

Η ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΤΗΣ ΝΩΤΙΑΙΑΣ ΜΥΪΚΗΣ ΑΤΡΟΦΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑ ΣΗΜΕΡΙΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Παναγιώτης Παρασκευόπουλος¹, Άγγελος Σωρανίδης², Δημήτριος Παρίσης³, Νικόλαος Γρηγοριάδης³

¹ Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Ιατρικής

² Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Ιατρικής

³ Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «ΑΧΕΠΑ», Β' Νευρολογική Κλινική του ΑΠΘ

Περίληψη

Η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (SMA) είναι μία νευροεκφυλιστική μυατροφική νόσος με γενετικό υπόβαθρο. Αποτελεί την συχνότερη γενετική αιτία θανάτου στα βρέφη. Η παθογένεια της βασίζεται στην ανεπάρκεια της πρωτεΐνης SMN λόγω απουσίας του γονιδίου SMN1. Στον άνθρωπο υπάρχει και ένα δεύτερο γονίδιο, το SMN2, που παράγει SMNΔ7. Στην σημερινή εποχή χάρη σε καινοτόμες φαρμακευτικές ουσίες, οι ελπίδες γύρω από την θεραπεία της SMA έχουν αναζωπυρωθεί. Η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση παρουσιάζει τον παθογενετικό μηχανισμό της νόσου και τα νέα φαρμακευτικά δεδομένα που διαμορφώνονται με ραγδαίο τρόπο στον ορίζοντα της θεραπείας. Το *Nusinersen*, ένας ASO που οδηγεί το SMN2 σε εναλλακτικό μάτισμα, αποτέλεσε το πρώτο φάρμακο που έλαβε την έγκριση του οργανισμού FDA το 2016. Παράλληλα αναπτύσσονται και άλλες στρατηγικές αντιμετώπισης της νόσου, όπως η εισαγωγή του γονιδίου SMN1 στον πυρήνα μέσω ιικών φορέων (*scAAV9*, που έγινε το δεύτερο εγκεκριμένο από τον FDA φάρμακο το 2019), η τροποποίηση του ματίσματος (*Risdiplam*), η νευροπροστασία (*Olesoxime*) και η βελτίωση της μυϊκής σύσπασης (*Tiraseptin*).

Λέξεις ευρετηρίου: Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία, νευροεκφύλιση, πρωτεΐνη SMN, γονίδιο SMN2, θεραπευτικοί στόχοι, Nusinersen, scAAV9

THE CHALLENGE OF SPINAL MUSCULAR ATROPHY AND THE NEW THERAPEUTIC DATA

Panayiotis Paraskevopoulos¹, Angelos Soranidis², Dimitrios Parisis³, Nikolaos Grigoriadis³

¹ Aristotle University of Thessaloniki, Medical School

² National and Kapodistrian University of Athens, Medical School

³ University General Hospital of Thessaloniki "AHEPA", 2nd Department of Neurology

Abstract

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is an inherited genetic disorder that results in neurodegeneration and muscle atrophy. It is the leading genetic cause of death among infants. Pathogenesis of SMA is linked to the deletion of the Survival Motor Neuron 1 (SMN1) gene, causing non-sufficient expression of Survival Motor Neuron (SMN) protein. The human chromosome contains an almost identical copy of the SMN1 gene, named SMN2, transcription of which results mostly in a non-functional protein called SMNΔ7. Research on an effective therapeutic approach of the disease has been underway and only recently there have been major breakthroughs. This review presents the pathogenetic mechanism of SMA and focuses on new treatments that show a lot of promise, including Nusinersen and scAAV9, two drugs that only recently gained approval by the FDA.

Key words: Spinal Muscular Atrophy, Survival of Motor Neuron protein, SMN1 gene, SMN2 gene, Nusinersen, scAAV9

Εισαγωγή και κλινικά χαρακτηριστικά

Η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (Spinal Muscular Atrophy, SMA) είναι μία αυτοσωμικού υπολειπόμενου τύπου, κληρονομική, νευροεκφυλιστική νόσος του κατώτερου κινητικού νευρώνα. Αποτελεί την κύρια γενετική αιτία παιδικής θνησιμότητας, καθώς ο επιπολασμός της νόσου είναι περίπου 1 στις 10.000 γεννήσεις και της φορείας 1 στα 50 άτομα [1]. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια των νευρώνων στα πρόσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού, για τα νωτιαία κινητικά νεύρα, και στο Εγκεφαλικό Στέλεχος, για τα κρανιακά κινητικά νεύρα. Αποτέλεσμα είναι η απονεύρωση των σκελετικών μυών, η ατροφία τους και η εμφάνιση μυϊκής αδυναμίας, υποτονίας και χαλαρής παράλυσης [2]. Υπάρχει ασάφεια ως προς το εάν η βλάβη αφορά πρωτοπαθώς τα κινητικά νεύρα και δευτεροπαθώς τους μύες ή εάν συνυπάρχει πρωτοπαθή βλάβη και στους δύο αυτούς ιστούς [3]. Με την πρόοδο της νόσου, και συνεπώς της απώλειας των α-κινητικών νευρώνων, χάνεται σταδιακά η λειτουργία των μυών του προσώπου, του κορμού και των άκρων, έως ότου, σε προχωρημένου βαθμού νευροεκφύλιση, να επηρεάζεται η λειτουργία των μυών κατάποσης και αναπνοής, με κατάληξη τον θάνατο από αναπνευστική ανεπάρκεια. Επιπρόσθετα, ενώ η νευρωνική βλάβη είναι το κυρίαρχο στοιχείο της παθογένειας της νόσου, υπάρχουν ενδείξεις ότι και άλλοι ιστοί και όργανα εμπλέκονται στην παθολογία της, πχ καρδιά και ήπαρ [4-6].

Με βάση την ηλικία εμφάνισης της κλινικής σημειολογίας και του οροσμήνου της κινητικής ανάπτυξης που επιτυγχάνεται, η νόσος ιστορικά διαχωρίζεται σε 5 τύπους, με σταδιακή βελτίωση της πρόγνωσης και της επιβίωσης [7, 8]. Στον Τύπο 0, την πιο σοβαρή μορφή της νόσου, η εκφύλιση ξεκινά κατά την ενδομήτριο ζωή και το άτομο δεν ζει κατά κανόνα πάνω από μερικές εβδομάδες μετά την γέννηση. Αντίθετα στον Τύπο 4, η νευροεκφύλιση ξεκινά μετά το 30^ο έτος της ηλικίας, δεν απολήγει σε σοβαρή κινητική διαταραχή και το άτομο έχει φυσιολογικό προσδόκιμο ζωής (πίνακας 1). Τον πιο συχνό αποτελεί ο τύπος Ι (~60%) [1].

Μοριακή βιολογία και παθοφυσιολογία της νόσου

Κύριο ρόλο στην παθογένεια της νόσου παίζει η πρωτεΐνη SMN (survival motor neuron protein) [9, 10]. Η πρωτεΐνη SMN έχει μέγεθος 38 kDa και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα όλων των κυτάρων του ανθρώπινου οργανισμού [11]. Έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε πληθώρα διεργασιών του κυττάρου, μιας και χαρακτηρίζεται από πληθώρα domains που αλληλεπιδρούν με διαφορετικές ομάδες πρωτεϊνών. Η SMN ρυθμίζει σχεδόν κάθε πτυχή του μεταβολισμού των RNA όπως είναι η μεταγραφή, το μάτισμα, η γένεση των snRNPs και τελομερασών, η επεξεργασία των

ιστονών, οι διεργασίες σύνθεσης των selenoproteins, η δημιουργία των stress granules και η μεταφορά των mRNA. Επιπλέον συμμετέχει σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η επισκευή βλαβών του DNA, η αυτοφαγία και πιθανόν εκτελεί και άλλες πιο ειδικές λειτουργίες στο νευρικό κύτταρο (βλέπε παρακάτω) [12, 13].

