(1), pp19-26)

Σήμερα η νόσος SMA θεωρείται μία από τις πιο συχνές αιτίες βρεφικής θνησιμότητας γενετικής αιτιολογίας. Η νόσος χαρακτηρίζεται κυρίως από εκφυλισμό των προσθίων κεράτων των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Εμφανίζεται σε νηπιακή ή σε παιδική ηλικία, με προοδευτική ατροφία και μυϊκή αδυναμία των άκρων με απώλεια της κινητικότητας των άκρων και του κορμού, και προοδευτικά της κατάποσης και της αναπνοής. Οι νοητικές λειτουργίες διατηρούνται. Η αδυναμία των άκρων είναι συμμετρική, κυρίως κεντρομελική και αρχίζει από τα κάτω άκρα. Στην πορεία της νόσου προσβάλλονται οι μυς που νευρώνονται από το εγκεφαλικό στέλεχος προκαλώντας αναπνευστική δυσχέρεια, ατροφία και δεσμιδώσεις της γλώσσας. Αρκετοί ασθενείς παρουσιάζουν τρόμο χεριών στην έκταση των άνω άκρων. Τα τενόντια αντανακλαστικά δεν παράγονται ή εμφανίζονται μειωμένα, ενώ τα πελματιαία όταν παράγονται είναι φυσιολογικά. Σεπροχωρημένοστάδιοπροσβάλλονταιιαναπνευστικοίμύεςενώτομυοκάρδιοκαιοιλίοιμύεςπαρουσιάζουνφυσιολογικήλειτουργία.

Η νόσος παρουσιάζει μεγάλη κλινική και γενετική ετερογένεια. Σύμφωνα με τη ηλικία έναρξης και τη βαρύτητα των κλινικών χαρακτηριστικών η SMA διακρίνεται στους εξής 5 τύπους (Farr and Kiernan, 2015, pp.290-302)

- **SMA τύπου 0**

Η νωτιαία μυϊκή ατροφία τύπου 0 χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα νεογνά που παρουσιάζουν σοβαρή αδυναμία και υποτονία και έχουν ιστορικό μειωμένων εμβρυϊκών κινήσεων. Στην περίπτωση αυτή, η αδυναμία είναι πιθανώς προγεννητική. Κατά την εξέταση τα βρέφη με τύπο 0 μπορεί να έχουν συμμετρική μείωση αντανακλαστικών, παράλυση προσώπου και βλάβες στους κόλπους της καρδιάς - Η αναπνευστική ανεπάρκεια είναι ένα πρώιμο συμβάν. Το προσδόκιμο ζωής μειώνεται και οι περισσότεροι ασθενείς δεν μπορούν να επιβιώσουν πέραν των 6 μηνών (Kolb and Kissel, 2015, 33(4), pp.831-841)

- **SMA τύπου 1**

Τα βρέφη με τύπου 1 SMA, επίσης γνωστή ως νόσος Werdnig-Hoffman, παρουσιάζονται με υποτονία, αδυναμία ελέγχου κεφαλής και μειωμένα ή απόντα αντανακλαστικά στους τένοντες πριν από την ηλικία των 6 μηνών. Εξ ορισμού, δεν επιτυγχάνουν ποτέ τη δυνατότητα να κάθονται χωρίς βοήθεια. Η βαθιά υποτονία μπορεί να εκδηλωθεί ως στάση «frogleg» όταν είναι αδύναμος ή όταν απουσιάζει ο έλεγχος της κεφαλής. Η αδυναμία των μεσοπλευρίων μυών, με σχετική διατήρηση του διαφράγματος, παράγει ένα μοτίβο παράδοξης αναπνοής σε σχήμα καμπάνας που μερικές φορές αναφέρεται ως "κοιλιά-αναπνοής". Τα βρέφη με τύπου 1 SMA αναπτύσσουν αδυναμία στη γλώσσα και την κατάποση και συχνά υπάρχουν γλωσσικές συσπάσεις. Επιπλέον αναπτύσσεται και αδυναμία στους μύς του προσώπου, αν και αυτό συνήθως δεν εμφανίζεται νωρίς στην πορεία της νόσου. Καθώς η γλώσσα και οι φαρυγγικοί μύες αποδυναμώνουν, αυτά τα βρέφη διατρέχουν τον κίνδυνο να πάθουν αναρρόφηση. Τα βρέφη με τύπου 1 SMA συνήθως αναπτύσσουν αναπνευστική ανεπάρκεια πριν από 2 χρόνια ζωής. Παρά τη βαθιά αδυναμία, η νοημοσύνη σε αυτά τα βρέφη είναι φυσιολογική (Arnold and Burghes, 2013, 74(3), pp.348-362).

- **SMA τύπου 2**

Τα παιδιά με τύπου 2 SMA είναι σε θέση να καθίσουν χωρίς βοήθεια σε κάποιο σημείο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Ωστόσο, δεν είναι ποτέ σε θέση να περπατήσουν ανεξάρτητα. Αυτή η ενδιάμεση μορφή SMA τείνει να εκδηλωθεί ως προοδευτική κεντρική αδυναμία ποδιών που είναι μεγαλύτερη από την αδυναμία στα χέρια. Υπάρχει υποτονία και μείωση αντανακλαστικών κατά την εξέταση. Πολλές από τις συνοσηρότητες σε αυτόν τον πληθυσμό ασθενών σχετίζονται με τις ορθοπεδικές επιπλοκές του οστού και την κοινή ανάπτυξη στην ρύθμιση της μυϊκής αδυναμίας και την προοδευτική σκολίωση, ακόμη μπορεί να αναπτυχθούν συμπτώματα και αγκύλωση της κάτω γνάθου. Ο συνδυασμός σκολίωσης και αδυναμία των μεσοπλευρίων μυών μπορεί επίσης

να οδηγήσει σε σημαντική περιοριστική πνευμονική νόσο. Σε αυτά τα παιδιά, η νοημοσύνη είναι φυσιολογική(Kolb.and Kissel, 2015, 33(4),pp.831-841)

- **SMA τύπου 3**

Τα παιδιά και οι ενήλικες με τύπου 3 SMA, που επίσης αναφέρεται ως ασθένεια Kugelberg-Welander, μπορούν να περπατήσουν χωρίς βοήθεια κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Παρουσιάζουν προοδευτική αδυναμία των ποδιών περισσότερο σε σχέση με τα χέρια. Η αδυναμία ποδιών μπορεί να απαιτεί την χρήση αναπηρικού αμαξιδίου σε κάποιο στάδιο της ζωής των ασθενών με SMA τύπου 3. Αντίθετα, με τα άτομα με SMA τύπου 2, δεν υπάρχουν οι συνιστώσες της σκολίωσης και έχουν μικρή ή καθόλου αναπνευστική μυϊκή αδυναμία. Η νοημοσύνη και το προσδόκιμο ζωής δεν μεταβάλλονται σε αυτόν τον τύπο(Arnold.and Burghes, 2013, 74(3),pp.348-362).

- **SMA τύπου 4**

Πρόκειται για τον ηπιότερο φαινότυπο. Οι περιπτώσεις της SMA τύπου 4 αντιπροσωπεύουν <5% των περιπτώσεων SMA και έχουν την ηπιότερη μορφή της νόσου. Αυτά τα άτομα είναι σε θέση να περπατούν και παρουσιάζουν παρόμοια συμπτωματολογία με τους ασθενείς τύπου 3, ωστόσο η νόσος εμφανίζεται κατά την ενήλικη ζωή, στην ηλικία των 30 ετών ή αργότερα, αλλά μπορεί να είναι και νεανική(Arnold.and Burghes, 2013, 74(3),pp.348-362).



### 1.3 Γενετική Διάγνωση

Η γενετική διάγνωση της SMA περιλαμβάνει τεχνικές μοριακής γενετικής, όπως η πολλαπλή ενίσχυση υβριδοποιημένων ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (Multiplex Ligation–dependant Probe Amplification,MLPA), για την ανίχνευση της ομόζυγης διαγραφής του γονιδίου SMN1 σε ασθενείς με τυπικά συμπτώματα για τη νόσο. Σε περιπτώσεις όπου τα κλινικά συμπτώματα είναι συμβατά με την SMA, αλλά ανιχνεύεται ένα αντίγραφο SMN1,πραγματοποιείται αλληλούχιση κατά Sanger (sequencing) ώστε να διερευνηθεί η πλήρης ακολουθία του SMN1για σημειακές μεταλλαγές.

Κατά τη γενετική διάγνωση ανιχνεύεται και ο αριθμός αντιγράφων του SMN2. Η ανίχνευση των SMN2 αντιγράφων πραγματοποιείται με MLPAκαι είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, ο αριθμός των αντιγράφων SMN2 συσχετίζεται άμεσα με τη σοβαρότητα της νόσου.(Vamshi.etal, 2018), S(24),(12-a).

