

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΤΗ ΜΥΪΚΗ ΔΥΣΤΡΟΦΙΑ DUCHENNE ΚΑΙ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Κανίνια Σ., Παπαδήμας Γ.-Κ., Παπαδόπουλος Κ.

Α΄ Νευρολογική Κλινική Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο

Περίληψη

Η Μυϊκή Δυστροφία Duchenne (DMD) είναι μία φυλοσύνδετη νόσος με έναρξη στην πρώιμη παιδική ηλικία. Τα προσβεβλημένα αγόρια παρουσιάζουν αρχικά κεντρομελική αδυναμία και συνήθως πεθαίνουν στο τέλος της δεύτερης δεκαετίας της ζωής τους λόγω καρδιοαναπνευστικών εκδηλώσεων. Οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της δυστροφίνης, ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στη νόσο είναι περίπλοκοι. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές για την τροποποίηση του γονιδίου της δυστροφίνης, όπως η καταστολή αντινοσηματικών νουκλεοτιδίων και η παράκαμψη εξονίων. Επιπλέον, έχουν γίνει προσπάθειες γονιδιακής θεραπείας με ιούς φορείς. Τα αποτελέσματα των θεραπευτικών προσεγγίσεων και η περαιτέρω σχεδίαση τεχνολογιών για τη γονιδιακή τροποποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου της δυστροφίνης έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση αυτής της συνηθισμένης παιδιατρικής πάθησης. Σκοπός της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης είναι η περιγραφή των βασικών μηχανισμών που οδηγούν στη νόσο και η παρουσίαση των σημαντικότερων γονιδιακών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Λέξεις ευρετηρίου: Μυϊκή Δυστροφία Duchenne, δυστροφίνη, καταστολή αντινοσηματικών νουκλεοτιδίων, παράκαμψη εξονίων, ουτροφίνη

MOLECULAR MECHANISMS LEADING TO DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND GENE THERAPY APPROACHES – A LITERATURE REVIEW

Kaninia S., Papadimas G.-K., Papadopoulos K.

1st Department of Neurology, National and Kapodistrian University of Athens, Eginition Hospital

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an X-linked disorder manifesting in early childhood. The affected boys initially experience proximal muscular weakness, with cardiorespiratory complications leading to death at the end of the second decade. DMD results from mutations in the dystrophin gene. The molecular mechanisms leading to muscle degeneration are complex. Dystrophin gene restoration methods have been developed and include nonsense mutations read-through and exon skipping. Viral-mediated gene therapy has been designed. The outcome of gene therapy approaches and further development of technologies for the modification of the dystrophin gene have presented encouraging results for the treatment of this common pediatric disorder. The aim of this study is to present the basic mechanisms leading to DMD and the most important gene therapy approaches.

Key words: Duchenne Muscular Dystrophy, dystrophin, nonsense mutations read-through, exon skipping, utrophin

Εισαγωγή

Η Μυϊκή Δυστροφία Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) είναι μία κληρονομική φυλοσύνδετη υπολειπόμενη νόσος, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική εκφύλιση των μυών. Η έναρξη των συμπτωμάτων είναι στην πρώιμη παιδική ηλικία και τα προσβεβλημένα αγόρια πεθαίνουν συνήθως στη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους αν δε λάβουν υποστηρικτική θεραπεία⁽¹⁾.

Ο επιπολασμός της DMD έχει υπολογιστεί σε 4,78 ανά 100000 άρρενες παγκοσμίως⁽²⁾.

Κλινικά η νόσος χαρακτηρίζεται από προοδευτική μυϊκή αδυναμία. Τα πρώτα συμπτώματα παρατηρούνται μεταξύ του δεύτερου και πέμπτου έτους της ηλικίας και περιλαμβάνουν συχνές πτώσεις, βράδια επί των δακτύλων και δυσχέρεια στην άνοδο κλίμακας. Παρατηρείται ψευδοϋπερτροφία των γαστροκνημίων, λορδωτική στάση σώματος και το σημείο Gowers', το οποίο υποδηλώνει αδυναμία των κεντρομελικών μυών. Η πλειοψηφία των προσβεβλημένων αγοριών καθηλώνονται σε αναπηρικό αμαξίδιο μεταξύ του ένατου και δωδέκατου έτους της ηλικίας. Σοβαρή κυφωσκολίωση, αναπνευστική ανεπάρκεια και μυοκαρδιοπάθεια εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια της νόσου και καρδιοαναπνευστικές επιπλοκές οδηγούν στο θάνατο⁽¹⁾. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθούν μαθησιακές δυσκολίες εξαιτίας της παρουσίας μίας ισομορφής της δυστροφίνης στον εγκέφαλο⁽³⁾.

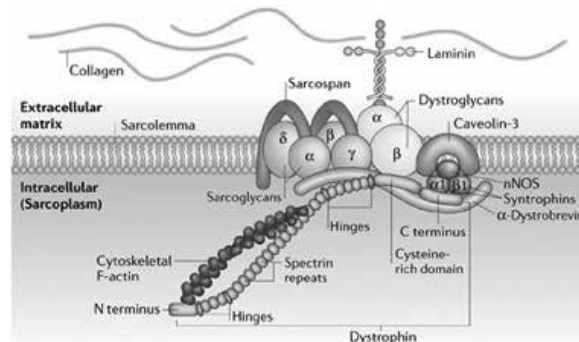
Η πλειοψηφία των θήλειων φορέων της νόσου είναι ασυμπτωματικές. Ωστόσο, σε μία κοόρτη φορέων της νόσου υπολογίστηκε ότι το 17% είχαν ήπια έως μέτρια μυϊκή αδυναμία, ενώ το 8% είχαν διατακτική μυοκαρδιοπάθεια με μέση ηλικία έναρξης τα 33 έτη⁽⁴⁾. Επιπλέον, εκτιμάται ότι το 10% των γυναικών με παθολογικά αυξημένα επίπεδα κρεατινικής κινάσης ορού (Creatine Kinase, CK) είναι φορείς της νόσου⁽⁵⁾.