Στον άνθρωπο δύο γονίδια κωδικοποιούν την SMN, το SMN1 και το SMN2. Δεν έχει παρατηρηθεί ομόζυγη απώλεια και των δυο γονιδίων και επομένως θεωρείται μη βιώσιμη κατάσταση. [14] Στο 95% των περιπτώσεων με Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία παρατηρείται ομόζυγη απουσία του γονιδίου SMN1, ενώ το υπόλοιπο των περιπτώσεων οφείλεται σε κάποιου είδους μεταλλάξη, (πιο συχνά αντικατάσταση βάσης) [13, 15]. Το γονίδιο SMN1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q, προς το τελομερικό άκρο, περιοχή που χαρακτηρίζεται «γενετικά ασταθής» [16]. Σχεδόν πανομοιότυπα αντίγραφα του βρίσκονται στο κεντρομερικό άκρο του χρωμοσώματος και ονομάστηκαν SMN2. Η απώλεια μόνο του γονιδίου SMN2 δεν οδηγεί σε παθολογικό φαινότυπο και υπολογίζεται ότι περίπου στο 5% του υγιούς πληθυσμού και τα δύο αντίγραφα του SMN2 λείπουν [14, 17]. Τα δύο γονίδια διαφέρουν κατά πέντε νουκλεοτίδια, μόνο ένα εκ των οποίων βρίσκεται σε κωδική περιοχή, συγκεκριμένα στη θέση +6 του 7^{ου} εξονίου όπου παρατηρείται Θυμιδίνη στο SMN2 αντί της Κυτοσίνης του SMN1 (SMN2: ex7+6, C-to-T transition) [18-20]. Αν και από τη αλληλαγή προκύπτει το ίδιο αμινοξύ στη μετάφραση (silent mutation), η SMN2 οδηγείται σε διαφορετικό μάτισμα του προϊόντος (alternative splicing) αποκλείοντας το εξόνιο 7 στο 90% των πρωτεϊνών που παράγονται [20, 21]. Οι λόγοι που η αντικατάσταση αυτή οδηγεί σε αποκλεισμό του 7^{ου} εξονίου μελετώνται διαρκώς και έχουν αναγνωριστεί ενισχυτές ματίσματος του εξονίου (Exon Splicing Enhancers, ESE) αλλά και αποκλειστές ματίσματος του εξονίου (Exon Splicing Silencers, ESS), που ενδεχομένως να αποτελέσουν στόχο θεραπευτικών αγωγών [22, 23]. Η τελική πρωτεΐνη, SMNΔ7, φείδεται των τελευταίων 17 αμινοξέων του εξονίου 7 και εμπεριέχει επιπλέον 4 αμινοξέα του εξονίου 8 (που φυσιολογικά στην SMN1 υφίσταται μάτισμα). Εξαιτίας αυτού είναι ασταθής, έχει μικρότερο χρόνο ημιζωής και έχει μειωμένη λειτουργικότητα [24, 25]. Πάρα το γεγονός ότι η SMNΔ7 δεν μπορεί να υποκαταστήσει αποτελεσματικά την λειτουργία της SMN, έχει συσχετισθεί ότι η ύπαρξη περισσότερων αντιγράφων SMN2 αντιστοιχεί σε καλύτερη κλινική εικόνα του ασθενή [8, 16] χωρίς ωστόσο η σχέση γονότυπος-φαινότυπος να είναι απόλυτα γραμμική, καθώς υπάρχουν και άλλοι γενωμικοί συντελεστές του φαινοτύπου [26-31].

Η ακριβής συσχέτιση της ανεπάρκειας της SMN και της απώλειας συγκεκριμένα των κινητικών νευρώνων δεν είναι σαφής. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει ότι η SMN μέσω της συναρμολόγησης των snRNPs (τα οποία είναι απαραίτητα για το φυσιολογικό μάτισμα πολλών γονιδίων) είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη και

Πίνακας 1. Κλινικοί τύποι της Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας και τα χαρακτηριστικά τους

Τύπος	Ηλικία έναρξης	Ορόσημο κινητικής ανάπτυξης	Κινητική ικανότητα	Επιβίωση-Θάνατος
0	Πριν την γέννηση	Κανένα	Έντονη μυϊκή αδυναμία	Λίγες εβδομάδες
I Werdnig-Hoffman	2 εβδομάδων (Ia) 3 μηνών (Ib) 6 μηνών (Ic)	Κανένα	Έντονη μυϊκή αδυναμία	Εντός 2 ετών από έναρξη
II	6-18 μηνών	Κάθισμα χωρίς στήριξη	Αδυναμία κεντρομελική	Εφηβεία-Νεαρή ενήλικο ζωή
III Kugelberg-Welander	<3 ετών (IIIa) 3-12 ετών (IIIb) >12 ετών (IIIc)	Βάδιση	Ίσως απώλεια περιπατητικής ικανότητας	Φυσιολογικό προσδόκιμο
IV	>30 ετών	Φυσιολογικό	Ήπια κινητική διαταραχή	Φυσιολογικό προσδόκιμο

την επιβίωση των κινητικών νευρώνων. Πιο συγκεκριμένα, είναι απαραίτητη για την συναπτογένεση και την διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας της νευρομυϊκής συνάψεως, καθώς πιθανόν συμμετέχει στο μάτισμα των γονιδίων των πρωτεϊνών αυτών των διεργασιών [32-36]. Επίσης, άλλοι νευροειδικοί ρόλοι της SMN είναι η δόμηση του νευρωνικού κυτταροσκελετού, η συμμετοχή στην επιλογή και την μεταφορά mRNAs προς το αξονικό άκρο, και φυσικά όλες οι διεργασίες που επιτελεί και στα υπόλοιπα σωματικά κύτταρα (βλέπε παραπάνω) [35-42]. Επίσης υπάρχει ασάφεια για τα ακριβή μοριακά γεγονότα που οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων του νωτιαίου μυελού ή του μυός, αλλά οι ενδείξεις ότι εμπλέκεται η απόπτωση είναι ισχυρές [43-46].

Θεραπευτική και νέα δεδομένα της

Έως προσφάτως η διαχείριση των ασθενών με Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία ήταν κυρίως υποστηρικτική (της βάδισης-μετακίνησης, της θρέψης, της αναπνοής και της ψυχολογίας) [47-49]. Ο συνεχώς διευρυνόμενος ορίζοντας στην μοριακή βιολογία και στην παθογένεια της νόσου έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διάφορων θεωριών για την πιθανή θεραπεία της και στην ανακάλυψη κάποιων δυνητικά θεραπευτικών ουσιών [50, 51]. Στους πιθανούς στόχους περιλαμβάνονται η προαγωγή του γονιδίου SMN2 ώστε να υποκαταστήσει την λειτουργία του απωλεσθέντος SMN1 και η επανεισαγωγή λειτουργικού γονιδίου SMN1 με γονιδιακό ανασυνδυασμό [52]. Πιο ελκυστική αποτέλεσε η πρώτη προσέγγιση [53], η οποία παρότρυνε την έρευνα για ενσωμάτωση του 7^{ου} εξονίου στο mRNA του SMN2 [54-58], για ρύθμιση «προς τα πάνω» (up-regulation) του SMN2 γονιδίου [59, 60], για συντονισμό της μετάφρασης του SMN2 mRNA [61] και για αποτροπή της αποδόμησης της SMN πρωτεΐνης [62, 63]. Επιπλέον, αναζητήθηκαν μη-SMN τρόποι για σταθεροποίηση της

κλινικής εικόνας όπως η προστασία και η πρόληψη της απώλειας των πάσχοντων ιστών και η συμπτωματική βελτίωση της απάντησης των προσβεβλημένων μυών στο νευρικό ερέθισμα [64-68].