Η μοριακή γενετική διάγνωση είναι σήμερα η κύρια μέθοδος διάγνωσης της SMA και έχει περιορίσει παλαιότερες και πιο επεμβατικές εξετάσεις διάγνωσης όπως ηλεκτρο- φυσιολογικό έλεγχο και βιοψία μυός. Ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος και η βιοψία μυός περιορίζονται πλέον μόνο για την αξιολόγηση άτυπων ασθενών ή ασθενών με αρνητικό γενετικό έλεγχο.(Orthop.TraumatolSurgRes. 2018 Feb 104(15) :589-595).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο προσυμπτωματικός έλεγχος νεογνών για SMA έχει συμπεριληφθεί ως προτεινόμενος στο σύστημα υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής ενώ γίνονται προσπάθειες και για την προώθηση και του πρόγεννητικού ελέγχου της νόσου. (Wood.etal., 2017, 871,pp.49-71)

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

## **Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία -Συμπτωματική Θεραπεία**

## 2.1 Κλινική διαχείριση

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, σημειώθηκε αξιοσημείωτη βελτίωση στην ικανότητα των κλινικών για τη διαχείριση των πολλαπλών αναπνευστικών, θρεπτικών, ορθοπεδικών, αποκαταστατικών, συναισθηματικών και κοινωνικών προβλημάτων που αναπτύσσονται στην πλειονότητα αυτών των ασθενών (Arnold and Burghes, 2013, 74(3), pp.348-362)

- **Αναπνευστικές επιπλοκές:**

Η τελική αιτία θανάτου σε βρέφη και παιδιά με SMA τύπου 1 και 2 είναι συνήθως αναπνευστική ανεπάρκεια. Υπάρχει πρόωρη εμπλοκή των αναπνευστικών μυών του εξαερισμού με σχετική διατήρηση του διαφράγματος. Σε βρέφη με τύπου 1 SMA, η έγκαιρη εφαρμογή μη ενισχυτικής υποστήριξης αερισμού έχει αποδειχθεί σημαντική για τη βελτίωση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής. Η θετική διπλή στάθμη των αεραγωγών, όταν εφαρμόζεται με τις κατάλληλες ρυθμίσεις πίεσης και την τοποθέτηση της μάσκας, είναι καλά ανεκτή, δεν επηρεάζει την αιμοδυναμική ισορροπία, μπορεί να αυξήσει τη χημειο-ευαισθησία και να βελτιώσει την αεραγωγό κατά τη διάρκεια της ημέρας. Οι ασθενείς με αυτόν τον βαθμό αναπνευστικής ανεπάρκειας έχουν επίσης έναν αδύναμο βήχα, ο οποίος τους θέτει σε αυξημένο κίνδυνο αναρρόφησης και υποξαιμίας δευτερογενώς προς την προσκόλληση βλέννας καθώς και αυξημένο κίνδυνο επαναλαμβανόμενων πνευμονικών λοιμώξεων. Τα νεογνά που διατρέχουν κίνδυνο εμφάνισης βλέννας πρέπει να παρακολουθούνται με οξυμετρία κατά τη διάρκεια της νύχτας, κατά τη διάρκεια οξείας ασθένειας και συνιστώνται μέθοδοι υποβοηθούμενης εκκαθάρισης των αεραγωγών, όπως η χειροκίνητη αναρρόφηση. Γενικά, η χρήση αντιβιοτικών θα πρέπει να εφαρμόζεται σε αυτά τα βρέφη κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε οξείας ασθένειας, για τον κίνδυνο πνευμονίας και σχετικής πνευμονικής επιπλοκής. Ο στόχος της πνευμονικής παρέμβασης στα βρέφη τύπου 1 είναι η βελτίωση της ποιότητας ζωής και όχι κατ'ανάγκη η παράταση της ζωής (Kolb and Kissel, 2015, 3394), pp.831-841)

Η διαχείριση της αναπνευστικής λειτουργίας στα παιδιά με τύπου 2 SMA είναι παρόμοια με εκείνη των βρεφών τύπου 1, ωστόσο οι επιπλοκές είναι λιγότερο σοβαρές. Η φυσική εξέταση και η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του βήχα και της λειτουργίας των αναπνευστικών μυών θα πρέπει να παρακολουθούνται ρουτίνα. Για τα παιδιά ηλικίας άνω των 5 ετών, η αναγκαστική ζωτική ικανότητα μπορεί να παρακολουθείται συστηματικά και η μη επεμβατική υποστήριξη αερισμού μπορεί να αντιμετωπιστεί μακροπρόθεσμα. Ο νυχτερινός υποαερισμός πρέπει επίσης να αντιμετωπίζεται με μη επεμβατικό αερισμό (Lorson.etal, 2010, 19(R1),pp.R111-R118).

- **Γαστρεντερικές και διατροφικές επιπλοκές:**

Οι γαστρεντερικές επιπλοκές είναι συχνές σε άτομα με SMA και δεν είναι σαφές εάν αυτό οφείλεται στην ακινησία και τις διατροφικές ανεπάρκειες ή αν υπάρχει ένα πρωταρχικό ελάττωμα στη γαστρεντερική κινητικότητα. Τα βρέφη με τύπου 1 SMA συχνά έχουν παρατεταμένους χρόνους σίτισης. Αυτή η μείωση στη σίτιση μπορεί να είναι το πρώτο σημάδι της προοδευτικής αδυναμίας και μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία ευημερίας και αναρρόφηση. Η δυσλειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος περιλαμβάνει τη δυσκολία της σίτισης και της κατάποσης λόγω της δυσλειτουργίας των βολβών και εκδηλώνεται ως αδυναμία της γλώσσας, δυσκολία στο άνοιγμα του στόματος και ανεπαρκής έλεγχος της κεφαλής. Άλλα συναφή προβλήματα περιλαμβάνουν γαστρεντερική αναρροή, καθυστερημένη γαστρική εκκένωση και δυσκοιλιότητα. Αυτές οι επιπλοκές παρατηρούνται επίσης σε άτομα τα οποία, για άλλους λόγους, δεν μπορούν να καθίσουν ή να σταθούν, και είναι λιγότερο εμφανή σε άτομα με SMA (Kolb.and Kissel, 2015, 33(4),PP831-841).

Η διαχείριση της αναρρόφησης που σχετίζεται με τη σίτιση και τη δυσφαγία περιλαμβάνει τη μεταβολή της συνοχής των τροφίμων ώστε να συμπεριλαμβάνονται τα ημιστερέα και τα παχύρευστα υγρά. Ωστόσο, σε βρέφη με SMA τύπου 1, συνιστάται η έγκαιρη λαπαροσκοπική Nissen fundoplication (εάν υπάρχει γαστρεντερική παλινδρόμηση) λόγω της σπουδαιότητας διατήρησης της σωστής διατροφής και της μείωσης του κινδύνου μόλυνσης δευτερογενώς κατά την αναρρόφηση. Η χειρουργική επέμβαση μπορεί να πραγματοποιηθεί σύντομα μετά

τη διάγνωση, όταν το βρέφος είναι υγιές, έτσι ώστε το βρέφος να μην πεινάει καθώς η στοματική τροφή μειώνεται(Lorson.etal, 2010, 19(R1),pp.R111-R118).

Ο υποσιτισμός μπορεί επίσης να είναι ένα ύπουλο πρόβλημα για ορισμένα παιδιά και εφήβους με SMA. Ο υποσιτισμός και οι περιόδους νηστείας πρέπει να αποφεύγονται, καθώς αυτές οι συμπεριφορές μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της μυϊκής μάζας και στη μετέπειτα εξασθενημένη λειτουργία. Στην πραγματικότητα, τα υψηλά λειτουργικά, μη περιπατητικά άτομα με SMA είναι επιρρεπή σε λιποθυμία, παρά την χαμηλή κατανάλωση ενέργειας ανάπαυσης και κινδυνεύουν να γίνουν υπέρβαρα. Για τη διαχείριση αυτών των επιπλοκών, κάθε παιδί θα πρέπει να αξιολογείται μεμονωμένα κατά τη διάρκεια επισκέψεων ρουτίνας από διαιτολόγο με στόχο τη διατήρηση της καμπύλης ανάπτυξης και την αποφυγή ανεπαρκούς ή υπερβολικής πρόσληψης. Λόγω της τάσης για μειωμένη οστική πυκνότητα με αυξανόμενη ηλικία, πρέπει να παρέχεται επαρκής πρόσληψη βιταμίνης D και ασβεστίου(Lorson.etal, 2010, 19(R1),pp.R111-R118).

- **Ορθοπεδικές και μυοσκελετικές επιπλοκές:**

Η αδυναμία και η μειωμένη κινητικότητα προδιαθέτουν σε πολλά μυοσκελετικά προβλήματα. Η έγκαιρη αναγνώριση και η κατάλληλη διαχείριση βοηθούν στη διατήρηση της λειτουργίας, αποτρέποντας την επιδείνωση της ζωτικής σημασίας ικανότητας και βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής. Σε μη περιπατητικά άτομα με SMA, οι συσπάσεις είναι κοινές και τα κανονικά προγράμματα επέκτασης και στήριξης για να διατηρηθεί η ευελιξία και να αποφευχθούν οι συμβολοσειρές είναι οι κύριοι στόχοι της θεραπείας. Οι χειροκίνητες και μηχανοκίνητες αναπηρικές καρέκλες μπορούν να ξεκινήσουν ήδη από την ηλικία των 18-24 μηνών. Η φυσικοθεραπεία μπορεί να βοηθήσει στη μεγιστοποίηση της αντοχής, της φυσικής κατάστασης και της ασφάλειας, ενσωματώνοντας δραστηριότητες όπως η κολύμβηση, η υδρόβια θεραπεία και τα προσαρμοστικά αθλήματα. Η νευρομυϊκή κόπωση φαίνεται να συμβάλλει σε λειτουργικούς περιορισμούς σε άτομα με SMA. Οι αναπηρικές καρέκλες και οι τροποποιήσεις στο περιβάλλον και στο σπίτι θα πρέπει να θεωρούνται ότι επιτρέπουν την ασφαλή προσβασιμότητα και τη βελτιστοποίηση της ανεξαρτησίας(Kolb.and Kissel, 2015, 33(4),pp.831-841)

Η σκολίωση εμφανίζεται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με SMA. Όταν δεν υποβάλλονται σε θεραπεία, η σκολίωση προκαλεί παραμορφώσεις στο θώρακα με επακόλουθο αναπνευστικό περιορισμό. Η σπονδυλική σύντηξη και η στήριξη είναι οι θεραπείες επιλογής για σκολίωση, ωστόσο δεν υπάρχει σαφής συναίνεση για την αποτελεσματικότητά τους(Lorson.etal, 2010, 19(R1),pp.R111-R118).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

## Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία- Γενετική Θεραπεία

### 3.1 Στοιχεία Γενετικής Θεραπείας

Όπως έχει προαναφερθεί, τα τελευταία χρόνια, η συμβολή της βιοτεχνολογίας στην προαγωγή της σύγχρονης ιατρικής πρακτικής έχει συνδράμει καθοριστικά στη θεραπεία πολλών θανατηφόρων νοσημάτων. Αυτό έχει πραγματοποιηθεί τόσο, μέσω της παραγωγής νέων καινοτόμων βιοτεχνολογικών φαρμακευτικών σκευασμάτων όσο και μέσω νέων εξελιγμένων διαγνωστικών γενετικών ελέγχων.