Η DMD είναι το αποτέλεσμα της έλλειψης δυστροφίνης στις μυϊκές ίνες, εξαιτίας μεταλλάξεων στο γονίδιο της δυστροφίνης. Η δυστροφίνη είναι μία πρωτεΐνη η οποία αποτελεί βασικό συστατικό του συμπλόκου των γλυκοπρωτεϊνών των σχετιζόμενων με τη δυστροφίνη (Dystrophin-associated Glycoprotein Complex, DGC) και αποτελείται από τέσσερις κύριες περιοχές (Εικόνα 1). Βασική της λειτουργία είναι να σταθεροποιεί και να συνδέει τον κυτταροσκελετό των μυϊκών ινών με το σαρκεϊλήλημα και τα στοιχεία του εξωκυττάρου στρώματος, ιδιαίτερα τη λαμινίνη⁽⁷⁾.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η νόσος είναι κληρονομική, ωστόσο περίπου 30% των περιστατικών είναι αποτέλεσμα αυτόματων νέων μεταλλάξεων⁽¹⁾. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη δυστροφίνη είναι το μεγαλύτερο στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Βρίσκεται στο X χρωμόσωμα, αποτελείται από 2,4 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων και περιλαμβάνει 79 εξόνια.

Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η περιγραφή των βασικότερων μοριακών και γενετικών μηχανισμών που οδηγούν στη DMD και θα γίνει επι-

Εικόνα 1. Η δυστροφίνη και η συσχέτισή της με το συμπλόκο γλυκοπρωτεϊνών. Η δυστροφίνη παρέχει ένα μηχανικό σύνδεσμο ανάμεσα στον κυτταροσκελετό και το εξωκυττάριο στρώμα⁽⁶⁾



λεκτική αναφορά στις σημαντικότερες εξελίξεις των γονιδιακών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Μηχανισμοί που οδηγούν στη DMD

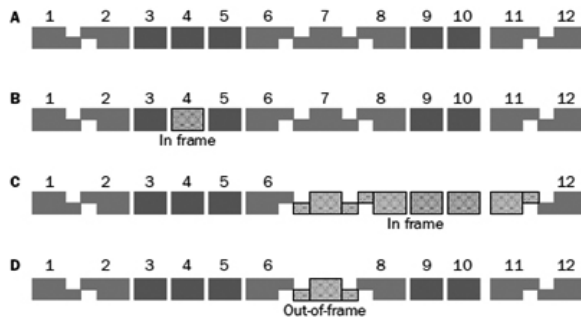
Έχουν ανιχνευτεί περισσότερες από 7000 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της δυστροφίνης, οι οποίες ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες. Οι μεταλλάξεις αλληλαγής του πλαισίου ανάγνωσης (out-of-frame mutations) είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των ασθενών με DMD. Υπολογίζεται ότι περίπου 80% των ασθενών με DMD έχουν μεγάλες μεταλλάξεις (διαγραφές ή διπλοασιασμοί περισσότερων του ενός εξονίων). Οι σημειακές μεταλλάξεις ευθύνονται για το 11% του συνόλου των μεταλλάξεων. Συνολικά, 10% των ασθενών έχουν αντινοσηματικές μεταλλάξεις (nonsense mutations), οι οποίες οδηγούν σε πρώιμα κωδικόνια λήξης, τερματισμό της μετάφρασης στο ριβόσωμα και παραγωγή ενός «ακρωτηριασμένου» πρωτεϊνικού προϊόντος⁽⁸⁾.

Ωστόσο, σε ορισμένες μεταλλάξεις υπάρχει διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης (in-frame mutations) και παράγεται βραχύτερη, αλλά ωστόσο μερικώς λειτουργική δυστροφίνη. Αυτή η δυστροφινοπάθεια ονομάζεται Μυϊκή Δυστροφία Becker (Becker Muscular Dystrophy, BMD). Η βαρύτητά της εξαρτάται από τη λειτουργία του τμήματος της πρωτεΐνης που απουσιάζει. Η BMD έχει κλινικά ηπιότερο φαινότυπο και έναρξη σε μεγαλύτερη ηλικία⁽⁹⁾. Ο παγκόσμιος επιπολασμός της BMD υπολογίζεται ότι είναι 1,53 ανά 100000 άρρενες⁽²⁾.

Συνεπώς, σύμφωνα και με την «υπόθεση του πλαισίου ανάγνωσης» (reading-frame hypothesis), η επίδραση των μεταλλάξεων στο φαινότυπο της νόσου δεν εξαρτάται από την έκταση της διαγραφής ή του διπλοασιασμού του τμήματος του γονιδίου, αλλά από το αν διαταράσσεται ή όχι το πλαίσιο ανάγνωσης. (Εικόνα 2)⁽¹⁰⁾.

Παρόλο που η πρωταρχική αιτία της DMD είναι η απουσία της δυστροφίνης, οι μηχανισμοί που οδηγούν

Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του αποτελέσματος της διαγραφής διαφορετικών εξονίων του γονιδίου της δυστροφίνης (A). Η διαγραφή του εξονίου 4 (B) και των εξονίων 7-11 (C) διατηρούν το πλαίσιο ανάγνωσης (in-frame mutations). Η διαγραφή του εξονίου 7 (D) οδηγεί σε αλλοίωση του πλαισίου ανάγνωσης (out-of-frame mutation)⁽¹⁰⁾



σε εκφύλιση των μυών και αντικατάστασή τους από ινοβλιώδη ιστό είναι περίπλοκοι. Η δυστροφίνη έχει βασικό δομικό ρόλο και η απουσία της επηρεάζει την ορθή έκφραση και λειτουργία του DGC. Το DGC είναι υπεύθυνο για την ορθή λειτουργία του σκελετικού μύος και την ακεραιότητα του σαρκειλήματος, συνεπώς η μειωμένη έκφρασή του καθιστά τις μυϊκές ίνες λιγότερο ανθεκτικές σε μηχανικό στρες και επιρρεπείς σε τραυματισμούς⁽¹¹⁾. Εξαιτίας της επηρεασμένης ακεραιότητας του σαρκειλήματος υπάρχει παθολογική είσοδος ιόντων ασβεστίου στο σαρκόπλάσμα, η οποία έχει τοξική επίδραση στην έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων. Συνεπώς, επηρεάζεται η παραγωγή ενέργειας των μυϊκών κυττάρων⁽¹²⁾.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι στη DMD εκφράζονται αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-3 και αυτό μπορεί να είναι μία επιπλέον ερμηνεία για την αυξημένη διαπερατότητα του σαρκειλήματος. Η καβεολίνη-3 είναι δομική πρωτεΐνη των κυστιδίων καβεολίνης, όπου βρίσκονται πολλοί διάυλοι ιόντων και άλλες πρωτεΐνες. Επομένως, η υπερέκφραση της καβεολίνης-3 μπορεί να οδηγεί σε παθολογική λειτουργία των διαύλων ιόντων που βρίσκονται στα κυστίδια, συμπεριλαμβανομένων διαύλων ασβεστίου⁽¹³⁾.