Σε εκτεταμένη έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2006 από τους Singh NK και συν. [69] βρέθηκε ότι, στο διαφορετικό μάτισμα που υπόκειται το SMN2 pre-mRNA, συμμετέχει ένα ανασταλτατικό του ματίσματος στοιχείο που βρίσκεται αμέσως μετά το 5^ο σημείο ματίσματος στο ιντρόνιο 7 (Intronic Splicing Silencer, ISS) και το οποίο δρα συνεργικά με άλλους παράγοντες για τον έλεγχο του ματίσματος του εξονίου 7. Το στοιχείο αυτό ονομάστηκε ISS-N1 και φαίνεται να αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα της διαδικασίας απώλειας του εξονίου 7 στην SMNΔ7 πρωτεΐνη. Η αλληλαγία C-to-T στο εξόνιο 7 δημιουργεί θέση σύνδεσης για τον αναστολέα του ματίσματος hnRNP-A1, το οποίο υποβοηθείται από το ISS- N1. Στην ίδια μελέτη, αποδείχθηκε ότι με στερεοχημική παρεμπόδιση του ISS-N1, η παράληψη του 7^{ου} εξονίου δεν επισυμβαίνει και η πρωτεΐνη που προκύπτει έχει την πλήρη λειτουργική δομή της. Ο «blocker» αυτός αποτελεί αντινοσηματικό ολιγονουκλεοτίδιο τύπου γενετικού υλικού (Antisense Oligonucleotide, ASO) και έτσι προέκυψε η ουσία *Nusinersen* (SPINRAZA). Η ανακάλυψη της έδωσε το έναυσμα για να αναζωοπυρωθούν οι ελπίδες των ασθενών και των οικογενειών τους, καθώς αποτέλεσε την πρώτη ουσία εγκεκριμένη από τον FDA (2016) [70] και τον EMA (2017) [71] για την θεραπεία της Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας.

Για να επιτευχθεί αυτό χρειάστηκε εντατική ερευνητική προσπάθεια. Ένα πρώτο βήμα έγινε από τους Haché και συν. οι οποίοι το 2016 δημοσίευσαν την πρώτη μελέτη σε ανθρώπους για το Nusinersen [72]. Η φάσης 1, ανοιχτή μελέτη εστίασε στην ανοχή, την ασφάλεια και την φαρμακοκινητική μόνης ενδοθητικής δόσης, σε 28 παιδιά με SMA τύπου II ή III, και συνολικά έγιναν 73 οσφυονωτιαίες παρακεντήσεις

(συμπεριλαμβάνονται και αυτές για τον έλεγχο του ENY). Η ανοχή ήταν καλή, με μοναδικές ανεπιθύμητες δράσεις εκείνες της οσφυονωτιαίας παρακέντησης (π.χ. κεφαλαλγία, ραχιαλγία) στις 23 από αυτές.

Την ίδια χρονιά οι Finkel και συν. ανακοίνωσαν τα αποτελέσματα της δικιάς τους μελέτης [73]. Στην φάσης 2, ανοιχτή μελέτη τους για την ανοχή, ασφάλεια, φαρμακοκινητική αλληλία και αποτελεσματικότητα πολλαπλών ενδοθηκικών δόσεων του Nusinersen, με εξατομικευμένη δοσολογία με βάση τον αναμενόμενο για το φύλο και την ηλικία όγκο του ENY, σε 20 βρέφη με SMA I, η ανταπόκριση υπήρξε ικανοποιητική. Για άλλη μια φορά απεδείχθη η ασφάλεια της μεθόδου (πολύ λίγες σοβαρές ανεπιθύμητες) και για πρώτη φορά με την εν λόγω θεραπευτική ουσία σημειώθηκε βελτίωση της κινητικής ωρίμανσης ασθενών με SMA (16 στους 20). Επίσης καθιερώθηκε το προτεινόμενο δοσολογικό σχήμα: 4 δόσεις φόρτισης τους πρώτους 2 μήνες και 1 δόση συντήρησης ανά 4 μήνες, υποθετικά για το υπόλοιπο της ζωής.

Το 2017 πάλι οι Finkel και συν. δημοσίευσαν τα αποτελέσματα της έρευνας τους (ENDEAR) σε βρέφη με SMA I (infantile-onset) [74]. Η μελέτη ήταν φάσης 3, τυχαιοποιημένη, διπλή τυφλή, με ενδοθηκική χορήγηση του Nusinersen έναντι placebo, σε πάνω από 100 βρέφη. Τα κριτήρια επιλεξιμότητας ήταν βρέφη κάτω των 7 μηνών, που εμφάνισαν συμπτώματα συμβατά με SMA σε ηλικία κάτω των 6 μηνών και στον γονιδιακό έλεγχο βρέθηκε ομόζυγη απώλεια του SMN1 και 2 αλληλίες του SMN2. Χορηγήθηκε η καθιερωμένη δοσολογία για ένα έτος. Για την αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης κινητικής ανάπτυξης HINE (Hammersmith Infant Neurological Examination), ως πρωταρχικός παρεμβατικός στόχος, καθώς και τα κριτήρια CHOP-INTEND, το διάστημα event free survival (δηλαδή επιβίωση χωρίς υποστήριξη της αναπνοής ή της θρέψης), τη συνολική επιβίωση και τα CMAP ηλεκτρομυογραφικά ευρήματα, ως δευτερογενείς στόχους. Περίπου το 41% των βρεφών που έλαβαν το φάρμακο ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία όσον αφορά τα κινητικά ορόσημα, ενώ από αυτά με το εικονικό φάρμακο κανένα δεν το έκανε (0%). Η διαφορά κρίθηκε τόσο σημαντική ώστε να τερματιστεί πρόωρα η μελέτη και να χορηγηθεί στα παιδιά της «ομάδας placebo» το Nusinersen. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση της πιθανότητας του event free survival διαστήματος των παιδιών υπό Nusinersen, που μαζί με την βελτίωση του CHOP-INTEND score και των CMAP ευρημάτων, ενίσχυσαν την υπόθεση της αποτελεσματικότητας στην νευρομυϊκή λειτουργία.

Μια άλλη μελέτη με εν γένει θετικά αποτελέσματα για την χρήση της ουσίας ήταν η CHERISH από Mercuri και συν. δημοσιευμένη το 2018 [75]. Εδώ μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της ουσίας σε άτομα με SMA II και III (late-onset). Στην μελέτη φάσης 3, double-blind, συμμετείχαν 126 άτομα. Ο χωρισμός έγινε σε δύο ομάδες, μια με ενδοθηκική χορήγηση

Nusinersen και μια με χορήγηση placebo. Και εδώ όσοι έλαβαν την ουσία βελτίωσαν τις κινητικές επιδόσεις, με βάση την κλίμακα HFSME (Hammersmith Functional Motor Scale Expanded), από τα βασικά τους χαρακτηριστικά μετά από 15 μήνες θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα τα άτομα της πρώτης ομάδας είχαν βελτίωση κατά +4.0 πόντους μ.ο., ενώ αυτά της δεύτερης είχαν επιδείνωση κατά -1.9 πόντους μ.ο., και κρίθηκε κατάλληλο να τερμαστεί έγκαιρα η μελέτη και να χορηγηθεί το φάρμακο και στα παιδιά της δεύτερης ομάδας. Όσον αφορά την ανοχή-ασφάλεια, και οι 2 ομάδες παρουσίασαν παρόμοια επίπτωση ανεπιθύμητων ενεργειών, οφειλόμενες στην ενδοθηκική χορήγηση του φαρμάκου. Οι συμμετέχοντες στις 2 τελευταίες μελέτες συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη SHINE για την αξιολόγηση της μακροπρόθεσμης έκβασης της χορήγησης Nusinersen, όπου τα πρώιμα συμπεράσματα είναι ικανοποιητικά [76].