Οι νέες γενιάς βιολογικοί παράγοντες που παρασκευάζονται με τις μεθόδους της βιοτεχνολογίας προορίζονται, κυρίως, για την αντιμετώπιση εξαιρετικά επικίνδυνων ασθενειών, όπως αιματολογικές διαταραχές, αυτοάνοσα νοσήματα, διάφορες μορφές καρκίνου, νευροεκφυλιστικά νοσήματα κ.α.

Η βιοτεχνολογία, η χρήση δηλαδή βιολογικών διαδικασιών για την παραγωγή σκευασμάτων και την επίλυση ιατρικών προβλημάτων, χρησιμοποιείται πλέον ευρέως, αξιοποιώντας τα επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας και της γενετικής.

Η παραγωγή εμβολίων, χημικών και βιολογικών αντιδραστηρίων, η γονιδιακή θεραπεία γενετικών νόσων, η προεμφυτευτική διάγνωση, η μελέτη του φαινομένου της γήρανσης και η έρευνα για τη δημιουργία ιστών από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι μόνο μερικά από τα επιτεύγματα της βιοτεχνολογίας στην ιατρική.

Στο πλαίσιο αυτό, μετά από χρόνια πειραματικών μελετών, έχει σήμερα εγκριθεί η χρήση αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων (antisenseoligonucleotidesASO's) καθώς και η γονιδιακή θεραπεία μέσω αδενοϊού για την αιτιολογική θεραπεία της SMA.



### 3.1.1 Αντινοσηματικά ολιγονουκλειοτίδια

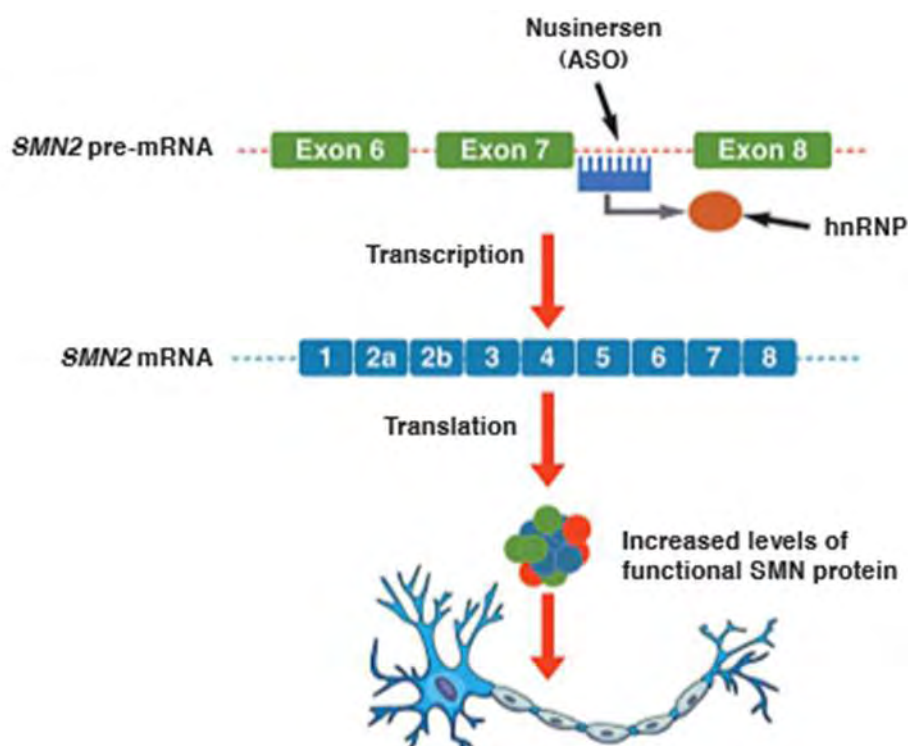
Τα αντινοσηματικά ολιγονουκλειοτίδια (antisense oligonucleotides , ASOs) είναι συνθετικά μονόκλινα ολιγονουκλειοτίδια DNA (8-50 bp) συμπληρωματικά των μεταγραφημάτων (mRNA) του γονιδίου-στόχου. Τα ASOs υπόκεινται σε χημικές τροποποιήσεις έτσι ώστε κατά πρώτον να αυξηθεί η συμπληρωματικότητα τους προς το γονίδιο στόχο και κατά δεύτερο να είναι προστατευμένα από τις κυτταρικές ενδονουκλεάσες. Ανάλογα με την σχεδιασμό τους έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται ειδικά στο mRNA του γονιδίου-στόχου και είτε να τροποποιούν την ωρίμανσή του (splicing modulation) είτε να παρεμποδίζουν πλήρως τη μεταγραφή του. Στο ΚΝΣ μεταφέρονται με ενδοραχιαία έγχυση και στη συνέχεια εισέρχονται στα νευρικά κύτταρα μέσω ενδοκύττωσης . (Son.and Yokota, 2018, 1828,pp.57-68)

Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των ASO's μπορούν να ενισχυθούν με τροποποίηση της χημικής δομής του νουκλεοτιδίου ή του δακτυλίου του σακχάρου. Η χημική τροποποίηση επηρεάζει την σταθερότητα, την τοξικότητα και τελικά τη λειτουργικότητα των ASO's. (Wertz.and Sahin, 2016, 1366(1),pp.5-19).

Το γονίδιο SMN αποτέλεσε και αποτελεί ιδανικό υποψήφιο στόχο για θεραπεία μέσω ASO's. Αυτό διότι, όπως προαναφέρθηκε, όλοι οι ασθενείς με SMA φέρουν το ομόλογο γονίδιο SMN2 που είναι ένας ιδανικός στόχος για εφαρμογή αντινοσηματικής θεραπείας. Σε σύγκριση με το γονίδιο SMN1, η αντικατάσταση C-T στο εξόνιο 7 του γονιδίου SMN2 προκαλεί όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, σε απαλοιφή του του εξονίου 7 από την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου η οποία οδηγεί σε μείωση κατά 90% της πλήρους πρωτεΐνης SMN. Προκλινικές μελέτες με του ειδικού ολιγονουκλειοτιδίου ISIS 396442 έδειξαν ότι είτε η ενέσιμη περιφερική είτε η ενδοκοιλιακή (ICV) ένεση αυτού του ASO σε μοντέλα ποντικών καταλήγει σε σταθερή in vivo διάσωση της πλήρους μήκους SMN στο νωτιαίο μυελό. Σε σύγκριση με τα άλλα χημικά τροποποιημένα ASOs, το ISIS 396443 ήταν πιο ισχυρό οδηγούσε σε αποτελεσματικότερη ωρίμανση και έκφραση του γονιδίου SMN2 σε όλο το ΚΝΣ, τόσο στο νωτιαίο μυελό όσο και στον εγκέφαλο. (Messina, 2018, pp.251).

### 3.1.2 Nusinersen \_2016

Τον Δεκέμβριο του 2016, ο FDA ενέκρινε το Nusinersen (SPINRAZA), ένα ASO για τη θεραπεία όλων των τύπων SMA. Το Nusinersen έχει σχεδιαστεί για να δεσμεύει μια περιοχή ματίσματος σε προ-mRNA του SMN2, μετατοπίζοντας μια πρωτεΐνη καταστολέα ματίσματος και ενισχύοντας τη μεταγραφή πλήρους μήκους SMN2 mRNA (Εικόνα 3.1). Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στη μετάφραση πλήρους μήκους, σταθερής και λειτουργικής πρωτεΐνης SMN. Επειδή τα ASO's δεν έχουν τη δυνατότητα να ξεπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, το Nusinersen χορηγείται με ενδοραχιαία έγχυση. (Vamshi.etal, 2018), (JClininvest 2018 Aug. 1, 128(8):3219-3227)



Εικόνα 3.1: Ο τρόπος δράσης του Nusinersen(Vamshi.etal, 2018)

Έως σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το Nusinersen βελτιώνει την κλινική εικόνα της SMA χωρίς να προκαλεί σημαντικές παρενέργειες. Σε όλες τις κλινικές δοκιμές, υπήρξε μία αρχική περίοδος στην οποία το Nusinersen χορηγήθηκε

ενδορραχιαία τέσσερις φορές σε διάστημα δύο μηνών, ακολουθούμενη από μια περίοδο συντήρησης με εγχύσεις κάθε τέσσερις μήνες.

Το ENDEAR είναι μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη από ψευδή αποτελέσματα μελέτη, φάσης III (ClinicalTrials.govidentifier: NCT02193074), που διεξήχθη κατά τα έτη 2014-2016 για την εκτίμηση της κλινικής αποτελεσματικότητας και ασφάλειας του Nusinersen που χορηγήθηκε ενδορραχιαία σε SMA βρεφικής εκδήλωσης.(Mendell, 2017, 377,pp.1713-1722).

Τα αρχικά αποτελέσματα ήταν το ποσοστό των ανταποκριτών στο κινητικό - ορόσημο (που βασίστηκε στη βελτίωση των κατηγοριών ορόσημων του κινητήρα της νευρολογικής εξέτασης για βρέφη Hammersmith) και του χρόνου μέχρι το θάνατο ή τον μόνιμο εξαερισμό. Στην προσωρινή ανάλυση, τα βρέφη που έλαβαν θεραπεία με nusinersen είχαν υψηλότερες αποκρίσεις ορόσημων από τους μάρτυρες (41% έναντι 0%,  $p<0,001$ ) και συνεπώς η δοκιμή σταμάτησε και οι ασθενείς συνέχισαν τη θεραπεία σε μια ανοιχτή μελέτη επέκτασης (SHINE). Επιπλέον, η ομάδα nusinersen είχε μεγαλύτερες περιόδους επιβίωσης και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέχρι τον μόνιμο εξαερισμό σε σύγκριση με τους μάρτυρες(Messina, 2018, pp.251).