Πέρα από το δομικό ρόλο, η δυστροφίνη έχει κρίσιμο ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια (signalling pathways). Η νευρωνική συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (neuronal Nitric Oxide Synthase, nNOS) είναι συστατικό του DGC και η δυστροφίνη εμπλέκεται στη ρύθμισή της. Σε φυσιολογικούς μύς, η nNOS ενεργοποιείται κατά τη σύσπαση και παράγει NO, επιτρέποντας την επαρκή αιματική ροή. Ωστόσο, στη DMD, εξαιτίας της έλλειψης δυστροφίνης, η nNOS δεν εκφράζεται ορθά και δυσλειτουργεί. Επομένως, δε συμβαίνει αντισταθμιστική αγγειοδιαστολή και ακολουθεί μυϊκή ισχαιμία και καταστροφή⁽¹⁴⁾.

Στη DMD έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή δραστι-

κών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) οι οποίες σηματοδοτούν φλεγμονώδεις διεργασίες, ενεργοποιώντας τον πυρηνικό παράγοντα κΒ (nuclear factor-κΒ, NF-κΒ). Ο NF-κΒ επάγει μοριακούς καταρράκτες οι οποίοι οδηγούν σε φλεγμονή, ίνωση και ατροφία, διεργασίες αξιοσημείωτες στα τελικά στάδια της νόσου⁽¹⁵⁾.

Τέλος, εξαιτίας της αύξησης του ενδοκυττάρου ασβεστίου ενεργοποιούνται και υπερεκφράζονται πρωτεολυτικά ένζυμα, στα οποία περιλαμβάνονται οι καλπαΐνες (calpains). Αυτό οδηγεί σε πρωτεολυτικούς καταρράκτες με συνέπεια τη νέκρωση των μυϊκών κυττάρων⁽¹⁶⁾.

Τεχνικές τροποποίησης γονιδίων

Καταστολή αντιγονοματικών (nonsense) βουκλεοτιδίων

Όπως προαναφέρθηκε, περίπου 10% των ασθενών με DMD έχουν αντιγονοματικές μεταλλάξεις του γονιδίου της δυστροφίνης, οι οποίες καταλήγουν σε πρώιμο κωδικόνιο λήξης. Σε αυτή την υποομάδα ασθενών μπορεί να γίνει αξιοποίηση της ιδιότητας της γενταμικίνης, ενός αντιβιοτικού που ανήκει στην ομάδα των αμινογλυκοσιδίων, να καταστέλλει τα κωδικόνια λήξης, επιτρέποντας στα ριβοσώματα να συνεχίσουν τη μετάφραση⁽¹⁷⁾.

Όταν η γενταμικίνη χορηγήθηκε σε *mdx* επίμυες, ένα ζωικό μοντέλο για τη μελέτη της DMD το οποίο έχει μία σημειακή μετάλλαξη που οδηγεί σε ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης στο γονίδιο της δυστροφίνης, έγινε επαγωγή της έκφρασης της δυστροφίνης. Εκτιμήθηκε ότι τα επίπεδα της δυστροφίνης στο μυϊκό ιστό των *mdx* επίμυων που έλαβαν γενταμικίνη ήταν έως 20% των αντίστοιχων στον υγιή μυϊκό ιστό⁽¹⁸⁾.

Σε μία κλινική μελέτη⁽¹⁹⁾ βρέθηκε ότι μετά από χορήγηση γενταμικίνης για διάστημα έξι μηνών σε 12 ασθενείς με DMD, τα επίπεδα δυστροφίνης ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα ($p = 0.027$) σε τρεις ασθενείς, όπως μετρήθηκαν με μεθόδους ανοσοφθορισμού και Western Blot ανάλυση στη βιοψία μύος, πριν και μετά την παρέμβαση. Τα υψηλότερα εξ αυτών προσέγγιζαν το 15% των φυσιολογικών επιπέδων δυστροφίνης στον υγιή μυϊκό ιστό. Ωστόσο, σε έναν ασθενή ανιχνεύτηκε T-λεμφοκυτταρική αντίδραση εναντίον ενός επίτοπου της δυστροφίνης. Τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι συμβατά με τα αποτελέσματα των παρεμβάσεων που είχαν προηγηθεί στους *mdx* επίμυες, ωστόσο λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών στους οποίους παρατηρήθηκε αύξηση της δυστροφίνης, καθώς και των δυνητικών παρενεργειών της γενταμικίνης (νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα), έγιναν προσπάθειες για την ανάπτυξη άλλων μορίων με παρόμοιες ιδιότητες.

Το PTC124 είναι ένα μόριο το οποίο έχει παρόμοια λειτουργία με τη γενταμικίνη και επάγει τη μετάφραση των πρώιμων κωδικονίων λήξης. Σε μυϊκό ιστό

mdx επίμυων στους οποίους χορηγήθηκε η χημική ουσία PTC 124 βρέθηκε επαγωγή της έκφρασης δυστροφίνης. Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα γ-σαρκογλυκάνης, εύρημα συμβατό με παραγωγή δυστροφίνης και σταθεροποίηση του DGC⁽²⁰⁾.

Ακολούθησε μία τυχαίοποιημένη, διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη με το εικονικό φάρμακο (placebo) μελέτη, στην οποία το φάρμακο ataluren (PTC 124) ή placebo χορηγήθηκε σε 174 αγόρια με DMD για 48 εβδομάδες⁽²¹⁾. Το πρωτεύον καταληκτικό σημείο ήταν η μεταβολή στην απόσταση βάδισης στα έξι λεπτά (6-Minute Walk Distance, 6MWD). Υπολογίστηκε ότι σε μία υποομάδα ασθενών που έλαβαν το ataluren υπήρξε βελτίωση στο 6MWD σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν placebo. Μία μελέτη φάσης III για το ataluren που θα αξιολογήσει τη μακροπρόθεσμη ασφάλειά του και θα παρέχει περισσότερες πληροφορίες για το κλινικό όφελός του είναι στην παρούσα φάση σε εξέλιξη. (NCT02090959) Αυτή τη στιγμή το φάρμακο έχει λάβει προσωρινή έγκριση για χορήγηση σε επιλεγμένους ασθενείς άνω των πέντε ετών σε κράτη της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την εμπορική ονομασία Translarna™.

Έχουν σχεδιαστεί και άλλοι παράγοντες για καταστολή αντιγονοματικών νουκλεοτιδίων. Στην παρούσα φάση βρίσκεται σε εξέλιξη μία μελέτη φάσης II του παράγοντα Arbekacin Sulfate (NPC-14) (NCT01918384).