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε άρθρο των Darras και συν. (2019), οι οποίοι έτρεξαν μελέτη σε μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά με SMA II και III (έως 15 ετών), στα οποία χορηγήθηκε το Nusinersen για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και ήταν υπό παρακολούθηση για ευρύτερη χρονική περίοδο (3 χρόνια σύνολο), συγκριτικά με τις προηγούμενες μελέτες [77]. Τρία πολύ σημαντικά συμπεράσματα ελήφθησαν: α) διεύρυνση του ηλικιακού ορίου όπου χορηγούμενο το Nusinersen επιδρά θετικά στην νοσηρότητα, β) παράταση του θεραπευτικού διαστήματος όπου παρατηρείται ανοχή αλληλία και αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, και γ) όχι απλά παρεμπόδιση της νευρομυϊκής εκφύλισης αλλά βελτίωση της κινητικής λειτουργίας έως και ανατροπή της απώλειας της. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο φυσικές (HFMSE, ULM και 6MWT) όσο και εργαστηριακές (EMG, CMAP και MUNE) κλίμακες για την αξιολόγηση, και παρόλο που οι εργαστηριακές δεν έδειξαν μεγάλη διαφορά, οι φυσικές παρουσίασαν βελτίωση η οποία χαρακτηρίστηκε κλινικά σημαντική (ιδίως για τον τύπο II).

Η τρέχουσα μελέτη ονόματι NURTURE, όπου χορηγήθηκε Nusinersen σε βρέφη προσυμπτωματικά, έπειτα από screening για το δυσλειτουργικό γονίδιο, είχε επίσης ενθαρρυντικά πρώτα αποτελέσματα [78, 79]. Αποδείχθηκε η ασφάλεια-ανοχή στην χορήγησή της και η επιβίωση των συμμετεχόντων ήταν πιο έκδηλη συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες. Αναμένονται από την επιστημονική κοινότητα με ανυπομονησία τα τελικά συμπεράσματά της.

Προκύπτουν όμως προβληματισμοί, ηθικής φύσεως κυρίως, στην θεραπεία με την εν λόγω ουσία [80]. Το πρώτο και κυριότερο είναι το πολύ υψηλό κόστος, το οποίο οφείλεται, πέραν της πολυετής έρευνας της, και στο «μονοπώλιο» που κατείχε το SPINRAZA στην θεραπεία της SMA ως το μοναδικό εγκεκριμένο φάρμακο μέχρι πρόσφατα (βλέπε παρακάτω). Δημιουργείται, επομένως, ζήτημα στην δίκαιη και ισότιμη διανομή της φαρμακευτικής περίθαλψης των ασθενών

με SMA. Άλλο θέμα είναι το κατά πόσο πράγματι υπάρχει αποτελεσματικότητα της χορήγησης της. Διότι, στην μελέτη των Finkel και συν. το 2017, ενώ όλοι οι υποβλήοντες στην θεραπεία ασθενείς εμφάνισαν μετρήσιμη βελτίωση των κινητικών λειτουργιών, λιγότερο από τα 2/3 παρουσίασαν κάποια βελτίωση της κλινικής τους εικόνας [74]. Η μελέτη των Darras και συν. επίσης διαθέτει περιορισμούς, όσων αφορά το μικρό μέγεθος του δείγματος ασθενών και την μέτρια αξιοπιστία των κλιμάκων (γενικά των τρόπων αξιολόγησης των ασθενών με SMA), και έτσι δεν μπορεί να μας δώσει σαφή εικόνα για την πραγματική αξία της θεραπείας με Nusinersen [77]. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε, αναμένονται ακόμα αποτελέσματα για τα μακροπρόθεσμα οφέλη ή επιπτώσεις της χρήσης του Nusinersen (NURTURE) [79]. Εξαιτίας αυτών υπάρχει και το πρόβλημα της απουσίας πλήρους ενημέρωσης και συναίνεσης των ασθενών-οικογενειών τους. Τέλος, η δυνατότητα χορήγησης θεραπείας δεν κατέχεται από πολλή νοσοκομεία και έτσι δυσχεραίνει η παροχή της σε ασθενείς που δεν διαμένουν σε μεγαλουπόλεις.

Πέραν του Nusinersen έχουν αναπτυχθεί και διάφορες άλλες δυντικές στρατηγικές αντιμετώπισης της SMA. Το RG7800 είναι ένα μικρό μόριο που τροποποιεί το μάτισμα του mRNA του SMN2 (διορθώνοντας τα επίπεδα της SMN) και χορηγείται *per os*, δρώντας έτσι πιο συστηματικά [81]. Η μελέτη MOONFISH το 2014 απέδειξε ότι αυξάνει δοσοεξαρτώμενα τα επίπεδα της πρωτεΐνης και στον άνθρωπο, μακροπρόθεσμα όμως παρατηρήθηκε οφθαλμοτοξικότητα και διεκόπησαν οι δοκιμές της [82]. Ένα παρόμοιο μόριο, το RG7916-*Risdiplam*, σε SMA ποντικούς και σε υγιείς εθελοντές ανθρώπους, αυξάνει τα επίπεδα του mRNA του SMN2 γονιδίου ανάλογα με την χορηγούμενη δοσολογία [58, 83]. Την στιγμή που γράφεται το άρθρο υπάρχουν σε ενεργό φάση 3 κλινικές μελέτες φάσης 2 για την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του φαρμάκου (SUNFISH [84], FIREFISH [85] και JEWELFISH [86]). Επίσης το LM1070 βασίστηκε στην ίδια λογική. Στα προκλινικά μοντέλα η απάντηση των SMA ποντικών ήταν ενθαρρυντική, αλλά εξαιτίας τοξικών αντιδράσεων στους ασθενείς όπου δόθηκε πειραματικά, τερματίστηκε η περαιτέρω έρευνα για την χορήγησή της και απλά γίνεται παρακολούθηση αυτών των ατόμων [87].

Μία εναλλακτική θεραπευτική στόχευση είναι η γονιδιακή υποκατάσταση μέσω γενετικά τροποποιημένου ιού, του scAAV9 (self-complementary adeno-associated vector 9) ή αλλιώς *onasemnogene abeparvovec/AVXS-101*, γνωστό τώρα ως ZOLGENSMA [88, 89]. Η λογική πίσω από αυτή την θεραπεία είναι πιο άμεση και αποσκοπεί στην ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ασθενούς ενός λειτουργικού γονιδίου SMN1 με μονή ενδοφλέβια δόση. Σε SMA-ποντικούς των Foust και συν. το 2010, η παραγωγή πλήρους πρωτεΐνης SMN στα κύτταρα των προσθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού αποκαταστάθηκε και παρατηρήθηκε επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης από 2

βδομάδες σε 250 ημέρες [90]. Οι Dominguez και συν. το 2011, πρόσθεσαν στον ιό, εκτός από το SMN1 γονίδιο, και ενισχυτικές αλληλουχίες της έκφρασης. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα, με χαμηλότερο ιικό φορτίο, να πετύχουν την ίδια περίπου παράταση της επιβίωσης (μ.ο. 199 ημέρες) αλλά και αυξημένα επίπεδα SMN πρωτεΐνης στα κύτταρα των ποντικών [91].