Το CHERISH ήταν μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη από ψευδή αποτελέσματα μελέτη (ClinicalTrials.govidentifier: NCT02292537, που διεξήχθη κατά τα έτη 2014-2017) για την αξιολόγηση της κλινικής αποτελεσματικότητας και ασφάλειας του nusinersen που χορηγήθηκε ενδορραχιαία σε ασθενείς με όψιμη έναρξη SMA. Το κύριο μέτρο έκβασης ήταν η αλλαγή από τη βασική γραμμή της βαθμολογίας HammersmithFunctionalScale-Expanded (HFMSSE) μετά από 15 μήνες θεραπείας. Στην ενδιάμεση ανάλυση, η ομάδα nusinersen είχε μία μέση αύξηση 4,0 μονάδων έναντι μιας μέσης μείωσης των 1,9 βαθμών στους μάρτυρες ( $p<0,001$ ). Για το λόγο αυτό, η δοκιμή περατώθηκε και οι ασθενείς συμπεριλήφθηκαν στην προαναφερθείσα μελέτη SHINE. Στην τελική ανάλυση, το 57% των ασθενών με nusinersen έναντι 26% στην ψευδή ομάδα εμφάνισε άνοδο 3 βαθμών σε βαθμολογίες HFMSSE μετά από 15 μήνες θεραπείας.(Mendell, 2017, 377,pp.1713-1722).

Το NURTURE είναι μια ανοιχτή μελέτη (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02386553, που ξεκίνησε το 2015 και συνεχίζεται) για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια, η ανεκτικότητα και η φαρμακοκινητική πολλαπλών ενδορραχιαίων δόσεων nusinersen που χορηγούνται σε προσυμπτωματικά βρέφη SMA ηλικίας μικρότερης των έξι εβδομάδων. Οι επιδράσεις του nusinersen ήταν ενθαρρυντικές, με τη βελτίωση των ορόσημων και των παραμέτρων αύξησης των μοσχευμάτων, χωρίς θανάτους και χωρίς εξαερισμό μετά από 323 ημέρες. Τα ευνοϊκά αποτελέσματα αυτής της δοκιμής υποστηρίζουν το σκεπτικό για τη διαγνωστική εξέταση του νεογέννητου SMA, έτσι ώστε η θεραπεία να μπορεί να ξεκινήσει νωρίτερα και να επιτευχθούν μεγαλύτερες βελτιώσεις. Η μελέτη SHINE (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02594124) ξεκίνησε το 2017 με στόχο την αξιολόγηση των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων του nusinersen από την άποψη των κλινικών αλλαγών και της ανοχής και εξακολουθεί να είναι σε εξέλιξη (Summer and Crawford, 2018, *clin.inv.*2018,128,pp.3219-3227).

Όπως φαίνεται και από τα προαναφερόμενα ο δρόμος προς την πρώτη εγκεκριμένη από την FDA θεραπεία ASO για τη SMA ανοίχτηκε από πολυάριθμες ερευνητικές ομάδες και μετά από χρόνια λεπτομερούς προκλινικής εργασίας, η οποία έχει προηγουμένως περιγραφεί από εμπειρογνώμονες. (Messina, 2018, pp.251)

Η μετάβαση από προκλινικές σε κλινικές μελέτες προχώρησε ταχύτατα από τους IonisPharmaceuticals και Biogen. Ο σκοπός της δοκιμής κλινικής φάσης 1 ήταν πρωτίστως να προσδιοριστεί η ασφάλεια, η ανεκτικότητα και η φαρμακοκινητική μίας μόνο ενδορραχιαίας δόσης Nusinersen. Συνολικά, 28 ασθενείς με SMA τύπου II και III χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες που έλαβαν μία μόνο δόση του φαρμάκου (1, 3, 6 ή 9 mg). Το Nusinersen χορηγήθηκε απευθείας στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) ενδορραχιαία, καθώς η χημεία του [2'-O- (2-μεθοξυαιθυλ) (2'-MOE)] δεν του επιτρέπει να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ώστε να εισέλθει στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) όταν χορηγείται συστηματικά (π.χ. ενδοφλέβια, υποδόρια). (Summer and Crawford, 2018, *clin.inv.*2018,128,pp.3219-3227).

Το Nusinersen θεωρήθηκε ασφαλές και καλά ανεκτό καθώς δεν αναφέρθηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (ΑΕ) και όλοι οι συμμετέχοντες παρέμειναν στη μελέτη. Η παρουσία του nusinersen θα μπορούσε να ανιχνευθεί με μια τροποποιημένη μέθοδο ELISA, τόσο σε πλάσμα (> 24 ώρες) όσο και στο CSF (7 ημέρες), μετά από την εφάπαξ δόση σε όλες τις ομάδες 29 ημέρες μετά τη χορήγηση της δόσης (Messina, 2018, pp.251).

Για να αξιολογηθεί η δραστηριότητα του φαρμάκου, τα επίπεδα της πρωτεΐνης SMN αξιολογήθηκαν στο CSF 9-14 μήνες μετά την εφάπαξ δόση και έδειξαν ότι τα επίπεδα του SMN υπερδιπλασιάστηκαν στις ομάδες 6 και 9mg. Δεδομένου ότι οι μικρές αυξήσεις της έκφρασης του SMN προβλέπεται να οδηγήσουν σε δραστικές βελτιώσεις στη νευρομυϊκή λειτουργία και τη διάρκεια ζωής, ο αντίκτυπος του nusinersen στα επίπεδα του SMN θεωρήθηκε ισχυρός προγνωστικός παράγοντας μιας πιθανής θετικής επίδρασης στα λειτουργικά αποτελέσματα για τους SMA ασθενείς εάν το φάρμακο μπορούσε να δοθεί νωρίτερα. Η κλινική αξιολόγηση των συμμετεχόντων αποκάλυψε βελτίωση στους συμμετέχοντες από την ομάδα 9mg σε σύγκριση με τις βασικές τους αξιολογήσεις. Σε συνδυασμό, η μελέτη Φάσης 1 ορίστηκε ως ασφαλής και καλά ανεκτή από τους ασθενείς με SMA τύπου II και III καθώς και με μακροχρόνια λειτουργική δραστηριότητα κατά τρόπο δοσοεξαρτώμενο. Παρόλο που ήταν αποκλεισμένη και δεν ελεγχόταν με εικονικό φάρμακο, η μελέτη αυτή ήταν σημαντική για τη θεμελίωση των κλινικών δοκιμών φάσης II και III σε ασθενείς με SMA (Messina, 2018, pp.251).

Μια περαιτέρω ανοιχτή μελέτη Φάσης 2 αποσκοπούσε στην αξιολόγηση της ασφάλειας και της ανεκτικότητας, της φαρμακοκινητικής και της λειτουργικής δραστηριότητας των πολλαπλών δόσεων ενδορραχιαίου nusinersen στους ασθενείς τύπου I SMA. Σε αυτή την περίπτωση, πραγματοποιήθηκε με μια ομάδα ιστορικού ελέγχου, χρησιμοποιώντας δεδομένα που συλλέχθηκαν από μια δημοσιευμένη φυσικής ιστορίας σειρά περιστατικών (PNCR). Είκοσι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, η πρώτη έλαβε κλιμακωτή δόση 6-12 mg ενώ η δεύτερη ακολούθησε το ίδιο δοσολογικό σχήμα με δόση 12 mg από την αρχή. Εδώ, όλοι οι συμμετέχοντες ανέφεραν ήπια και μέτρια ΑΕ ενώ 80% ανέφεραν σοβαρές ΑΕ (77 συνολικά), οι οποίες θεωρήθηκαν ως συνέπεια της φυσικής ιστορίας της νόσου και

όχι του ίδιου του φαρμάκου(Summer.and Crawford, 2018, clin.inv.2018,128,pp.3219-3227).

Το φάρμακο θα μπορούσε να ανιχνευθεί στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό έως και 168 ημέρες μετά τη χορήγηση της δόσης. Για τους περισσότερους συμμετέχοντες, οι βαθμολογίες αξιολόγησης των κινητήριων λειτουργιών αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια του δοσολογικού σχήματος, ενώ τα δεδομένα PNCR δείχνουν αργή μείωση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου. Η επιβίωση βελτιώθηκε επίσης σημαντικά, έτσι ώστε, κατά τη δημοσίευση, τα περισσότερα υποκείμενα επιβιώνουν χωρίς την ανάγκη εξαερισμού, σε αντίθεση με τα δεδομένα από τη μελέτη PNCR όπου η μέση επιβίωση είναι περίπου 10 μήνες. Αξιοσημείωτο είναι ότι ένας συμμετέχων στην ομάδα 6-12mg και δύο συμμετέχοντες στην ομάδα των 12 mg πέθαναν κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Αυτό παρείχε μια άνευ προηγουμένου ευκαιρία να επικυρωθεί η δέσμευση στόχου nusinersen με ανάλυση πρωτεΐνης SMN και mRNA που αποδεικνύει την παρουσία του φαρμάκου σε νευρωνικά κύτταρα καθώς και μια αύξηση στο FLSMN2 σε όλο το ΚΝΣ σε σύγκριση με παρόμοιους ιστούς που λαμβάνονται από μη SMA βρέφη. Έτσι, παρά τους περιορισμούς του ανοιχτού δοκιμαστικού σχεδιασμού και της χρήσης ιστορικών και όχι δοκιμαστικών ατόμων, αυτή η κλινική δοκιμή φάσης 2 δείχνει αδιαμφισβήτητη δραστηριότητα και λειτουργικά οφέλη του φαρμάκου. Ωστόσο, ο θάνατος των 3 από τους 20 συμμετέχοντες (15%) και οι ενδείξεις ατελούς αποκατάστασης της κινητικής λειτουργίας, και των δύο χαρακτηριστικών των ασθενών με εγκατεστημένη ασθένεια, υπογραμμίζουν την ανάγκη για περαιτέρω δοκιμές για τη συγκεκριμένη αντιμετώπιση του χρονισμού της θεραπείας με το nusinersen για μέγιστο όφελος. Πράγματι, αυτή τη στιγμή διερευνάται σε μια μελέτη φάσης 2 που στοχεύει στη θεραπεία των προ-συμπτωματικών ασθενών (NCT02386553) παράλληλα με μια τυχαίοποιημένη, διπλή-τυφλή και εικονική μελέτη φάσης 3 σε ασθενείς με μεταγενέστερη έναρξη (> 6 μήνες) (NCT02292537)(Wood.etal., 2017, 871,pp.49-71).