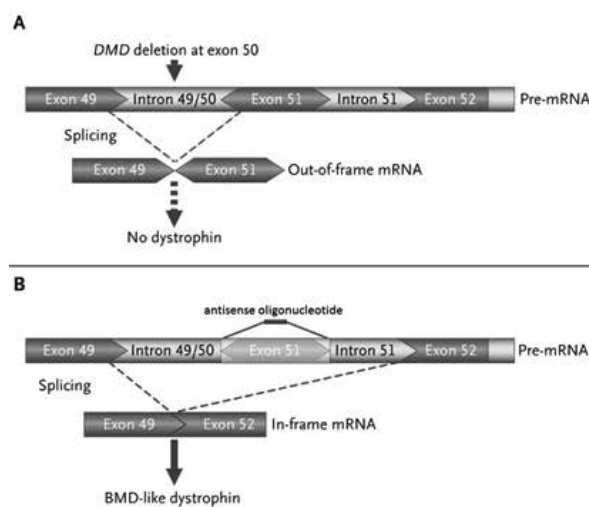
Παράκαμψη Εξονίων (Exon Skipping)

Η παράκαμψη εξονίων είναι μία πολύ υποσχόμενη μέθοδος για τη θεραπευτική προσέγγιση της DMD. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η αποκατάσταση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου της δυστροφίνης και στηρίζεται σε αλληλοουσιότητες ολιγονουκλεοτιδίων (antisense oligonucleotides, AONs) οι οποίες είναι χημικώς συντιθέμενα DNA ή RNA μόρια, σχεδιασμένα προκειμένου να προσδένονται σε συμπληρωματική αλληλοουσιότητα του mRNA. Με αυτό τον τρόπο, συγκεκριμένα εξόνια δε συμπεριλαμβάνονται στο ώριμο mRNA και ο γενετικός κώδικας επανέρχεται εντός πλαισίου, παράγοντας μία βραχύτερη αλλά ωστόσο μερικώς λειτουργική δυστροφίνη, παρόμοια με εκείνη η οποία απαντάται στη BMD⁽²²⁾ (Εικόνα 3).

Η παράκαμψη εξονίων είναι μία θεραπευτική προσέγγιση ειδική για κάθε μετάλλαξη, διότι υπάρχουν πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις οι οποίες απαιτούν στόχευση διαφορετικών εξονίων. Οι Bladen et al.⁽⁸⁾ υπολόγισαν ότι το 55% των συνολικών μεταλλάξεων και το 80% των διαγραφών θα μπορούσαν θεωρητικά να αντιμετωπιστούν με παράκαμψη εξονίων. Οι αρχικές κλινικές μελέτες στόχευσαν την παράκαμψη του εξονίου 51, καθώς αφορά ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με DMD.

Μετά από θετικά αποτελέσματα μελετών παράκαμψης εξονίων σε *mdx* επίμυες, σχεδιάστηκε μία κλινική μελέτη στην οποία συμμετείχαν τέσσερα αγόρια με

Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της παράκαμψης εξονίων, σε έναν ασθενή με DMD που έχει διαγραφή του εξονίου 50. (α) Η απουσία του εξονίου 50 οδηγεί σε δημιουργία ενός mRNA, το οποίο οδηγεί σε κωδικόνιο λήξης στο εξόνιο 51. (β) Μία αλληλοουσιότητα ολιγονουκλεοτιδίων συνδέεται στο εξόνιο 51 και το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αποκαθίσταται, επιτρέποντας τη σύνθεση μίας μερικώς λειτουργικής δυστροφίνης⁽²³⁾



DMD, τα οποία είχαν διαγραφές οι οποίες θα μπορούσαν να επιδιορθωθούν με παράκαμψη του εξονίου 51. Κάθε ασθενής έλαβε μία ενδομυϊκή ένεση της ουσίας PRO051 στον πρόσθιο κνημιαίο μυ, η οποία είναι ένα AON συμπληρωματικό μίας αλληλοουσιότητας νουκλεοτιδίων του εξονίου 51. Δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Έπειτα από 28 ημέρες έγινε βιοψία μυός και με τεχνικές αναστροφής PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), ανοσοφθορισμού και Western Blot ανάλυση βρέθηκε ότι έγινε επαγωγή της έκφρασης δυστροφίνης στον πρόσθιο κνημιαίο μυ⁽²³⁾.

Έπειτα από αυτά τα αποτελέσματα οι Goemans et al.⁽²⁴⁾ δημοσίευσαν τα αποτελέσματα μίας μελέτης φάσης II, στην οποία η ουσία PRO051 χορηγήθηκε υποδορίως σε 12 αγόρια με DMD. Παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη έκφραση δυστροφίνης στην πλειοψηφία των ασθενών, ενώ μετά από τρίμηνη επέκταση της θεραπευτικής παρέμβασης παρατηρήθηκε ικανοποιητική βελτίωση στο 6MWD.

Ωστόσο, μία μεγαλύτερη, τυχαίοποιημένη, ελεγχόμενη με το εικονικό φάρμακο μελέτη φάσης III στην οποία συμμετείχαν 186 αγόρια με DMD δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική υπεροχή στις λειτουργικές δοκιμασίες στους ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο drisapersen (PRO051), σε σύγκριση με εκείνους που έλαβαν placebo⁽²⁵⁾. Το 2018 ανεστάλη η περαιτέρω ανάπτυξη του drisapersen.

Τα αποτελέσματα μίας άλλης μελέτης στην οποία συμμετείχαν επτά ασθενείς με DMD δημοσιεύτηκαν

το 2009⁽²⁶⁾. Το μόριο AVI-4658, το οποίο είναι ένα AON που στοχεύει το εξόνιο 51, χορηγήθηκε ενδομυϊκώς στους ασθενείς και ελήφθησαν βιοψίες τέσσερις εβδομάδες αργότερα. Δεν παρατηρήθηκαν ανοσοολογικές αντιδράσεις έναντι της δυστροφίνης, ούτε ανεπιθύμητες ενέργειες. Η έκφραση της δυστροφίνης ήταν ικανοποιητική και βρέθηκε αυξημένη στην κοόρτη στην οποία χορηγήθηκε υψηλότερη δόση AVI-4658. Η μέση έκφραση της δυστροφίνης στους μυς των ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε AVI-4658 ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με εκείνη των μυών στους οποίους χορηγήθηκε placebo, όπως μετρήθηκε με μία μέθοδο ποσοτικής ανοσοϊστοχημείας. Επιπλέον, σε μία μελέτη που ακολούθησε παρατηρήθηκε ότι τέσσερις από τους προηγούμενους ασθενείς, οι οποίοι έλαβαν την υψηλότερη δόση του AVI-4658, είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των συστατικών του DGC, το οποίο είναι ένδειξη ότι η νεο-εκφραζόμενη δυστροφίνη είναι λειτουργική και μπορεί να αποκαταστήσει το DGC⁽²⁷⁾.