Κλινική δοκιμή πραγματοποιήθηκε από τους Mendell και συν. (START), κατά την οποία 15 βρέφη με SMA I, ηλικίας έως 9 μηνών, έλαβαν ενδοφλέβια δόση του φαρμάκου (τα 3 σε χαμηλή δόση και τα υπόλοιπα σε υψηλή) [92]. Η ανταπόκριση ήταν θεαματική ως προς την event free survival του ασθενούς (έως τους 20 μήνες μ.ο. χωρίς αναπνευστική υποστήριξη) και τα ορόσημα της κινητικής ανάπτυξης που επιτεύχθηκαν (ιδίως εκείνοι που έλαβαν υψηλότερη δόση, με μ.ο. καθίσματος χωρίς υποστήριξη πάνω από 30 δευτερόλεπτα, ενώ 2 παιδιά κατάφεραν να περπατήσουν και να βαθμολογηθούν με φυσιολογικό CHOP-INTEND score, και 11 να μιλήσουν φυσιολογικά). Οι Al-Zaidy και συν. [93] το 2018 δημοσίευσαν άρθρο, στο οποίο συνέχισαν την παρακολούθηση 12 εκ των ασθενών της κλινικής δοκιμής αυτής. Πιο συγκεκριμένα, για 2 έτη μετά την χορήγηση του ιικού φορέα οι ασθενείς εκτιμήθηκαν τακτικά για αναπνευστικές παρεμβάσεις, διατροφικές παρεμβάσεις και νοσηρότητες-νοσηλίες, μεταξύ άλλων. Από τους 9 που ξεκίνησαν την παρακολούθηση χωρίς να έχουν την ανάγκη για μη επεμβατικό μηχανικό αερισμό, οι 7 κατάφεραν μετά τα 2 έτη να διατηρηθούν ανεξάρτητοι. Έξι από τα 7 παιδιά που στην έναρξη της μελέτης είχαν ικανότητα λήψης τροφής από το στόματος και δεν είχαν ανάγκη για επιπλέον υποστήριξη της σίτισης, κατάφεραν να παραμείνουν έτσι μέχρι το τέλος της παρακολούθησης. Και τέλος, 10/12 παιδιά νοσηλεύθηκαν για <10% συνολικά του διετούς χρονικού διαστήματος της παρακολούθησης και κανείς (0/12) ≥20%, συγκρινόμενο με τα παιδιά που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη ENDEAR [74] του Nusinersen (όπου 41% νοσηλεύθηκε <10% και 37% ≥20% κατά την διάρκεια της μελέτης).

Την φετινή χρονιά, παρουσιάστηκε η συνέχεια των αποτελεσμάτων της προαναφερθείσας έρευνας START [94]. Οι 15 ασθενείς παραμένουν εν ζωή και 11 αξιολογήθηκαν με CHOP-INTEND score >40 για 19 μήνες περίπου κατά μέσο όρο. Η μοναδική ανεπιθύμητη ενέργεια του ιικού φορέα που έχει αναδειχθεί έως τώρα φαίνεται να ήταν η παροδική ασυμπτωματική αύξηση των ηπατικών ενζύμων, η οποία διορθώθηκε μετά από χορήγηση κορτιζόνης. Επιπλέον τον Μάρτιο, ανακοινώθηκαν κάποια αρχικά συμπεράσματα από κλινικές δοκιμές φάσης 3 (STRIVE και SPR1NT), τα οποία συμβαδίζουν με τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της START δοκιμής, ως προς την ανοχή και αποτελεσματικότητα του ZOLGENSMA [95]. Με αυτά τα δεδομένα, και ενώ αναμένεται να ολοκληρωθούν και να δημοσιευτούν οι μελέτες STRIVE [96] και SPR1NT [97] για τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα

και να γίνουν μελέτες σε μεγαλύτερους πληθυσμούς ασθενών, τον Μάιο του 2019 ο scAAV9 έλαβε έγκριση από τον FDA [98] και αποτελεί πλέον το δεύτερο επίσημο φάρμακο για την θεραπεία της SMA. Επομένως, το μονοπώλιο που κατείχε το Nusinersen έσπασε και οι συγκρίσεις μεταξύ των 2 φαρμάκων, ως προς την ασφάλεια, ανοχή, αποτελεσματικότητα, ευκολία χορήγησης της θεραπείας, κόστος (επίσης πολύ υψηλό για το sc-AAV9) και άλλα διλήμματα, αποκτούν πλέον κλινική αξία [52, 89, 99].

Παράλληλα δοκιμάστηκαν διάφοροι νευροπροστατευτικοί παράγοντες με σημαντικότερο την *Olesoxime-tro19622*. Η ουσία αυτή παρεμβαίνει στην διαδικασία της απόπτωσης, δρώντας προστατευτικά στην διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και επιβραδύνοντας την νευροεκφύλιση [100]. Σε κλινική δοκιμή, διπλή τυφλή, με placebo, φάσης 2, ασθενείς με SMA II και III μη περιπατητικοί έδειξαν καλή ανοχή και διατήρηση της κινητικής λειτουργίας [101]. Πιο μακροπρόθεσμα συμπεράσματα θα αντληθούν από τρέχουσα κατά την στιγμή συγγραφής του άρθρου μελέτη [102].

Άλλη ενδιαφέρουσα προσέγγιση που ερευνάται είναι το *CK2127107-Tirasemtiv* [103]. Ενεργοποιώντας το σύμπλεγμα τροπονίνης ώστε να απελευθερώνει με βραδύτερο ρυθμό τα μόρια του ασβεστίου (Ca^{2+}), το φάρμακο αυτό ευαισθητοποιεί το σαρκομερίδιο για να συσπασθεί εντονότερα [104]. Η αποτελεσματικότητα σε SMA ποντικούς και η ασφάλεια σε υγιή άτομα έχει αποδειχθεί, και αναμένεται να ανακοινωθούν τα αποτελέσματα κλινικής δοκιμής φάσης 2 σε SMA II, III και IV εντός του έτους [105].

Αναλογιζόμενοι όλα αυτά τίθενται δύο μεγάλα ερωτήματα. Το πρώτο, ποια είναι η ιδανική φάση της νόσου για τη χορήγηση της θεραπείας; Το 2010 οι Foust και συν. [90] έδειξαν ότι η θεραπεία με scAAV9 σε SMA-ποντικούς έχει την μέγιστη αποτελεσματικότητα εάν χορηγηθεί εντός των τριών πρώτων ημερών ζωής (p0-p3) ενώ αν χορηγηθεί αργότερα η ανταπόκριση και η επιβίωση είναι λιγότερο θεαματικές έως και μηδαμινές, δηλαδή παρόμοια με μη-χορήγηση της (μετά την δέκατη ημέρα, p10). Έτσι φαίνεται ότι υπάρχει ένα στενό θεραπευτικό παράθυρο. Φυσικά η απαντητικότητα στον άνθρωπο δεν μπορεί να προβλεφθεί με βάση την απαντητικότητα στους ποντικούς, αλλά είναι γενικώς αποδεκτό ότι η έγκαιρη, πριν ή νωρίς κατά την έναρξη των συμπτωμάτων, χορήγηση γονιδιακής θεραπείας φέρει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Τι γίνεται όμως με τους ενήλικες ασθενείς με SMA III ή IV; Θα πρέπει να χορηγείται σε αυτούς θεραπεία; Σαφή απάντηση δεν έχει ακόμα δοθεί, αν και υποστηρίζεται ότι η θεραπεία θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική σε SMA-ποντικούς με SMA IV (Feng και συν. 2016) [106].

Το δεύτερο ερώτημα που τίθεται είναι αυτό του προσυμπτωματικού ελέγχου για την νόσο (screening) [107]. Επειδή, όπως φαίνεται, είναι σημαντική η πρώ-

ιμη θεραπευτική αντιμετώπιση, υποστηρίζεται η διαδικασία του screening σε πιθανώς νοσούντα νεογνά [108]. Οι φορείς γονείς είναι ασυμπτωματικοί και τα παιδιά τους εμφανίζουν συμπτώματα όταν η νευροεκφύλιση έχει προχωρήσει, γεγονότα που δυσκολεύουν την προσέγγιση. Νεογνικός γονιδιωματικός έλεγχος θα μπορούσε να ξεπεράσει αυτό το εμπόδιο, αλλά λόγω των ακόμα άλυτων προβλημάτων των θεραπευτικών μεθόδων, η τακτική δεν έχει καθιερωθεί [109-112]. Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν εφαρμοσιμότητα μιας τέτοιας τακτικής (Pyatt and Prior 2006) [113] αλλά ακόμα υπάρχουν θέματα προς επίλυση.