Οι μελέτες «κλινικής φάσης 3» περιελάμβαναν βρέφη στα οποία χορηγήθηκαν τέσσερις δόσεις nusinersen σε διάστημα 2 μηνών και στη συνέχεια δόση συντήρησης κάθε 4 μήνες. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το 51% των παιδιών που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία έφτασε είτε σε βελτίωση ενός σημείου σε ένα

από τα επτά ορόσημα μοσχευμάτων είτε σε βελτίωση τουλάχιστον δύο σημείων στο ορόσημο, ενώ κανένα από τα βρέφη ελέγχου δεν εμφάνισε παρόμοια βελτίωση. Επιπλέον, 49 από τα 80 (61%) παιδιά που υποβλήθηκαν σε θεραπεία ήταν ζωντανοί χωρίς να απαιτείται μόνιμος αερισμός στο τέλος της μελέτης, σε σύγκριση με 13 από τα 41 (32%) στην ομάδα ελέγχου. Λόγω της μεγάλης διαφοράς μεταξύ των ομάδων που έλαβαν εικονικό φάρμακο και των ομάδων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία, η μελέτη τερματίστηκε νωρίς και όλα τα βρέφη μεταπηδήθηκαν σε ανοιχτή μελέτη. Οι κλινικές δοκιμές του πρώτου φαρμάκου για τη μείωση των συμπτωμάτων της SMA ήταν εξαιρετικά επιτυχημένες και το nusinersen είναι έτοιμο να είναι μια αποτελεσματική θεραπεία για τους ασθενείς με τη διαταραχή. Η δραματική βελτίωση των ασθενών είναι μια απόδειξη για το πώς η θεραπεία με ASO's μπορεί να είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική θεραπεία για την SMA. (Wood.etal., 2017, 871,pp.49-71).

Πέρα από τα τόσο ενθαρρυντικά κλινικά αποτελέσματα το Nusinersen παρουσιάζει και μία σειρά από μειονεκτήματα όπως :

A)Απεκκρίνεται από τα νεφρά και έτσι η συσσώρευση του μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνια νεφρική τοξικότητα που δεν έχει ακόμη διερευνηθεί.

B) Η μέθοδος χορήγησης του απαιτεί ενδορραχιαία έγχυση με οσφυϊκή διάτρηση προκειμένου να το φάρμακο διασπαστεί απευθείας στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό για διασπορά μέσω του νωτιαίου μυελού και του εγκεφάλου.

Γ) Παρόλο που γενικά είναι καλά ανεκτό από τους ασθενείς, η διαδικασία έχει αναφερθεί ότι προκαλεί ανεπιθύμητα συμβάντα, όπως κεφαλαλγία, πόνο στην πλάτη και έμετο μετά την έγχυση. .

Δ) Η έγχυση πρέπει να επαναλαμβάνεται συστηματικά για την ανανέωση των ASO's στο ΚΝΣ

Ε) Δεν έχει θετικά κλινικά αποτελέσματα σε ενήλικες.

Δ) Το κόστος θεραπείας ανέρχεται στις 700.000 έως 800.000 Ε ανά έτος

(Wood.etal., 2017, 871,pp.49-71).

### 3.1.3 Γονιδιακή θεραπεία μέσω αδενοϊού

Σύμφωνα με το FDA, η γονιδιακή θεραπεία είναι "η χορήγηση γενετικού υλικού για την τροποποίηση ή τον χειρισμό της έκφρασης ενός γονιδιακού προϊόντος ή για τη μεταβολή των βιολογικών ιδιοτήτων ζωντανών κυττάρων για θεραπευτική χρήση." Στον Καναδά, γονιδιακές θεραπείες περιλαμβάνονται στον ορισμό «Φάρμακο» στο πλαίσιο του νόμου για τα τρόφιμα και τα φάρμακα και ρυθμίζονται αντίστοιχα από τους κανονισμούς για τα τρόφιμα και τα φάρμακα. Τόσο οι ΗΠΑ όσο και ο Καναδάς ρυθμίζουν τις θεραπείες γονιδίων ως θεραπείες βιολογικών φαρμάκων (US Food and Drug Administration, 2018; Ridgway, 1995; Ridgway.etal., 2015,871,pp.49-71,HealthCanada, 2015; Halioua-Haubold.etal., 2017, 90(4),pp.683-693).

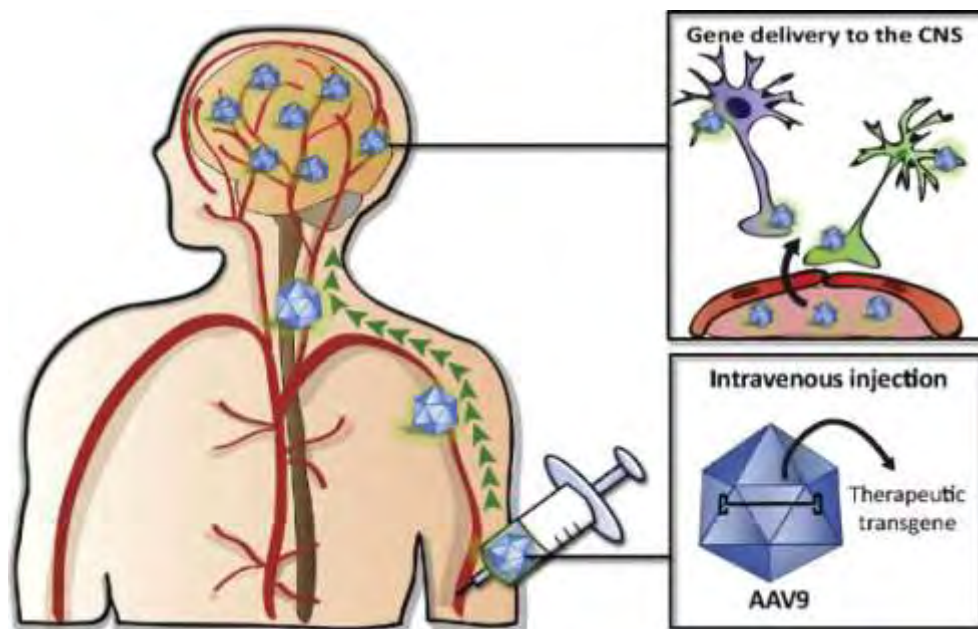
Η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση συγκεκριμένου είδους γενετικού υλικού (π.χ. DNA ή RNA) μέσω ενός φορέα, γνωστού ως «φορέα ή βέκτορα (vector)», που επιτρέπει στο ξένο γενετικό υλικό να εισέλθει στα κύτταρα στόχους(Dunbar.etal., 2018,359-372). Οι περισσότερες θεραπείες γονιδίων χρησιμοποιούν τροποποιημένες εκδόσεις φυσικών ιών, καθώς είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος εισαγωγής του DNA ή του RNA σε ένα κύτταρο(Carvalhoetal., 2017,4:182;Shimetal., 2017,38(6),pp.738-753).

Ο παράγοντας γονιδιακής θεραπείας μπορεί να ενεθεί στο σώμα (in vivo γονιδιακή θεραπεία) ή να χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση κυττάρων που λαμβάνονται από το σώμα, -μέσω έγχυσης (ex vivo γονιδιακή θεραπεία). Η γονιδιακή θεραπεία αντικατάστασης στοχεύει στην παροχή ενός αντιγράφου του κατεστραμμένου γονιδίου, στην ενίσχυση της διαθεσιμότητας ενός γονιδίου που τροποποιεί τη νόσο ή στην καταστολή της παραγωγής ενός κατεστραμμένου γονιδίου(Carvalho.etal., 2017,4:182;Shim.etal., 2017, 38(6),pp.738-753).

Οι φορείς που χρησιμοποιούνται για γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνουν τροποποιημένες εκδοχές φυσικών ιών και πλασμιδίων. Οι ιοί έχουν τροποποιηθεί για να αφαιρέσουν τα γονίδια που προκαλούν ασθένειες και να τα αντικαταστήσουν με το γονίδιο (τα γονίδια) που θα μεταφερθεί και τις αλληλουχίες που ελέγχουν την έκφρασή του, διατηρώντας ταυτόχρονα τον ιικό φάκελο ή το πρωτεϊνικό κάλυμμα, το οποίο βοηθά στη μεταφορά.(Dunbar. 2018, 359-372;



Kumar.etal, 20163,pp.160-164). Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά τμήματα DNA που δεν έχουν φυσικό κάλυμμα ή περίβλημα, αλλά μπορούν να ενθυλακωθούν σε τεχνητή λιπιδική μεμβράνη ή πολυμερές για να βελτιωθεί η μεταφορά τους.



**Εικόνα 2.1:**Γονιδιακή θεραπεία μέσω αδενοϊού AAV

(Journal of Controlled Release Volume 241, 10 November 2016, Pages 94-109)

Όπως προαναφέρθηκε, οι θεραπείες αντικατάστασης γονιδίων γίνονται με την χρήση ειδικών ιικών φορέων. Οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι ιικοί φορείς είναι οι AAV (Εικόνα 2.1). Οι φορείς AAV εμφανίζονται επί του παρόντος ως οι καλύτεροι υποψήφιοι για στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας των νευρομυικών ασθενειών, λόγω αρκετών ελκυστικών χαρακτηριστικών. Όπως συζητείται παρακάτω, αυτός ο μη αναδιπλασιαστικός φορέας είναι ικανός να μεταφέρεται σε μυϊκούς και νευρικούς ιστούς με υψηλή αποτελεσματικότητα, εκφράζοντας το διαγονίδιο για μεγάλες χρονικές περιόδους. Επιπλέον, δεν ενσωματώνεται, αποφεύγοντας τα προβλήματα των επικίνδυνων γονιδιακών παρεμβολών που μπορεί να είναι η αιτία της ογκογένεσης. Αυτοί οι φορείς επάγουν επίσης πολύ χαμηλή ανοσογονικότητα και φλεγμονή μετά από *in vivo* έγχυσή τους. (Aartsma.and Ommen, 2010, 18(2),PP.146-153).

