

# Genska terapija u neuromuskularnim bolestima

---

Jellin, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:615238>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-02-26**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Elena Jellin**

# **Genska terapija u neuromuskularnim bolestima**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za neuropedijatriju Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof. dr. sc. Nine Barišić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

## POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

AAV – engl. *adeno-associated virus*

AIMS – Alberta Infant Motor Scale

ALT – alanin-aminotransferaza

ASO – engl. *antisense oligonucleotide*

AST – aspartat-aminotransferaza

BMD – Beckerova mišićna distrofija

BSID-III – Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition

BUN – engl. *blood urea nitrogen*

CHOP INTEND – Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders

CHO – engl. *Chinese hamster ovary*

CMAP – engl. *compound muscle action potential*

CRIM – engl. *cross-reacting immunologic material*

DGC – engl. *dystrophin glycoprotein complex*

DM1 – miotonična distrofija tip 1

DMD – Duchenneova mišićna distrofija

DMPK – engl. *myotonic dystrophy protein kinase*

EMA – European Medicines Agency

ESE2 – engl. *exonic splicing enhancer 2*

FDA – U.S. Food and Drug Administration

FOXM1 – engl. *forkhead box M1*

FVC – engl. *forced vital capacity*

GAA – engl. *acid alpha-glucosidase*

GGT – gama-glutamiltransferaza

GSK3 – engl. *glycogen synthase kinase 3*

HFMS – Hammersmith Functional Motor Scale

HFMSSE – Hammersmith Functional Motor Scale-Expanded

HINE-2 – Hammersmith Infant Neurological Exam-Part 2

hnRNP – engl. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

ISS-N1 – engl. *intronic splicing silencer N1*

LGMD – engl. *limb girdle muscular dystrophy*

MADD – engl. *MAPK-activating death domain*

MAP – engl. *managed access program*

MCK – engl. *muscle creatine kinase*  
MFM-32 – Total Motor Function Measure 32  
mRNA – engl. *messenger RNA*  
MUNE – engl. *motor unit number estimation*  
NOS – engl. *nitric oxide synthase*  
OCT – engl. *optical coherence tomography*  
rAAV – engl. *recombinant AAV*  
rhGAA – engl. *recombinant human GAA*  
scAAV – engl. *self-complementary AAV*  
SMA – spinalna mišićna atrofija  
SMN – engl. *survival motor neuron*  
SMN1 – engl. *survival motor neuron 1*  
SMN2 – engl. *survival motor neuron 2*  
ssAAV – engl. *single-stranded AAV*  
tRNA – engl. *transfer RNA*  
ULM – Upper Limb Module  
ULN – engl. *upper limit of normal*  
vg/kg – vektorskog genoma po kilogramu  
XLMTM – X-vezana miotubularna miopatija  
5'ss – engl. *5' splice site*  
6MWT – 6-Minute Walk Test

# SADRŽAJ

## SAŽETAK

## SUMMARY

1. UVOD.....	1
2. SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA.....	2
2.1. NUSINERSEN.....	2
2.1.1. Mehanizam djelovanja.....	3
2.1.2. Klinička istraživanja.....	3
2.1.3. Sigurnost.....	5
2.1.4. Klinička primjena.....	6
2.2. ONASEMNOGEN ABEPARVOVEK.....	7
2.2.1. Mehanizam djelovanja.....	7
2.2.2. Klinička istraživanja.....	8
2.2.3. Sigurnost.....	10
2.2.4. Klinička primjena.....	11
2.3. RISDIPLAM.....	11
2.3.1. Mehanizam djelovanja.....	11
2.3.2. Klinička istraživanja.....	12
2.3.3. Sigurnost.....	13
2.3.4. Klinička primjena.....	13
3. DUCHENNEOVA MIŠIĆNA DISTROFIJA.....	14
3.1. ATALUREN.....	14
3.1.1. Mehanizam djelovanja.....	14
3.1.2. Klinička istraživanja.....	15
3.1.3. Sigurnost.....	16
3.1.4. Klinička primjena.....	17
3.2. ETEPLIRSEN.....	17
3.2.1. Mehanizam djelovanja.....	17
3.2.2. Klinička istraživanja.....	18
3.2.3. Sigurnost.....	19
3.2.4. Klinička primjena.....	19
4. POMPEOVA BOLEST.....	20
4.1. ALGLUKOZIDAZA ALFA.....	20
4.1.1. Mehanizam djelovanja.....	20