Συμπέρασμα

Τα τελευταία έτη στην θεραπευτική της Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας αποτέλεσαν τα πιο ενδιαφέροντα και ελπιδοφόρα για την ιστορία της νόσου, σε βαθμό που η αλληλεπιδράση της ως θανατηφόρο να έχει αλλάξει και σήμερα να παρουσιάζει σημεία ίασιμης ασθένειας. Την τελευταία δεκαετία, η κατανόηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της νόσου με την αποκάλυψη της ζωτικής σημασίας που έχει η πρωτεΐνη Survival Motor Neuron (SMN) στον εκφυλισμό των κινητικών νευρώνων, έχει κατευθύνει την επιστημονική κοινότητα σε θεραπείες που εστιάζουν κατά κύριο λόγο στην προσπάθεια της επαναφοράς της έκφρασης του γονιδίου SMN1 ή στην τροποποίηση του γονιδίου SMN2. Κοινή συνισταμένη όλων των προσπαθειών ωστόσο φαίνεται να αποτελεί η ανάγκη για έγκαιρη διάγνωση της νόσου στο νεογνό και η ενημέρωση των φορέων της SMA πριν την σύλληψη. Η έγκριση του Nusinersen, ως το πρώτο φάρμακο για την αντιμετώπιση της SMA, και πιο πρόσφατα του scAAV9, ως το δεύτερο, αποτελούν τα πρώτα ουσιαστικά βήματα μιας πολυετούς ερευνητικής προσπάθειας, σε ένα μονοπάτι που αφορά 180.000-270.000 φορείς μόνο στην χώρα μας.

Βιβλιογραφία

1. Verhaart I.E.C., Robertson A., Wilson I.J., Aartsma-Rus A., Cameron S., Jones C.C. et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q – linked spinal muscular atrophy – a literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2017;12(1).
2. Tisdale S., Pellizzoni L. Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches in Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(23):8691-700.
3. Hamilton G., Gillingwater T.H. Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. *Trends in Molecular Medicine*. 2013;19(1):40-50.
4. Simone C., Ramirez A., Bucchia M., Rinchetti P., Rideout H., Papadimitriou D. et al. Is spinal muscular atrophy a disease of the motor neurons only:

- pathogenesis and therapeutic implications? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;73(5):1003-20.
5. Nash L.A., Burns J.K., Chardon J.W., Kothary R., Parks R.J. Spinal Muscular Atrophy: More than a Disease of Motor Neurons? *Current Molecular Medicine*. 2016;16(9):779-92.
 6. Wijngaarde C.A., Blank A.C., Stam M., Wadman R.I., Berg L.H.V.D., Pol W.L.V.D. Cardiac pathology in spinal muscular atrophy: a systematic review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2017;12.
 7. Arnold W.D., Kassar D., Kissel J.T. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle and Nerve* 2014;51:157-67.
 8. Wadman R.I., Stam M., Gijzen M., Lemmink H.H., Snoeck I.N., Wijngaarde C.A. et al. Association of motor milestones, SMN2 copy and outcome in spinal muscular atrophy types 0-4. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2017;88:365-7.
 9. Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S., Clermont O., Munnich A. et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics* 1997;16:265-9.
 10. Laird A.S., Mackovski N., Rinkwitz S., Becker T.S., Giacomotto J. Tissue-specific models of spinal muscular atrophy confirm a critical role of SMN in motor neurons from embryonic to adult stages. *Human Molecular Genetics* 2016;25:1728-38.
 11. Coovert D. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*. 1997;6(8):1205-14.
 12. Burghes A.H.M., Beattie C.E. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(8):597-609.
 13. Singh R.N., Howell M.D., Ottesen E.W., Singh N.N. Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2017;1860(3):299-315.
 14. Lefebvre S., Bürglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.
 15. Parsons D., McAndrew P., Iannaccone S., Mendell J., Burghes A., Prior T. Intragenic telSMN Mutations: Frequency, Distribution, Evidence of a Founder Effect, and Modification of the Spinal Muscular Atrophy Phenotype by cenSMN Copy Number. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;63(6):1712-23.
 16. Noguchi Y., Onishi A., Nakamachi Y., Hayashi N., Harahap N.I.F., Rochmah M.A. et al. Telomeric Region of the Spinal Muscular Atrophy Locus Is Susceptible to Structural Variations. *Pediatric Neurology*. 2016;58:83-9.
 17. Cogulu O., Durmaz B., Pehlivan S., Alpman A., Ozkinay F. Evaluation of the SMN and NAIP Genes in a Family: Homozygous Deletion of the SMN2 Gene in the Fetus and Outcome of the Pregnancy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2009;13(3):287-8.
 18. Bürglen L., Lefebvre S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Cruaud C. et al. Structure and Organization of the Human Survival Motor Neurone (SMN) Gene. *Genomics*. 1996;32(3):479-82.
 19. Lorson C.L., Hahnen E., Androphy E.J., Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(11):6307-11.
 20. Boda B., Mas C., Giudicelli C., Nepote V., Guimiot F., Levacher B. et al. Survival motor neuron SMN1 and SMN2 gene promoters: identical sequences and differential expression in neurons and non-neuronal cells. *European Journal of Human Genetics*. 2004;12(9):729-37.
 21. Lorson C.L. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA - determining gene SMN. *Human Molecular Genetics*. 2000;9(2):259-65.
 22. Odermatt P., Trüb J., Furrer L., Fricker R., Marti A., Schümperli D. Somatic Therapy of a Mouse SMA Model with a U7 snRNA Gene Correcting SMN2 Splicing. *Molecular Therapy*. 2016;24(10):1797-805.
 23. Singh R.N., Singh N.N. Mechanism of Splicing Regulation of Spinal Muscular Atrophy Genes. *Advances in Neurobiology RNA Metabolism in Neurodegenerative Diseases*. 2018;31-61.
 24. Lorson C.L., Strasswimmer J., Yao J.-M., Baleja J.D., Hahnen E., Wirth B. et al. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nature Genetics*. 1998;19(1):63-6.
 25. Le T.T., Coovert D.D., Monani U.R., Morris G.E., Burghes A.H.M. The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics*. 2000;3(1):7-16.
 26. Roy N., Mahadevan M.S., Mclean M., Shutter G., Yaraghi Z., Farahani R. et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*. 1995;80(1):167-78.
 27. Wirth B., Herz M., Wetter A., Moskau S., Hahnen E., Rudnik-Schöneborn S. et al. Quantitative Analysis of Survival Motor Neuron Copies: Identification of Subtle SMN1 Mutations in Patients with Spinal Muscular Atrophy, Genotype-Phenotype Correlation, and Implications for Genetic Counseling. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(5):1340-56.
 28. Harada Y., Sutomo R., Sadewa A.H., Akutsu T., Takeshima Y., Wada H. et al. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of

- spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *Journal of Neurology*. 2002;249(9):1211-9.
29. Prior T.W., Swoboda K.J., Scott H.D., Hejmanowski A.Q. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *American Journal of Medical Genetics*. 2004;130A(3):307-10.
 30. Wathiyati M.S., Fatemeh H., Marini M., Atif A.B., Zahiruddin W.M., Sasongko T.H. et al. Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy. *Brain and Development*. 2009;31(1):42-5.
 31. Calucho M., Bernal S., Alías .L, March F., Venceslá A., Rodríguez-Álvarez F.J. et al. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscular Disorders*. 2018;28(3):208-15.
 32. Liu Q., Fischer U., Wang F., Dreyfuss G. The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, SMN, and Its Associated Protein SIP1 Are in a Complex with Spliceosomal snRNP Proteins. *Cell*. 1997;90(6):1013-21.
 33. Coady T.H., Lorson C.L. SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2011;2(4):546-64.
 34. Martinez T.L., Kong L., Wang X., Osborne M.A., Crowder M.E., Meerbeke J.P.V. et al. Survival Motor Neuron Protein in Motor Neurons Determines Synaptic Integrity in Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(25):8703-15.
 35. Li D.K., Tisdale S., Lotti F., Pellizzoni L. SMN control of RNP assembly: From post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;32:22-9.
 36. Chaytow H., Huang Y.-T., Gillingwater T.H., Faller KME. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018;75(21):3877-94.
 37. Torres-Benito L., Neher M.F., Cano R., Ruiz R., Tabares L. SMN Requirement for Synaptic Vesicle, Active Zone and Microtubule Postnatal Organization in Motor Nerve Terminals. *PLoS ONE*. 2011;6(10).
 38. Dimitriadi M., Derdowski A., Kalloo G., Maginnis M.S., O'Hern P., Bliska B. et al. Decreased function of survival motor neuron protein impairs endocytic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(30).
 39. Fallini C., Donlin-Asp P.G., Rouanet J.P., Bassell G.J., Rossoll W. Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs mRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2016;36(13):3811-20.
 40. Singh R.N., Howell M.D., Ottesen E.W., Singh N.N. Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2017;1860(3):299-315.
 41. Hosseinibarkooie S., Schneider S., Wirth B. Advances in understanding the role of disease-associated proteins in spinal muscular atrophy. *Expert Review of Proteomics*. 2017;14(7):581-92.
 42. Thompson L.W., Morrison K.D., Shirran S.L., Groen E.J.N., Gillingwater T.H., Botting C.H. et al. Neurochondrin interacts with the SMN protein suggesting a novel mechanism for spinal muscular atrophy pathology. *Journal of Cell Science*. 2018;131(8).
 43. Garcera A., Bahi N., Periyakaruppi A., Arumugam S., Soler R.M. Survival motor neuron protein reduction deregulates autophagy in spinal cord motoneurons in vitro. *Cell Death and Disease*. 2013;4(6).
 44. Ahmad S., Bhatia K., Kannan A., Gangwani L. Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Experimental Neuroscience*. 2016;10.
 45. Simon C.M., Dai Y., Alstyne M.V., Koutsoumpa C., Pagiazitis J.G., Chalif J.I. et al. Converging Mechanisms of p53 Activation Drive Motor Neuron Degeneration in Spinal Muscular Atrophy. *Cell Reports*. 2017;21(13):3767-80.
 46. Alstyne M.V., Simon C.M., Sardi S.P., Shihabuddin L.S., Mentis G.Z., Pellizzoni L. Dysregulation of Mdm2 and Mdm4 alternative splicing underlies motor neuron death in spinal muscular atrophy. *Genes and Development*. 2018;32(15-16):1045-59.
 47. Wang C.H., Finkel R.S., Bertini E.S., Schroth M., Simonds A., Wong B. et al. Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Child Neurology*. 2007;22(8):1027-49.
 48. Arnold W.D., Kassar D., Kissel J.T. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle and Nerve*. 2014;51(2):157-67.
 49. Farrar M.A., Park S.B., Vucic S., Carey K.A., Turner B.J., Gillingwater T.H. et al. Emerging therapies and challenges in spinal muscular atrophy. *Annals of Neurology*. 2017;81(3):355-68.
 50. Lunn M.R., Wang C.H. Spinal muscular atrophy. *The Lancet*. 2008;371(9630):2120-33.
 51. Bharucha-Goebel D., Kaufmann P. Treatment Advances in Spinal Muscular Atrophy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2017;17(11).
 52. Kim J.-K., Monani U.R. Augmenting the SMN Protein to Treat Infantile Spinal Muscular Atrophy. *Neuron*. 2018;97(5):1001-3.
 53. Naryshkin N.A., Weetall M., Dakka A., Narasimhan J., Zhao X., Feng Z. et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity

- in mice with spinal muscular atrophy. *Science*. 2014;345(6197):688-93.
54. Hua Y., Sahashi K., Hung G., Rigo F., Passini M.A., Bennett C.F. et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes and Development*. 2010;24(15):1634-44.
 55. Odermatt P., Trüb J., Furrer L., Fricker R., Marti A., Schümperli D. Somatic Therapy of a Mouse SMA Model with a U7 snRNA Gene Correcting SMN2 Splicing. *Molecular Therapy*. 2016;24(10):1797-805.
 56. Son H.-W., Yokota T. Recent Advances and Clinical Applications of Exon Inclusion for Spinal Muscular Atrophy. *Methods in Molecular Biology Exon Skipping and Inclusion Therapies*. 2018;57-68.
 57. Cheung A.K., Hurley B., Kerrigan R., Shu L., Chin D.N., Shen Y. et al. Discovery of Small Molecule Splicing Modulators of Survival Motor Neuron-2 (SMN2) for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;61(24):11021-36.
 58. Poirier A., Weetall M., Heinig K., Bucheli F., Schoenlein K., Alsenz J. et al. Risdiplam distributes and increases SMN protein in both the central nervous system and peripheral organs. *Pharmacology Research and Perspectives*. 2018;6(6).
 59. Mack S.G., Cook D.J., Dhurjati P., Butchbach M.E.R. Systems Biology Investigation of cAMP Modulation to Increase SMN Levels for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *PLoS ONE*. 2014;9(12).
 60. Woo C.J., Maier V.K., Davey R., Brennan J., Li G., Brothers J. et al. Gene activation of SMN by selective disruption of lncRNA-mediated recruitment of PRC2 for the treatment of spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(8).
 61. Cherry J.J., Didonato C.J., Androphy E.J., Calo A., Potter K., Custer S.K. et al. In vitro and in vivo effects of 2,4 diaminoquinazoline inhibitors of the decapping scavenger enzyme DcpS: Context-specific modulation of SMN transcript levels. *Plos One*. 2017;12(9).
 62. Rietz A., Li H., Quist K.M., Cherry J.J., Lorson C.L., Burnett B.G. et al. Discovery of a Small Molecule Probe That Post-Translationally Stabilizes the Survival Motor Neuron Protein for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(11):4594-610.
 63. Wang Y., Xu C., Ma L., Mou Y., Zhang B., Zhou S. et al. Drug screening with human SMN2 reporter identifies SMN protein stabilizers to correct SMA pathology. *Life Science Alliance*. 2019;2(2).
 64. Bowerman M., Murray L.M., Boyer J.G., Anderson C.L., Kothary R. Fasudil improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy. *BMC Medicine*. 2012;10(1).
 65. Wishart T.M., Mutsaers C.A., Riessland M., Reimer M.M., Hunter G., Hannam M.L. et al. Dysregulation of ubiquitin homeostasis and β -catenin signaling promote spinal muscular atrophy. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(4):1821-34.
 66. Boido M., Vercelli A. Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2016;10.
 67. Chali F., Desseille C., Houdebine L., Benoit E., Rouquet T., Bariohay B. et al. Long-term exercise-specific neuroprotection in spinal muscular atrophy-like mice. *The Journal of Physiology*. 2016;594(7):1931-52.
 68. Messina S. New Directions for SMA Therapy. *Journal of Clinical Medicine*. 2018;7(9):251.
 69. Singh N.K., Singh N.N., Androphy E.J., Singh R.N. Splicing of a Critical Exon of Human Survival Motor Neuron Is Regulated by a Unique Silencer Element Located in the Last Intron. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(4):1333-46.
 70. FDA approves first drug for spinal muscular atrophy [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. [cited 2019Mar12]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-spinal-muscular-atrophy>.
 71. Spinraza: authorised for use in the European Union [Internet]. European Medicines Agency. [cited 2019Mar12]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza>.
 72. Haché M., Swoboda K.J., Sethna N., Farrow-Gillespie A., Khandji A., Xia S. et al. Intrathecal Injections in Children With Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Child Neurology*. 2016;31(7):899-906.
 73. Finkel R.S., Chiriboga C.A., Vajsaar J., Day J.W., Montes J., Vivo D.C.D. et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet*. 2016;388(10063):3017-26.
 74. Finkel R.S., Mercuri E., Darras B.T., Connolly A.M., Kuntz N.L., Kirschner J. et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(18):1723-32.
 75. Mercuri E., Darras B.T., Chiriboga C.A., Day J.W., Campbell C., Connolly A.M. et al. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(7):625-35.
 76. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02594124>.
 77. Darras B.T., Chiriboga C.A., Iannaccone S.T., Swoboda K.J., Montes J., Mignon L. et al. Nusinersen in later-onset spinal muscular atrophy: Long-term