Μεταξύ των φορέων που προέρχονται από τον AAV, ο ορότυπος 9 έχει αποδείξει σαφώς την αποτελεσματικότητά του για την μετάδοση στους κινητικούς νευρώνες

παρακάμπτοντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ακόμη και μετά από μία μόνο συστηματική ένεση. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του αυτο-συμπληρωματικού AAV (scAAV), που πακετάρει ένα δίκλωνο γονιδίωμα, έχει δείξει βελτιωμένη αποτελεσματικότητα μεταγωγής *in vitro* και *in vivo*. Το 2010, αρκετές μελέτες έδειξαν επιτυχή διάσωση των SMA ποντικών με προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι η αντικατάσταση γονιδίου SMN με μεσολάβηση scAAV9 σε μοντέλα SMA ποντικών (SMNΔ7 + / + και SMN - / -) οδήγησε σε μια άνευ προηγουμένου βελτίωση της επιβίωσης και της κινητικής λειτουργίας.(Benchaouir.etal., 2015, 20,pp.1119-1233).

Ακόμη έχει δειχθεί ότι το scAAV9 διέσχισε τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε ένα πρωτεύον πλην του ανθρώπου και μετακίνησε κινητικούς νευρώνες, υποστηρίζοντας τη δυνατότητα μετάφρασης αυτής της θεραπευτικής επιλογής σε ανθρώπους ασθενείς. Μια άλλη μελέτη κατέδειξε ότι η χορήγηση του φορέα scAAV9SMN κατήργησε το σύμπτωμα της βραδυκαρδίας και μείωσε σημαντικά τη σοβαρότητα του καρδιακού ελαττώματος. Μια άλλη ενδιαφέρουσα αναφορά έδειξε ότι η χορήγηση scAAV9-SMN στον εγκέφαλο των σοβαρών νεογνών μοντέλων SMA ποντικών οδήγησε σε εντυπωσιακή βελτίωση της διάρκειας ζωής (157 ημέρες σε σύγκριση με 15 ημέρες σε μάρτυρες που δεν υποβλήθηκαν σε αγωγή)(Yue.etal., 2008, 16(12),pp.1944-1952).

Ακόμη, μελέτη έδειξε σαφώς μια εντυπωσιακή επέκταση της διάρκειας ζωής όταν το scAAV9 εγχύθηκε συστηματικά μία φορά σε ποντίκια P1 SMA, αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής από 27 έως πάνω από 340 ημέρες (διάμεση επιβίωση 199 ημερών) σε ποντίκια που επιβιώνουν κανονικά περίπου 13 ημέρες. Πιο πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν προηγούμενα αποτελέσματα σε μοντέλο ποντικών SMNΔ7. Η έγχυση φορέων scAAV9-SMN μέσω της ενδομυϊκής οδού και έχουν δείξει μια πολύ αποτελεσματική νευραξονική μετατόπιση με νευρώσεις, ικανή να μεταφέρει τους κινητικούς νευρώνες σε ολόκληρο το νωτιαίο μυελό και στα περιφερειακά όργανα(Benchaouir.etal., 2015, 20,pp.1119-1233).

Επιπλέον, φάνηκε ότι η ενδομυϊκή ένεση φορέων scAAV9-SMN σε ποντίκια SMA μεσολαβούσε υψηλά επίπεδα έκφρασης του SMN τόσο στο CNS όσο και στην περιφέρεια και αύξησε τη διάμεση διάρκεια ζωής από 12 ημέρες σε 163 ημέρες. Αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μοντέλα ποντικών οδήγησαν σε μελέτες απόδειξης μελέτης σε μεγάλα πειραματόζωα πριν από μελλοντικές κλινικές

δοκιμασίες. Σε αυτό το πλαίσιο, δείχθηκε ότι η συστηματική απελευθέρωση του AAV9 σε πίθηκους *cynoolgus*, που χορηγήθηκε από τη γέννηση έως την ηλικία των 3 ετών (προς τον εγκέφαλο και τους περιφερικούς ιστούς), ήταν αποτελεσματική στη διέλευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε όλα τα χρονικά σημεία που ερευνήθηκαν. Επιπλέον, η συστηματική ένεση επίσης στοχεύει αποτελεσματικά στον σκελετικό μυ και στα περιφερειακά όργανα. Μία άλλη μελέτη μεγάλων ζώων πραγματοποιήθηκε σε χοίρους με αξιολόγηση μιας ενδορραχιαίας (εντός του εγκεφαλονωτιαίου υγρού) χορήγησης φορέα scAAV9. Συνολικά 12 εγχώριοι χοίροι εκτροφής υποβλήθηκαν σε μονοεστιακή οσφυϊκή λαμινεκτομή με ενδορραχιαία τοποθέτηση καθετήρων για χορήγηση scAAV9. Τρεις διαδοχικές βόλτες μέσω ενός προσωρινού καθετήρα είχαν ως αποτέλεσμα τη διάχυτη μεταγωγή των κινητικών νευρώνων σε όλα τα αυχενικά, θωρακικά και οσφυϊκά σπονδυλικά δίκτυα. Μία άλλη πρόσφατη ενδορραχιαία χορήγηση AAV αξιολογήθηκε σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα και οι συγγραφείς μπόρεσαν να επιτύχουν ευρεία μεταγωγή σε όλο το εγκεφαλικό και στο παρεγχύσιμο του νωτιαίου μυελού (Yue.etal., 2008, 16(12),pp.1944-1952).

Συνολικά, αυτές οι μελέτες τονίζουν το σημαντικό θεραπευτικό δυναμικό του scAAV9 για τη θεραπεία της ανθρώπινης SMA. Επιπλέον, ο μη επεμβατικός τρόπος διανομής φορέων και η υψηλή αποτελεσματικότητα που επιτυγχάνεται, παρέχουν μια ρεαλιστική και ισχυρή λογική για την προώθηση των προσεγγίσεων αντικατάστασης του φορέα με βάση τον φορέα σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους ασθενείς. Η ομάδα του Brian Kaspar και των συναδέλφων της έχει πρόσφατα λάβει έγκριση από την FDA για μια νέα ερευνητική έρευνα φαρμάκων για να ξεκινήσει μια κλινική δοκιμή φάσης I ενός συστηματικού ανθρώπινου γονιδίου SMN που παραδίδεται με AAV9 σε βρέφη με SMA τύπου I (Aartsma.and Ommen, 2010, 18(2),PP.146-153).

### 3.1.4 Zolgesma (AVXS-101)\_

Στις 24 Μαΐου 2019, η FDA ενέκρινε τη αγωγή με Zolgesma , την πρώτη γονιδιακή θεραπεία που εγκρίθηκε για παιδιά ηλικίας κάτω των δύο ετών με SMA.

Η αγωγή με Zolgesma είναι μια θεραπεία αντικατάστασης γονιδίου που περιλαμβάνει ένα αδενο-σχετιζόμενο υικό φορέα που περιέχει το ανθρώπινο γονίδιο SMN1 υπό τον έλεγχο του υποκινητή της βήτα-ακτίνης του κοτόπουλου. Αυτή η θεραπεία αντιμετωπίζει τη γενετική αιτία της νόσου αυξάνοντας τη λειτουργική πρωτεΐνη SMN στους κινητικούς νευρώνες και εμποδίζοντας τον θάνατο των νευρωνικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της νευρωνικής και μυϊκής λειτουργίας. (Al-Zaidy.etal., 2018, 54(2),pp179-185).

Το Zolgesma (AVXS-101), μία θεραπεία αντικατάστασης γονιδίου που ξεπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και θεραπεύει την απώλεια της πρωτεΐνης SMN (δηλαδή, απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου SMN1). Το Zolgesma, έχει σχεδιαστεί για την άμεση και παρατεταμένη έκφραση της πρωτεΐνης SMN, επιτρέποντας ταχεία δράση και παρατεταμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Αν και είναι ακόμα πολύ νωρίς για να προβούμε σε συγκρίσεις μεταξύ των δύο θεραπειών το Zolgesma, αφορά προς το παρόν ασθενείς με SMA τύπου I, φαίνεται ότι η υγεία των ασθενών έχει σημαντικό όφελος, υπερτερεί ως προς τον τρόπο χορήγησης και στο γεγονός της εφ'άπαξ έγχυσης.

Το Nusinersen αφορά ασθενείς με SMA τύπου I , II και III καθώς και προσυμπτωματικούς φορείς. Έχει δοκιμαστεί σε περισσότερους ασθενείς με σημαντικά (SMA I) έως μέτρια (SMAII/III και προσυμπτωματικοί) οφέλη για την υγεία τους.

Το κόστος είναι ιδιαίτερα υψηλό και για τις δύο θεραπευτικές αγωγές

Για να γίνει κατανοητή η επίδραση της θεραπείας αντικατάστασης γονιδίου AVXS-101 σε απουσία μιας τυποποιημένης ομάδας συγκριτικής φροντίδας, τα αποτελέσματα πρέπει να συγκριθούν με αυτά που αναφέρθηκαν σε μελέτες φυσικής ιστορίας ασθενών SMA1 που έλαβαν θεραπεία με το πρότυπο φροντίδας. Σε αυτές τις μελέτες, το 100% των ασθενών ηλικίας άνω των 12 μηνών απαιτούσε είτε τη διατροφή είτε τη συνδυασμένη σίτιση και την υποστήριξη του αναπνευστικού συστήματος, ενώ επίσης δεν διέθετε κινητικό ορόσημο. Η μιας

φοράς AVXS-101 θεραπεία αντικατάστασης γονιδίων ήταν σε θέση να διατηρήσει την αναπνευστική λειτουργία σε μια ομάδα συμπτωματικών SMA1 βρεφών με δύο αντίγραφα του γονιδίου SMN2. Το 70 % των ασθενών που δεν χρειάστηκαν υποβοηθούμενη αναπνοή πριν από τη θεραπεία ήταν σε θέση να συνεχίσουν χωρίς τέτοια υποστήριξη για > 2 χρόνια μετά τη θεραπεία (Finkel.etal., 2018,28,pp.197-207).