Τα θετικά αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης οδήγησαν σε μία κλινική μελέτη φάσης II⁽²⁸⁾ στην οποία συμμετείχαν 19 ασθενείς με DMD στους οποίους χορηγήθηκε ενδοφλεβίως AVI-4658. Δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Η έκφραση της δυστροφίνης ήταν δοσοεξαρτώμενη και επτά ασθενείς, οι οποίοι ανήκαν στις κοόρτες που έλαβαν τις υψηλότερες δόσεις του φαρμάκου, ανταποκρίθηκαν στην αγωγή. Η μέση έκφραση της δυστροφίνης, η οποία εκτιμήθηκε με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και Western Blot ανάλυση, κυμαινόταν μεταξύ 8.9% και 16.4% εκείνης των υγιών ιστών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Επιπλέον, οι ασθενείς με την υψηλότερη έκφραση δυστροφίνης είχαν αποκατάσταση συστατικών του DGC στο σαρκείλλημα.

Το 2013 οι Mendell et al. ανακοίνωσαν τα αποτελέσματα μίας διπλής τυφλής, ελεγχόμενης με placebo μελέτης του eteplirsen (AVI-4658) στην οποία συμμετείχαν 12 ασθενείς. Βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης δυστροφίνης ($p \leq 0.002$) στους ασθενείς που έλαβαν eteplirsen σε σχέση με εκείνους που έλαβαν placebo, με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού. Επιπλέον, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική υπεροχή στις λειτουργικές δοκιμασίες (6MWD) ($p \leq 0.001$) στους ασθενείς που έλαβαν eteplirsen σε σύγκριση με το placebo⁽²⁹⁾. Το 2016 το eteplirsen έλαβε προσωρινή έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία των ασθενών με DMD που έχουν μετάλλαξη δυνητικά επιδιορθώσιμη με παράκαμψη του εξονίου 51 και κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Exondys 51TM. Ωστόσο, πολύ πρόσφατα (Μάιος 2018) ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) δεν έδωσε έγκριση για την κυκλοφορία του φαρμάκου και πρόκειται να γίνουν περαιτέρω αξιολογήσεις. Στην παρούσα φάση μία μεγάλη επιβεβαιωτική μελέτη για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του eteplirsen βρίσκεται σε εξέλιξη (NCT02255552).

Εκτός από το εξόνιο 51, υπολογίζεται ότι μεγάλο ποσοστό ασθενών με DMD έχουν μεταλλάξεις που θα μπορούσαν να επιδιορθωθούν με στόχευση του εξονίου 53. Πολύ πρόσφατα δημοσιεύτηκε μία μελέτη φάσης I, στην οποία συμμετείχαν 10 ασθενείς με DMD με μεταλλάξεις επιδιορθώμενες με στόχευση του εξονίου 53. Χορηγήθηκε το μόριο NS-065/NCNP-01 το οποίο είναι ένα AON που σχεδιάστηκε για να επάγει παράκαμψη του εξονίου 53. Δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ στη βιοψία μυός παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης δυστροφίνης στην πλειοψηφία των ασθενών⁽³⁰⁾. Μία μελέτη φάσης II για το ανωτέρω φάρμακο βρίσκεται σε εξέλιξη (NCT03167255).

Γονιδιακή θεραπεία (Viral-mediated gene therapy)

Ο στόχος της γονιδιακής θεραπείας στη DMD είναι η χορήγηση ενός λειτουργικού αντίγραφου του γονιδίου της δυστροφίνης, ώστε να αποκατασταθεί η μυϊκή λειτουργία. Παρόλο που η γενική ιδέα της γονιδιακής θεραπείας μοιάζει απλή, υπάρχουν διάφορα εμπόδια τα οποία περιπλέκουν την εφαρμογή της. Ένα εξ αυτών είναι το μεγάλο μέγεθος του γονιδίου της δυστροφίνης, το οποίο καθιστά δύσκολους τους χειρισμούς του⁽³¹⁾.

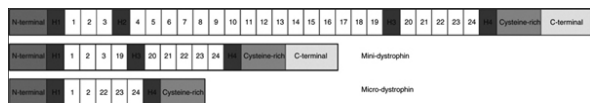
Η παρατήρηση ότι οι ασθενείς με BMD έχουν ηπιότερη μορφή της νόσου οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η δυστροφίνη τους διατηρεί σημαντικό βαθμό λειτουργικότητας, παρόλο που είναι βραχύτερη. Είναι αξιοσημείωτη η αναφορά στη βιβλιογραφία ενός ασθενούς με BMD με διαγραφή ενός κεντρικού τμήματος του γονιδίου της δυστροφίνης. Η απύσχα περιοχή περιελάμβανε περίπου το ήμισυ της κωδικοποιούμενης πληροφορίας. Εντούτοις, ο ασθενής ήταν ακόμα περιπατητικός στην ηλικία των 61 ετών⁽³²⁾.

Για το λόγο αυτό, έγιναν χειρισμοί στο γονίδιο της δυστροφίνης και κατασκευάστηκε cDNA δυστροφίνης πλήρους μήκους, που περιελάμβανε μόνο τις κωδικοποιούμενες περιοχές του γονιδίου. Επιπλέον, σχεδιάστηκαν γονίδια μινι-δυστροφίνης και μικρο-δυστροφίνης, τα οποία είναι βραχύτερα παραλλαγές του γονιδίου της δυστροφίνης (Εικόνα 4). Ο χειρισμός τους είναι ευκολότερος και είναι συμβατά με τη χωρητική ικανότητα των ιών φορέων⁽³³⁾.

Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα αφορά θέματα ασφάλειας, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις οι ιοί φορείς μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές ανοσοολογικές αντιδράσεις. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχουν κυκλοφορούντα αντισώματα που κατευθύνονται εναντίον του ιού φορέα και αποτρέπουν τη διαμόρφωση ή το εισαχθέν γονίδιο μπορεί να κινητοποιήσει ανοσοολογικούς μηχανισμούς που θα οδηγήσουν στην καταστροφή των μυϊκών κυττάρων⁽³¹⁾.