4.1.2.	Klinička istraživanja.....	21
4.1.3.	Sigurnost.....	23
4.1.4.	Klinička primjena.....	24
5.	GENSKA TERAPIJA OSTALIH NEUROMUSKULARNIH BOLESTI U FAZI KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA.....	25
6.	ZAKLJUČAK.....	27
7.	ZAHVALE.....	28
8.	LITERATURA.....	29
9.	ŽIVOTOPIS.....	43

## SAŽETAK

### Genska terapija u neuromuskularnim bolestima

Elena Jellin

Neuromuskularne bolesti su veoma heterogena skupina bolesti koje zahvaćaju donji motorni neuron, periferni živčani sustav, neuromuskularnu spojnicu te mišić. Neuromuskularni poremećaji su većinom genetski uvjetovani te je stoga primjena genske terapije u pedijatriji vrlo značajna. Postoji nekoliko odobrenih terapija za liječenje spinalne mišićne atrofije (SMA). Terapije poput nusinersena, protusmjernog oligonukleotida, i risdiplama, male molekule, mijenjanju mehanizam prekranja kako bi uključili egzon 7 u transkripte SMN2 (survival motor neuron 2) gena. Tako je dostupna povećana količina SMN (survival motor neuron) proteina i pacijenti pokazuju poboljšanu motoričku funkciju koja se ne očekuje u prirodnom tijeku bolesti. Onasemnogen abeparvovek je genska terapija s direktnom manipulacijom pacijentovog genoma. Funkcionalna kopija mutiranog gena se dostavlja putem virusnih vektora, adeno asociranih virusa (AAV). Bolesnici imaju poboljšanje motorike i razvoj novih motorički dostignuća, a povećano je i preživljenje bez korištenja trajne ventilacije. Ataluren je mala molekula koja može stabilizirati mišićnu funkciju omogućujući čitanje preranog stop kodona u pacijenata s besmislenom mutacijom uzrokovanom Duchenneovom mišićnom distrofijom (DMD). Neke terapije, primjerice, eteplirsen, ponovno uspostavljaju translacijski okvir čitanja i tako omogućuju sintezu funkcionalnog distrofina. Alglukozidaza alfa se koristi kao enzimska zamjenska terapija kod pacijenata s Pompeovom bolešću. Terapija je imala najveći učinak na poboljšanje srčane hipertrofije i preživljenje bolesnika s ranim nastupom te pokretljivost i respiratorni status u pacijenata s kasnim nastupom Pompeove bolesti. Cilj rada je prikazati genetičku podlogu određenih neuromuskularnih bolesti i njihovu odobrenu terapiju. Ključne riječi: neuromuskularne bolesti, terapija, genska terapija