Αξιοσημείωτο είναι ότι το 92% των ασθενών παρουσίασαν σταθεροποίηση ή βελτίωση στη λειτουργία κατάποσης και στη διατροφική υποστήριξη. Σε σύγκριση με τις προηγούμενες μελέτες φυσιολογικού ιστορικού των ασθενών με SMA1, η παρούσα μελέτη είχε χαμηλότερο μέσο αριθμό ετήσιων εισαγωγών για νοσηλεία (2,1 έναντι 4.210 έως 7.611 νοσηλείας ανά έτος, αντίστοιχα) και μέση τιμή LOS (6,7 έναντι 13 ημερών, 12 αντίστοιχα). Οι συμμετέχοντες είχαν μόνο 1.4 αναπνευστικές νοσηλείες ετησίως και κανένας ασθενής που νοσηλεύτηκε για αναπνευστικές νόσους δεν χρειάστηκε τραχειοστομία ή παρατεταμένο διηθητικό εξαερισμό μεγαλύτερο από 8 ημέρες.Αναφορικά με τους δείκτες της κινητικής λειτουργίας, το 92% των ασθενών πέτυχε πλήρη έλεγχο και την ικανότητα να είναι ανεξάρτητα για > 5 εβδομάδες. Ο μόνος αναστολέας που πιστεύεται ότι σχετίζεται με τη γονιδιακή θεραπεία ικού φορέα είναι μια παροδική ασυμπτωματική αύξηση των ηπατικών ενζύμων, κάτι που διαχειρίζεται με χορήγηση στεροειδών. Το AVXS-101 εμφανίζεται για να μετασχηματίσει την πορεία της νόσου σε σχέση με τις αναπνευστικές και θρεπτικές επιπλοκές, τις νοσηλείες και τη λειτουργία της κίνησης και αυξάνει την πιθανότητα επακόλουθης λειτουργικής ανεξαρτησίας για τους ασθενείς με SMA1 (Al-Zaidy.etal, 2018, 54(2),pp179-185).

Ποιοτικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με SMA και οι φροντιστές τους θεωρούν μικρές αλλαγές στην κινητική λειτουργία και τη διατήρηση της λειτουργίας ως πολύ επιρρεπείς στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Στο πλαίσιο της ανάπτυξης της θεραπείας, οι ασθενείς της SMA ανέφεραν λειτουργική δραστηριότητα που τείνει περισσότερο να διατηρηθεί ή ότι η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων μπορεί να βελτιώσει ή να διατηρήσει την ποιότητα ζωής σε ασθενείς με SMA ακόμη και σε άτομα με εξέλιξη της νόσου.Η δραστική μείωση των αναπνευστικών και θρεπτικών επιπλοκών, η συνεχιζόμενη βελτίωση των λειτουργιών αναπνοής (βελτίωση ή σταθεροποίηση, συμπεριλαμβανομένου του βήχα και της κατάποσης) και η επίτευξη των ορόσημων κινητικότητας ακόμη και μετά την περίοδο

παρακολούθησης, στην παρούσα μελέτη υποδηλώνουν έντονα τη βελτίωση της ποιότητας ζωής. Υπάρχουν επίσης πιθανά οφέλη από την ποιότητα ζωής για τους φροντιστές της οικογένειας, οι οποίοι περνούν > 8 ώρες την ημέρα παρέχοντας ενεργή φροντίδα και έχουν σημαντικά χαμηλότερη ποιότητα ζωής από τον γενικό πληθυσμό. Οι απαιτήσεις για μείωση της φροντίδας μπορούν επίσης να επηρεάσουν θετικά την παραγωγικότητα των φροντιστών καθώς και την κοινωνική και συναισθηματική ευημερία επιτρέποντας περισσότερο χρόνο για δραστηριότητες αναψυχής (Al-Zaidy.etal., 2018, 54(2),pp179-185).

Ένας τομέας ιδιαίτερης σημασίας για την εκτίμηση ποιότητας ζωής που παρέχεται από τη θεραπεία αντικατάστασης γονιδίων σχετίζεται με την ανάπτυξη της ομιλίας σε βρέφη και παιδιά. Οι ασθενείς με SMA1 συχνά αποτυγχάνουν να αναπτύξουν ομιλία, ως αποτέλεσμα της επιδείνωσης της λειτουργίας των μυϊκών ινών. Αντίθετα, το 92% των ασθενών μπόρεσαν να μιλήσουν μετά από θεραπεία με AVXS-101. Επειδή ο λόγος είναι σημαντικός για τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των κρίσιμων πρώιμων κοινωνικών αλληλεπιδράσεων με τον φροντιστή τους, η διαταραχή αυτής της λειτουργίας μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής. Έτσι, η ανάπτυξη της ομιλίας στην πλειονότητα των ασθενών με SMA έχει τη δυνατότητα όχι μόνο να βελτιώσει την κοινωνική τους αλληλεπίδραση, η οποία μπορεί να ενισχύσει δυνητικά τη γνωστική τους λειτουργία, αλλά και την ποιότητα ζωής τους (Al-Zaidy.etal., 2018, 54(2),pp179-185).

Η βελτίωση της λειτουργίας των ασθενών με SMA μπορεί επίσης να έχει θετικές οικονομικές επιπτώσεις. Η πρόσφατη αναδρομική ανάλυση της βάσης δεδομένων για τα νοσοκομεία των παιδιών (KID) έδειξε ότι τα τέλη εισόδου σε παιδιά SMA1 ήταν κατά μέσο όρο 150.921 δολάρια ανά νοσηλεία (1.1143 δολάρια την ημέρα). Η μειωμένη συχνότητα αναπνευστικών λοιμώξεων και νοσηλείων που παρατηρήθηκαν μετά από θεραπεία με AVXS-101 σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία με SMA1, είναι πιθανό να οδηγήσουν σε ταυτόχρονη μείωση των δαπανών υγειονομικής περίθαλψης που σχετίζονται με τη θεραπεία των παιδιών SMA1. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, δηλαδή, καθαρό όφελος / ανάλυση κόστους-αποτελεσματικότητας (Al-Zaidy.etal., 2018, 54(2),pp179-185).

Τα χρόνια προόδου στη γονιδιακή θεραπεία έθεσαν το στάδιο για την ανάπτυξη και εφαρμογή της στη SMA. Οι ερευνητές σχεδίασαν ένα φορέα που ονομάζεται

scAAV9.CB.SMN σε πρώιμες μελέτες, τώρα γνωστές ως AVXS-101- που φέρουν κωδικοποίηση DNA, πλήρως λειτουργικό ανθρώπινο SMN υπό τον έλεγχο ενός συνεχούς υποκινητή. Ο φορέας έχει σχεδιαστεί για να αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης SMN. Προκλινικές μελέτες κατέδειξαν αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε ποντίκια και μοντέλα μη ανθρώπινων πρωτευόντων του SMA, ανοίγοντας το δρόμο για την πρώτη κλινική δοκιμή σε ανθρώπους. Αυτή ήταν μια μεμονωμένη, ανοικτή μελέτη που σχεδιάστηκε αρχικά για να μελετήσει την ασφάλεια μίας μόνο ενδοφλέβιας δόσης του AVXS-101 και δευτερευόντως για να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε παιδιά με SMA με 1 και 2 αντίγραφα του SMN2. Η θεραπεία εγχύθηκε ενδοφλέβια για 60 λεπτά. Κατά τη στιγμή της αρχικής δημοσίευσης, όλοι οι ασθενείς είχαν φθάσει τουλάχιστον 20 μηνών χωρίς να χρειάζονται μόνιμο αερισμό (Vamshi.etal, 2018, S(24),(12-a).

Όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν αυξήσεις από την έναρξη της βαθμολογίας στο CHOP INTEND. Η μέση αύξηση ήταν 7.7 μονάδες στην ομάδα 1 (από μέση τιμή βάσης 16,3 μονάδων) και 24,6 μονάδες στην ομάδα 2 (από τη μέση τιμή βάσης 28,2). Αυτές οι τιμές διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Έντεκα παιδιά στην ομάδα 2 ήταν σε θέση να καθίσουν χωρίς υποστήριξη για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα.. Δύο μπορούσαν να σέρνουν, να τραβούν για να στέκονται, να στέκονται και να περπατούν ανεξάρτητα, 11 πέτυχαν στην δοκιμή ομιλίας. Κανένα παιδί σε προγενέστερες μελέτες φυσικής ιστορίας δεν είχε αποκτήσει αυτά τα ορόσημα κινητικότητας. Οι ενημερώσεις δεδομένων μετά 24 μήνες έδειξαν τη συνεχή επιβίωση και τη βελτίωση της κινητικής λειτουργίας. Επιπλέον, όπως παρατηρήθηκε στις δοκιμές nusinersen, όσο νωρίτερα η θεραπεία, τόσο καλύτερα είναι τα αποτελέσματα. γενικά, οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία στις μικρότερες ηλικίες έκαναν τα μεγαλύτερα κέρδη, ενώ οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με την τελευταία έδειξαν τη μικρότερη βελτίωση. (Vamshi.etal, 2018, S(24),(12-a).

Τα ανεπιθύμητα συμβάντα που παρατηρήθηκαν με το AVXS-101 ήταν ως επί το πλείστον άσχετα με τη θεραπεία. Ωστόσο, 1 ασθενής στην ομάδα 1 είχε σχετιζόμενη με τη θεραπεία αύξηση των ηπατικών τρανσαμινασών (31 φορές το ανώτερο φυσιολογικό όριο για την αμινοτρανσφεράση της αλανίνης και 14 φορές το ανώτερο φυσιολογικό όριο για την ασπαρτική αμινοτρανσφεράση). αυτές οι

αυξήσεις ανταποκρίθηκαν στην πρεδνιζολόνη, η οποία στη συνέχεια δόθηκε σε όλους τους άλλους ασθενείς ως μέρος του πρωτοκόλλου θεραπείας. Ένας ασθενής στην ομάδα 2 είχε παρόμοιες αυξήσεις στα ηπατικά ένζυμα και χρειάστηκε επιπλέον πρεδνιζολόνη. Οι αυξήσεις των τρανσαμινασών δεν συσχετίστηκαν με άλλες ανωμαλίες της ηπατικής λειτουργίας ή κλινικές αλλαγές και η θεραπεία με AVXS-101 είναι ασφαλής συνολικά (Vamshi.etal, 2018, S(24),(12-a).