Αρχικά, ο αδενοϊός θεωρήθηκε ο πλέον κατάλληλος φορέας για τη γονιδιακή θεραπεία της DMD λόγω της μεγάλης χωρητικότητας του ικανότητας. Ωστόσο, αποδείχτηκε ότι ήταν ανοσογενετικός και αντισώματα

Εικόνα 4. Το cDNA της δυστροφίνης πλήρους μήκους και βραχύτερες παραλλαγές μινι-δυστροφίνης και μικρο-δυστροφίνης⁽⁷⁾



έναντι του καψιδίου του αδενοϊού είναι πολύ κοινά στους ανθρώπους⁽³⁴⁾.

Ακολουθώς χρησιμοποιήθηκε ένας ιός της οικογένειας των παρβοϊών, ο ιός που σχετίζεται με αδενοϊό (adeno-associated virus, AAV), ο οποίος είναι ένας μικρός, μη παθογόνος, DNA παρβοϊός μονής έλικας⁽³⁴⁾. Οι Wang et al. κατασκεύασαν γονίδια μινι-δυστροφίνης που ενσωματώθηκαν μέσα σε AAV φορείς, οι οποίοι χορηγήθηκαν ενδομυϊκώς σε *mdx* επίμους. Δύο από τα γονίδια μινι-δυστροφίνης πέτυχαν αποτελεσματική και μακροχρόνια έκφραση στην πλειοψηφία των μυοϊνιδίων των μυών που στοχεύτηκαν και υπήρξε ένδειξη της αποκατάστασης των συστατικών του DGC. Επιπλέον, δεν ανιχνεύτηκε ανοσολογική αντίδραση έναντι των μυοϊνιδίων⁽³⁵⁾.

Στη συνέχεια, δημοσιεύτηκαν μελέτες που έγιναν σε πειραματικά μοντέλα μεγαλύτερων ζώων. Σε μία μελέτη, ένας AAV8 φορέας που μετέφερε ένα γονίδιο μικρο-δυστροφίνης χορηγήθηκε ενδομυϊκώς σε πρωτεύοντα. Η γονιδιακή έκφραση ήταν αποτελεσματική και σταθερή. Ακολουθώς, το διαγονίδιο χορηγήθηκε ενδοφλεβίως, ωστόσο η αποτελεσματικότητα της δι-αμόλυνσης επηρεαζόταν από την παρουσία αντισωμάτων έναντι του AAV8. Ήταν περίπου δύο φορές υψηλότερη στα ζώα χωρίς προϋπάρχοντα αντισώματα σε σύγκριση με εκείνα με θετικό τίτλο αντισωμάτων. Ανοσολογική αντίδραση έναντι της μικρο-δυστροφίνης ή του φορέα δεν ανιχνεύτηκε⁽³⁶⁾.

Σε μία πρόσφατη κλινική μελέτη⁽³⁷⁾ όπου συμμετείχαν έξι ασθενείς με DMD, ένας rAAV (recombinant AAV) φορέας που μετέφερε ένα γονίδιο μινι-δυστροφίνης χορηγήθηκε ενδομυϊκώς. Σε μερικούς ασθενείς μετά τη θεραπεία ανιχνεύτηκαν T-λεμφοκύτταρα που στόχευαν επιτόπους δυστροφίνης, ακόμα και στις περιπτώσεις που δεν υπήρχε ανιχνεύσιμη έκφραση δυστροφίνης στη βιοψία μυός, εύρημα που είναι ένδειξη αποτελεσματικής μεταφοράς του γονιδίου. Επιπλέον, T-λεμφοκύτταρα είχαν ανιχνευτεί σε δύο ασθενείς πριν τη χορήγηση του θεραπευτικού γονιδίου, εύρημα που υποδηλώνει ότι η T-λεμφοκυτταρική ανοσία μπορεί να αποτρέψει την επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας, συνεπώς πρέπει να λαμβάνεται υπόψη.

Για την παράκαμψη εξονίων μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ιοί φορείς. Αυτή η προσέγγιση έγινε σε μία μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα ζωικό μοντέλο κυνοειδών (Golden Retriever Model of DMD, GRMD). Χορηγήθηκε ενδοκαρδιακώς ένας rAAV6 φορέας που έφερε ένα μικρό πυρηνικό RNA με μία αλληλουχία σχεδιασμένη ώστε να επάγει παράκαμψη

εξονίων και να υποκαθιστά το πλαίσιο ανάγνωσης της δυστροφίνης. Παρατηρήθηκε αποκατάσταση της έκφρασης της δυστροφίνης του καρδιακού μυός 13 μήνες μετά τη θεραπεία και η καρδιακή λειτουργία ελέγχθηκε βελτιωμένη με απεικονιστικές μεθόδους⁽³⁸⁾.

Επιπλέον, πρόσφατα αναπτύχθηκε μία πρωτοποριακή μέθοδος για τη χορήγηση ολόκληρης της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου της δυστροφίνης, το οποίο περιέχει δομές κρίσιμες για τη σωστή λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και επομένως για την ακεραιότητα του σαρκεϊλήματος. Χρησιμοποιήθηκε ένα τριπλό σύστημα ανεξάρτητων AAV φορέων το οποίο φέρει «εν σειρά» όλες τις αλληλουχίες εξονίων του γονιδίου, επιτρέποντας την έκφραση ακέραιας της πρωτεΐνης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα λειτουργικά αποτελέσματα, παρακάμπτοντας το εμπόδιο του μεγάλου μεγέθους του γονιδίου της δυστροφίνης⁽³⁹⁾.

Τέλος, ένα πολύ υποσχόμενο εργαλείο για τη γονιδιακή θεραπεία της DMD είναι η τεχνολογία CRISPR/Cas. Τα CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), τα οποία είναι DNA αλληλουχίες, καθώς και οι σχετιζόμενες με αυτά πρωτεΐνες Cas (CRISPR associated proteins, Cas) είναι βασικά στοιχεία της ανοσίας των βακτηρίων ενάντια στους ιούς και τα πλάσμιδια. Το CRISPR/Cas σύστημα επάγει δι-αμεσολαβούμενη από RNA στόχευση συγκεκριμένων αλληλουχιών εξωγενών νουκλεϊκών οξέων⁽⁴⁰⁾. Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Bengtsson et al.⁽⁴¹⁾ χρησιμοποίησαν AAV φορείς προκειμένου να τροποποιήσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του γονιδίου της δυστροφίνης σε *mdx^{4cv}* επίμους με την τεχνολογία CRISPR/Cas9. Η γονιδιακή τροποποίηση που επετεύχθη μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 ήταν αποτελεσματική στο να επάγει την έκφραση δυστροφίνης στο μυϊκό ιστό των *mdx^{4cv}* επίμους. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ ενθαρρυντικά για την περαιτέρω ανάπτυξη ερευνητικών προσεγγίσεων βάσει αυτής της τεχνολογίας.