- results from the phase 1/2 studies. *Neurology*. 2019;92(21):e1-e15.
78. Bertini E., Hwu W.-L., Reyna S., Farwell W., Gheuens S., Sun P. et al. Efficacy and safety of nusinersen in infants with presymptomatic spinal muscular atrophy (SMA): Interim results from the NURTURE study. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2017;21.
 79. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02386553>.
 80. Burgart A.M., Magnus D., Tabor H.K., Paquette E.D.-T., Frader J., Glover J.J. et al. Ethical Challenges Confronted When Providing Nusinersen Treatment for Spinal Muscular Atrophy. *JAMA Pediatrics*. 2018;172(2):188.
 81. Ratni H., Karp G.M., Weetall M., Naryshkin N.A., Paushkin S.V., Chen K.S. et al. Specific Correction of Alternative Survival Motor Neuron 2 Splicing by Small Molecules: Discovery of a Potential Novel Medicine To Treat Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;59(13):6086-100.
 82. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02240355>
 83. Mercuri E., Kirschner J., Baranello G., Servais L., Goemans N., Pera M. et al. Clinical studies of RG7916 in patients with spinal muscular atrophy: SUNFISH part 1 study update. *Neuromuscular Disorders*. 2017;27.
 84. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02908685>.
 85. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02913482>.
 86. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03032172>.
 87. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02268552>.
 88. Valori C.F., Ning K., Wyles M., Mead R.J., Grierson A.J., Shaw P.J. et al. Systemic Delivery of scAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy. *Science Translational Medicine*. 2010;2(35).
 89. Dabbous O., Maru B., Jansen J.P., Lorenzi M., Cloutier M., Guérin A. et al. Survival, Motor Function, and Motor Milestones: Comparison of AVXS-101 Relative to Nusinersen for the Treatment of Infants with Spinal Muscular Atrophy Type 1. *Advances in Therapy*. 2019;36(5):1164-76.
 90. Foust K.D., Wang X., McGovern V.L., Braun L., Bevan A.K., Haidet A.M. et al. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nature Biotechnology*. 2010;28(3):271-4.
 91. Dominguez E., Marais T., Chatauret N., Benkhe-lifa-Ziyyat S., Duque S., Ravassard P. et al. Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Human Molecular Genetics*. 2010;20(4):681-93.
 92. Mendell J.R., Al-Zaidy S., Shell R., Arnold W.D., Rodino-Klapac L.R., Prior T.W. et al. Single-Dose Gene- Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(18):1713-22.
 93. Al-Zaidy S., Pickard A.S., Kotha K., Alfano L.N., Lowes L., Paul G. et al. Health outcomes in spinal muscular atrophy type 1 following AVXS-101 gene replacement therapy. *Pediatric Pulmonology*. 2018.
 94. Mendell J., Al-Zaidy S., Shell R., Arnold W., Rodino-Klapac L., Prior T. et al. AVXS-101 Phase 1 Gene- Replacement Therapy (GRT) Clinical Trial in Spinal Muscular Atrophy Type 1 (SMA1): 24-Month Event-Free Survival and Achievement of Developmental Milestones. Abstracts of the 47th Annual Meeting of the SENP (*Société Européenne De Neurologie Pédiatrique*), 2019.
 95. AveXis presented robust data at AAN demonstrating efficacy of Zolgensma® in broad spectrum of spinal muscular atrophy (SMA) patients [Internet]. Novartis. [cited 2019Jun2]. Available from: <https://www.novartis.com/news/media-releases/avexis-presented-robust-data-aan-demonstrating-efficacy-zolgensma-broad-spectrum-spinal-muscular-atrophy-sma-patients>.
 96. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03306277>.
 97. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03505099>.
 98. FDA approves innovative gene therapy to treat pediatric patients with spinal muscular atrophy, a rare disease and leading genetic cause of infant mortality [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. [cited 2019Jun2]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-rare-disease>.
 99. Malone D.C., Dean R., Arjunji R., Jensen I., Cyr P., Miller B. et al. Cost-effectiveness analysis of using onasemnogene abeparvocec (AVXS-101) in spinal muscular atrophy type 1 patients. *Journal of Market Access and Health Policy*. 2019;7(1):1601484.
 100. Sunyach C., Michaud M., Arnoux T., Bernard-Marissal N., Aebischer J., Latyszenok V. et al. Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model. *Neuropharmacology*. 2012;62(7):2346-53.
 101. Bertini E., Dessaud E., Mercuri E., Muntoni F., Kirschner J., Reid C. et al. Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Neurology*. 2017;16(7):513-22.
 102. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02628743>.
 103. Andrews J.A., Miller T.M., Vijayakumar V., Stoltz R., James J.K., Meng L. et al. CK-2127107 amplifies skeletal muscle response to nerve activation in humans. *Muscle and Nerve*. 2017;57(5):729-34.
 104. Collibee S.E., Bergnes G., Muci A., Browne W.F.,

- Garard M., Hinken A.C. et al. Discovery of Tirasemtiv, the First Direct Fast Skeletal Muscle Troponin Activator. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2018;9(4):354-8.
105. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02644668>.
106. Feng Z., Ling K.K., Zhao X., Zhou C., Karp G., Welch E.M. et al. Pharmacologically induced mouse model of adult spinal muscular atrophy to evaluate effectiveness of therapeutics after disease onset. *Human Molecular Genetics*. 2016;25(5):964-75.
107. Lin C.-W., Kalb S.J., Yeh W.-S. Delay in Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy: A Systematic Literature Review.
108. Chiriboga C.A. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2017;17(10):955-62.
109. Sugarman E.A., Nagan N., Zhu H., Akmaev V.R., Zhou Z., Rohlf E.M. et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *European Journal of Human Genetics*. 2011;20(1):27-32.
110. Burns J.K., Kothary R., Parks R.J. Opening the window: The case for carrier and perinatal screening for spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders*. 2016;26(9):551-9.
111. Chien Y.-H., Chiang S.-C., Weng W.-C., Lee N.-C., Lin C.-J., Hsieh W.-S. et al. Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Through Newborn Screening. *The Journal of Pediatrics*. 2017;190.
112. Feng Y., Ge X., Meng L., Scull J., Li J., Tian X. et al. The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: comprehensive pan-ethnic SMN1 copy-number and sequence variant analysis by massively parallel sequencing. *Genetics in Medicine*. 2017;19(8):936-44.
113. Pyatt R.E., Prior T.W. A feasibility study for the newborn screening of spinal muscular atrophy. *Genetics in Medicine*. 2006;8(7):428-37.