### 3.1.5 Μελλοντικά θεραπευτικά πρωτόκολλα

Η πρόσφατη επιτυχία των Nusinersen και Zolgesma είναι μια ισχυρή απόδειξη της αρχής ότι τόσο τα ASO's όσο και η γονιδιακή θεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στοχευμένα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (central neural system, CNS) για τη θεραπεία της SMA και ότι ανοίγεται η πόρτα για την εφαρμογή τους και σε άλλες νευροεκφυλιστικές και νευρομυϊκές παθήσεις. Ωστόσο, παρά τα εντυπωσιακά αποτελέσματα θα πρέπει να εξεταστούν με προσοχή μια σειρά από ζητήματα που αφορούν στην βελτίωση της αποτελεσματικότητας (Nusinersen και Zolgesma), του τρόπου και της συχνότητας χορήγησης (Nusinersen), των παρενεργειών (Nusinersen και Zolgesma) και τέλος του κόστους (Nusinersen και Zolgesma).

Οι πειραματικές μελέτες συνεχίζονται με εντατικούς ρυθμούς και η μελλοντική ανάπτυξη των ASO's φαίνεται να ενσωματώνει νέες μεθοδολογίες για τη βελτίωση της ικανότητά τους να φθάσουν στους κινητικούς νευρώνες ξεπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω ενδοφλέβιας συστηματική χορήγησης. Επιπλέον, επί του παρόντος διεξάγονται και μελέτες για τη δημιουργία ASO's που στοχεύουν σε εναλλακτικές ρυθμιστικές περιοχές του SMN2. (Wood.etal., 2017, 871,pp.49-71).

Προκλινικές παρατηρήσεις φαίνεται να αναδεικνύουν και την ανάγκη για συνδυαστικές προσεγγίσεις ,όπως για παράδειγμα τη χρήση ενός θεραπευτικού δυναμικού «κοκτέιλ» που χρησιμοποιεί μόρια που προάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου SMN2 και τεχνολογίες αναπλήρωσης του γονιδίου SMN1. Η βέλτιστη στρατηγική θεραπείας για την SMA θα ήταν ένας συνδυασμός μικρών μορίων που ενισχύουν το γονίδιο SMN2 με ASO's και αντικαθιστούν το SMN1 με AAVs. (Wood. et al., 2017, 871,pp.49-71).

## Συμπεράσματα

Η πρόοδος της μοριακής γενετικής έχει οδηγήσει στη χρήση φαρμάκων νέας γενιάς τα οποία φαίνεται ότι βελτιώνουν σημαντικά το φαινότυπο της νόσου SMA.

Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (Nusinersen ) και γονιδιακή θεραπεία μέσω αδενοϊών (Zolgensma) έχουν πάρει έγκριση από τον FDA και βρίσκονται σήμερα στην πρώτη γραμμή για τη θεραπεία της νόσου.

Αν και ιδιαίτερα κοστοβόρες οι θεραπείες νέας τεχνολογίας αναμένεται να εξελιχτούν και να δώσουν μελλοντικά τη δυνατότητα ώστε η SMA να είναι ένα θεραπευτικά διαχειρίσιμο νόσημα.

Για την θεραπευτική αγωγή ο άμεσος γενετικός έλεγχος των νεογνών καθίσταται πλέον αναγκαίος.

Η αναγκαιότητα για ένταξη του προγεννητικό έλεγχο της SMA στα κρατικά συστήματα υγείας των ανεπτυγμένων χωρών τίθεται πλέον ως ιδιαίτερα σημαντικό θέμα

Αν και το οικονομικό κόστος των φαρμάκων νέας γενιάς είναι ιδιαίτερα υψηλό, τα προηγμένα κράτη καλύπτουν τη θεραπεία μέσα από το κρατικό σύστημα υγείας.

- Βιβλιογραφία
- Orthrop.Traumatol.SurgRes.2018 Feb.,104(15),PP.589-595.
- Al-Zaidy, S. Pickard, AS. Kotha, K. Alfano, LN. Lowes, L. Paul, G. Church, K. Lehman, K. Sproule, DM. Dabbous, O. Maru, B. Berry, K. Arnold, WD. Kissel, JT. Mendell, JR. Shell, R.(2019). Health outcomes in spinal muscular atrophy type 1 following AVXS-101 gene replacement therapy, *PediatrPulmonol.*, 54(2), pp. 179-185
- Journal Of Controlled Release ,volume 241,10 Nov.2016,pp.94-109
- Aartsma-Rus A. and van Ommen G.J. (2010). Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders.*Eur J Hum Genet*, 18(2), pp. 146-53.
- Arnold, WD. Burghes, AH. (2013). Spinal muscular atrophy: development and implementation of potential treatments. *Ann Neurol*, 74(3), pp. 348–362
- AveXis, Inc. (2018) Gene Replacement Therapy Clinical Trial for Patients With Spinal Muscular Atrophy Type 1. ClinicalTrials.gov. [Accessed 2018]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03306277>.
- Benchaouir, R.Robin, V. Goyenvalle, A. (2015).Gene and splicing therapies for neuromuscular diseases, *Frontiers in Bioscience*, Landmark, 20, pp. 1190-1233
- Burghes, A. and Beattie, Ch.(2009).Spinal Muscular Atrophy: Why do low levels of SMN make motor neurons sick?. *Nat Rev Neurosci*, 10(8), pp. 597–609.
- CADTH Issues in Emerging Health Technologies, Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2016-.ISSN: 1488-6324

- Carvalho, M. Sepodes, B. Martins, AP. (2017). Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-Art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework. *Frontiers in medicine*,4:182.
- Dunbar, CE. High, K. Joung, JK. Kohn, DB. Ozawa, K. Sadelain, M.(2018). Gene therapy comes of age. *Science* (New York, NY). 359(6372)
- Farrar, MA. Kiernan, MC. (2015). The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges, *Neurotherapeutics*, 12, pp290–302
- FinkelRS,MercuriE,Meyer OH,et al. (2018). Diagnosis andmanagementof spinal muscular atrophy: part 2: Pulmonary and acute care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics. *Neuromuscul Disord*, 28, pp. 197–207.
- Grimm, D. Buning, H. (2017). Small But Increasingly Mighty: Latest Advances in AAV Vector Research, Design, and Evolution. *Human gene therapy*, 28(11), pp. 1075–1086
- Halioua-Haubold, CL. Peyer, JG. Smith, JA. et al. (2017) Regulatory Considerations for Gene Therapy Products in the US, EU, and Japan. *The Yale journal of biology and medicine*. 90(4), pp. 683–693.
- Health Canada. Guidance document: Preparation of clinical trial applications for use of cell therapy products in humans. Ottawa (ON): Government of Canada; 2015. [Accessed March 2018]. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/drug-products/applications-submissions/guidance-documents/clinical-trials/guidance-document-preparation-clinical-trial-applications-use-cell-therapy-products-humans.html>.
- Howe, SJ. Mansour, MR. Schwarzwaelder, K. et al. (2008) Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes

leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation*. 118(9), pp. 3143–3150

- Kolb, St. Kissel, J. (2015), Spinal Muscular Atrophy, *Neurol Clin*. 33(4), pp. 831–846
- Kumar, SR. Markusic, DM. Biswas, M. High, KA. Herzog, RW. (2016) Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Molecular therapy Methods and clinical development.*, 3, pp. 16034
- Lorson, CL. Rindt, H. Shababi, M. (2010). Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies. *Hum Mol Genet*, 19(R1), pp. R111–R118.
- Mendell, J.R.; Al-Zaidy, S.; Shell, R. (2017). Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N. Engl. J. Med.*, 377, pp. 1713–1722
- Messina, S. (2018) New Directions for SMA Therapy, *J. Clin. Med*. 7, pp. 251
- Nurputra, DK. Lai, PS. Harahap, NI. Morikawa, S. Yamamoto, T. Nishimura, N. Kubo, Y. Takeuchi, A. Saito, T. Takeshima, Y. Tohyama, Y. Tay, SK. Low, PS. Saito, K. Nishio, H. (2013). Spinal Muscular Atrophy: From Gene Discovery to Clinical Trials, , 77(5), pp. 435-63
- Porensky, PN. Mitrpant, C. McGovern, VL et al (2012) A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet*, 21(7), pp. 1625–1638.
- Ridgway, A. Agbanyo, F. Wang, J. Rosu-Myles, M.(2015). Regulatory Oversight of Cell and Gene Therapy Products in Canada. *Advances in experimental medicine and biology*. 871, pp. 49–71.
- Ridgway, A. (1995). Regulation of gene therapy: the Canadian approach. *Biologicals, journal of the International Association of Biological Standardization*, 23(1), pp. 31–36

- Shim, G.Kim, D. Park, GT. Jin, H. Suh, SK. Oh, YK. (2017). Therapeutic gene editing: delivery and regulatory perspectives. *Acta pharmacologica Sinica*, 38(6), pp. 738–753.
- Son, HW. Yokota, T.(2018) Recent Advances and Clinical Applications of Exon Inclusion for Spinal Muscular Atrophy, *Methods Mol Biol*, 1828, pp. 57-68
- US Food and Drug Administration. What is gene therapy. 2018. [Accessed January 21, 2018]. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ucm573960.htm>.
- Sumner, C.J.; Crawford, T.O. Two breakthrough gene-targeted treatments for spinal muscular atrophy: Challenges remain. *J. Clin. Investig.* 2018, 128, 3219–3227
- Valdmanis, PN. Kay, MA.(2017)Future of rAAV Gene Therapy: Platform for RNAi, *Gene Editing, and Beyond, Hum Gene Ther.* 28(4), pp. 361-372
- Valori CF, Ning K, Wyles M, et al. (2010). Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med*, 2, pp. 35-42
- Vamshi, K. Daniel, K.and Schroth, M. (2018) Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease, *JMCP*, S 24 (12-a)
- Wertz, M. Sahin, M. (2016).Developing therapies for spinal muscular atrophy, *Ann N Y Acad Sci*, 1366(1), pp. 5–19
- Wood,M. Talbot,K.Bowerman,M. (2017) Spinal muscular atrophy: antisense oligonucleotide therapy opens the door to an integrated therapeutic landscape, *Hum Mol Genet.*,1(26)(R2), pp. R151-R159.
- YueY., A. Ghosh, C. Long, B. Bostick, B. F. Smith, J. N. Kornegay and DuanD.(2008). A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. *Mol Ther*, 16(12), pp. 1944-52