Στρατηγικές τροποποίησης της έκφρασης ουτροφίνης

Η ουτροφίνη (utrophin) είναι μία πρωτεΐνη η οποία έχει πολλές ομοιότητες στη δομή της με τη δυστροφίνη. Εκφράζεται στο σαρκεϊλήμα των μυϊκών βλαστικών κυττάρων και προοδευτικά αντικαθίσταται από δυστροφίνη⁽⁴²⁾. Σε μία μελέτη βιοψίας μυός ασθενών με DMD στους οποίους η δυστροφίνη δεν εκφράζεται, παρατηρήθηκε υπερέκφραση της ουτροφίνης, ενδεικτικό της ικανότητας της ουτροφίνης να υποκαθιστά μερικώς τη λειτουργικότητα της δυστροφίνης⁽⁴³⁾.

Συνεπώς, μία θεραπευτική προσέγγιση για τη DMD θα ήταν η ενίσχυση της έκφρασης του γονιδίου της ουτροφίνης. Σε μία μελέτη παρατηρήθηκε βελτίωση της μυϊκής συσταλτικότητας και πτώση των επιπέδων της CK ορού στους *mdx* επίμους στους οποίους χορηγήθηκε για έξι εβδομάδες ενδοπεριτοναϊκώς ουτροφίνη συντηγμένη με το πεπτικό TAT, το οποίο διευκολύνει

την είσοδο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα μυϊκά κύτταρα⁽⁴⁴⁾. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι είναι εφικτή η αναπλήρωση της έλλειψης δυστροφίνης με άμεση αντικατάστασή της από ουτροφίνη σε *mdx* επίμυες.

Πρόσφατα δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα μίας μελέτης φάσης I στην οποία συμμετείχαν 12 ασθενείς με DMD. Χορηγήθηκε η ουσία SMT C1100, η οποία είναι τροποποιητής της έκφρασης ουτροφίνης. Δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες⁽⁴⁵⁾. Μία κλινική μελέτη φάσης II, η οποία θα αξιολογήσει τη δραστηριότητα και την ασφάλεια του SMT C1100, βρίσκεται αυτή τη στιγμή σε εξέλιξη. (NCT02858362)

Συζήτηση και συμπεράσματα

Η DMD είναι ένα θανατηφόρο γενετικό νόσημα. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της δυστροφίνης εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του, το οποίο το καθιστά επιρρεπές σε μεταλλάξεις.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν σε μυϊκή εκφύλιση είναι περίπλοκοι. Ωστόσο, είναι πολύ σημαντικό να αποσαφηνιστούν, καθώς αυτό μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη θεραπειών οι οποίες στοχεύουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια⁽⁴⁶⁾.

Η θεραπεία καταστολής αντινοσηματικών νουκλεοτιδίων μπορεί να εφαρμοστεί σε μία μειοψηφία ασθενών οι οποίοι έχουν αντινοσηματικές μεταλλάξεις. Από την άλλη, η παράκαμψη εξονίων είναι μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση, η οποία θεωρητικά μετατρέπει τη DMD σε BMD. Ο τύπος της μετάλλαξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να γίνει σχεδιασμός των κατάλληλων AONs, συνεπώς η ακριβής γενετική διάγνωση είναι επιβεβλημένη. Εξαιτίας των πολλών διαφορετικών μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στους ασθενείς με DMD πρέπει να σχεδιαστούν πολλές AONs αλληλοαποκλειστικές, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να θεραπευτούν όλοι οι ασθενείς, ακόμα και με εξατομικευμένες θεραπείες, στην περίπτωση σπάνιων μεταλλάξεων⁽⁴⁷⁾.

Σε αντίθεση με την παράκαμψη εξονίων, η γονιδιακή θεραπεία για τη DMD είναι ανεξάρτητη του τύπου της μετάλλαξης και θεωρητικά μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους ασθενείς με DMD⁽⁴⁸⁾. Βασικοί προβληματισμοί είναι οι ανοσοολογικές αντιδράσεις εναντίον των ιών φορέων και των διαγονιδιακών προϊόντων τα οποία εισάγονται στον οργανισμό.

Οι μυϊκοί ιστός είναι ο μεγαλύτερος στον ανθρώπινο οργανισμό και είναι βασικό οποιαδήποτε θεραπεία να στοχεύει όλους τους μυς, συμπεριλαμβανομένων και των αναπνευστικών μυών. Εκτός από το σκελετικό μυ, η δυστροφίνη ανευρίσκεται και στον καρδιακό μυ. Η καρδιομυοπάθεια είναι μία από τις βασικές αιτίες θανάτου των ασθενών με DMD. Μία σημαντική πρόκληση θα ήταν η ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν τον καρδιακό μυ εξίσου αποτελεσματικά με το σκελετικό μυ⁽⁴⁹⁾.

Συμπερασματικά, οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στη DMD είναι περίπλοκοι. Παρόλο που οι υποστηρικτικές παρεμβάσεις έχουν επιτύχει παράταση της επιβίωσης και βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, είναι σημαντικό να βρεθεί μία αποτελεσματική θεραπεία για αυτή τη συνηθισμένη παιδιατρική πάθηση. Παρόλο που ακόμα υπάρχουν πολλά εμπόδια, οι τρέχουσες εξελίξεις και οι κλινικές μελέτες δείχνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

1. Verma, S., Y. Anziska, et al. (2010). «Review of Duchenne muscular dystrophy (DMD) for the pediatricians in the community. [Review]». *Clinical Pediatrics* 49(11): 1011-1017.
2. Mah, J.K., L. Korngut, et al. (2014). «A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy». *Neuromuscul Disord.* 24(6):482-91
3. Muntoni, F., S. Torelli, et al. (2003). «Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. [Review] [149 refs]». *Lancet Neurology* 2(12): 731-740.
4. Hoogerwaard, E.M., E. Bakker, et al. (1999). «Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study». *Lancet* 353(9170):2116-9.
5. Lee, S.H., J.H. Lee, et al. (2015). «Clinical and Genetic Characterization of Female Dystrophinopathy». *J Clin Neurol.* 11(3):248-51
6. Davies, K. E. and K. J. Nowak (2006). «Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. [Review] [134 refs]». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(10): 762-773.
7. Pichavant, C., A. Aartsma-Rus, et al. (2011). «Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. [Review]». *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 19(5): 830-840.
8. Bladen, C.L., D. Salgado, et al. (2015). «The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations». *Hum Mutat.* 36(4):395-402
9. Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). «An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus». *Genomics* 2(1): 90-95.
10. Muntoni, F., S. Torelli, et al. (2003). «Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes». *Lancet Neurol.* 2(12):731-40.
11. Fairclough, R. J., A. Bareja, et al. (2011). «Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy». *Experimental Physiology* 96(11): 1101-1113.
12. Chen, Y. W., P. Zhao, et al. (2000). «Expression profiling in the muscular dystrophies: identifica-

- tion of novel aspects of molecular pathophysiology». *Journal of Cell Biology* 151(6): 1321-1336.
13. Galbiati, F., D. Volonte, et al. (2000). «Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(17): 9689-9694.
 14. Lai, Y., G. D. Thomas, et al. (2009). «Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy». *Journal of Clinical Investigation* 119(3): 624-635.
 15. Kumar, A., Y. Takada, et al. (2004). «Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. [Review] [195 refs]». *Journal of Molecular Medicine* 82(7): 434-448.
 16. Spencer, M. J. and R. L. Mellgren (2002). «Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology». *Human Molecular Genetics* 11(21): 2645-2655.
 17. Aurino, S. and V. Nigro (2006). «Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy. [Review] [45 refs]». *Acta Myologica* 25(1): 5-12.
 18. Barton-Davis, E. R., L. Cordier, et al. (1999). «Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice». *Journal of Clinical Investigation* 104(4): 375-381.
 19. Malik, V., L. R. Rodino-Klapac, et al. (2010). «Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy». *Annals of Neurology* 67(6): 771-780.
 20. Welch, E. M., E. R. Barton, et al. (2007). «PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations». *Nature* 447(7140): 87-91.
 21. Bushby, K., R. Finkel, et al. (2014). «Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy». *Muscle Nerve* 50(4):477-87
 22. Aartsma-Rus, A. and G.-J. B. van Ommen (2009). «Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy». *The Lancet Neurology* 8(10): 873-875.
 23. van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). «Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051». *New England Journal of Medicine* 357(26): 2677-2686.
 24. Goemans, N., M. Tulinius, et al. (2011). «Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy». *N Engl J Med* 364(16):1513-22.
 25. Goemans, N., E. Mercuri, et al. (2018). «A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide, drisapersen, in Duchenne muscular dystrophy». *Neuromuscul Disord.* 28(1):4-15.
 26. Kinali, M., V. Arechavala-Gomez, et al. (2009). «Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study.[Erratum appears in *Lancet Neurol.* 2009 Dec;8(12):1083]». *Lancet Neurology* 8(10): 918-928.
 27. Cirak, S., L. Feng, et al. (2012). «Restoration of the dystrophin-associated glycoprotein complex after exon skipping therapy in Duchenne muscular dystrophy». *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 20(2): 462-467.
 28. Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, et al. (2011). «Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study». *Lancet* 378(9791): 595-605.
 29. Mendell, J.R., L.R. Rodino-Klapac, et al. (2013). «Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy». *Ann Neurol.* 74(5):637-47.
 30. Komaki, H., T. Nagata, et al. (2018). «Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy». *Sci Transl Med.* 10(437).
 31. Odom, G. L., G. B. Banks, et al. (2010). «Pre-clinical studies for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. [Review]». *Journal of Child Neurology* 25(9): 1149-1157.
 32. England, S. B., L. V. Nicholson, et al. (1990). «Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin». *Nature* 343(6254): 180-182.
 33. Harper, S. Q., M. A. Hauser, et al. (2002). «Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy». *Nature Medicine* 8(3): 253-261.
 34. Rodino-Klapac, L. R., L. G. Chicoine, et al. (2007). «Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. [Review] [48 refs]». *Archives of Neurology* 64(9): 1236-1241.
 35. Wang, B., J. Li, et al. (2000). «Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25): 13714-13719.
 36. Rodino-Klapac, L. R., C. L. Montgomery, et al. (2010). «Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery». *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 18(1): 109-117.
 37. Mendell, J. R., K. Campbell, et al. (2010). «Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystro-

- phy». *New England Journal of Medicine* 363(15): 1429-1437.
38. Bish, L. T., M. M. Sleeper, et al. (2012). «Long-term Restoration of Cardiac Dystrophin Expression in Golden Retriever Muscular Dystrophy Following rAAV6-mediated Exon Skipping». *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 20(3): 580-589.
 39. Koo, T., L. Popplewell, et al. (2014). «Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice». *Hum Gene Ther* 25(2):98-108.
 40. Barrangou R. (2015). «The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond». *Curr Opin Immunol.* 32:36-41.
 41. Bengtsson, N.E., J.K. Hall, et al. (2017). «Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy». *Nat Commun.* 8:14454.
 42. Schofield, J., D. Houzelstein, et al. (1993). «Expression of the dystrophin-related protein (utrophin) gene during mouse embryogenesis». *Dev Dyn.* 198(4):254-64.
 43. Mizuno, Y., I. Nonaka, et al. (1993). «Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects». *Journal of the Neurological Sciences* 119(1): 43-52.
 44. Sonnemann, K. J., H. Heun-Johnson, et al. (2009). «Functional substitution by TAT-utrophin in dystrophin-deficient mice». *PLoS Medicine / Public Library of Science* 6(5): 26.
 45. Ricotti, V., S. Spinty, et al. (2016). «Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-Arylbenzoxazole Utrophin Modulator, following Single- and Multiple-Dose Administration to Pediatric Patients with Duchenne Muscular Dystrophy». *PLoS One* 11(4):e0152840.
 46. Allen, D. G. and N. P. Whitehead (2011). «Duchenne muscular dystrophy-what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? [Review]». *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43(3): 290-294.
 47. Guglieri, M. and K. Bushby (2010). «Molecular treatments in Duchenne muscular dystrophy. [Review]». *Current Opinion in Pharmacology* 10(3): 331-337.
 48. Goyenvalle, A., J. T. Seto, et al. (2011). «Therapeutic approaches to muscular dystrophy. [Review]». *Human Molecular Genetics* 20(R1): 15.
 49. Spurney, C. F. (2011). «Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions [Review]». *Muscle & Nerve* 44(1): 8-19.