## **SUMMARY**

### **Gene therapy in neuromuscular diseases**

Elena Jellin

Neuromuscular diseases are a very heterogeneous group of diseases which affect the lower motor neuron, the peripheral nervous system, the neuromuscular junction, and the muscle. Neuromuscular disorders are predominantly genetically conditioned and are therefore very important in the paediatrics. There are several approved therapies for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). Therapies such as nusinersen, an antisense oligonucleotide, and risdiplam, a small molecule, modify the splicing mechanism in order to include exon 7 in transcripts of the SMN2 (survival motor neuron 2) gene. Thus, an increased amount of SMN (survival motor neuron) protein is available and patients show ameliorated motor function not expected within the natural course of the disease. Onasemnogene abeparvovec is a gene therapy which includes the direct manipulation of the patient's genome. A functional copy of the mutated gene is delivered by viral vectors - adeno associated viruses (AAV). Patients experience improvements to motor function and develop increased motor capacity, and the ventilation-free survival rate is increased as well. Ataluren is a small molecule which can stabilise the muscle function by enabling the readthrough of a premature stop codon in patients with a nonsense mutation caused Duchenne muscular dystrophy (DMD). Some therapies such as eteplirsen, re-establish a translational reading frame and therefore enable the synthesis of functional dystrophin. Alglucosidase alpha is used as an enzymatic replacement therapy for patients with Pompe disease. The therapy has demonstrated its largest impact in terms of improvement in cases of heart hypertrophy as well as survival rates in patients with infantile-onset disease, and in improving the ambulatory and respiratory status of patients with the late-onset Pompe disease. The goal of this paper is to review the genetic basis of certain neuromuscular diseases and their approved therapies.

Key words: neuromuscular diseases, therapy, gene therapy

# 1. UVOD

Neuromuskularne bolesti obuhvaćaju široku grupu poremećaja, a bolešću može biti zahvaćen bilo koji dio motorne jedinice, uključujući motorne neurone u prednjem rogu kralježnične moždine, periferni živac, neuromuskularnu spojnicu ili sam mišić. Karakterizira ih mišićna slabost, koja se ponajviše očituje u oslabljenoj pokretljivosti, koštano-zglobnim deformitetima i kontrakturama, promijenjen osjet u neuropatijama te zatajenje disanja (1). Većina neuromuskularnih poremećaja pedijatrijske populacije su genetičke etiologije (2), što je povijesno predstavljalo grupu bolesti s uzrokom na koji nije moguće djelovati. Uvođenjem multidisciplinarnе potporne terapije, primjerice fizioterapije, ortopedskih pomagala, pulmološkog i kardiološkog liječenja te nutritivne potpore, životni vijek bolesnika s Duchenneovom mišićnom distrofijom (DMD), najčešćom dječjom neuromuskularnom bolešću, produljen je i više od 10 godina (3). Otkrićem distrofinskih mutacija u DMD krajem 80.-ih godina prošloga stoljeća (4) pokrenuta je era otkrivanja i ostalih promijenjenih gena te omogućeno potpunije upoznavanje patofiziologije neuromuskularnih bolesti. Time je unaprijeđeno dijagnosticiranje, određivanje prognoze i genetsko savjetovanje, a neuromuskularne bolesti su mogle postati dijelom širokog spektra bolesti koje su područje interesa genske terapije. Terapije rekombinantnim humanim enzimima prisutne su već duže vrijeme u liječenju neuromuskularnih poremećaja, a nova otkrića i tehnologije rezultirali su i prvim odobrenim genskim terapijama, 2014. g. za DMD te 2016. g. za SMA. Takve terapije većinom djeluju putem protusmjernih oligonukleotida (ASO – engl. *antisense oligonucleotide*), bez direktnog unošenja funkcionalnog gena, a 2019. g. odobrena je i prva genska terapija s neposrednim mijenjanjem genoma bolesnika oboljelih od SMA (5).

## 2. SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA

Spinalna mišićna atrofiya (SMA) je primarno bolest donjeg motoneurona, ali i ostalih dijelova motorne jedinice. SMA obilježava progredirajuća mišićna slabost i atrofiya koji dovode do paralize (6). Fenotipski može varirati od prenatalnih znakova i respiratorne insuficijencije u ranoj dojenačkoj dobi do blagog nastupa bolesti u odraslih pokretnih pacijenata (7). Oboljeli od SMA imaju nedostatak SMN proteina, kojeg kodiraju SMN geni, a koji se povezuje s propadanjem neurona u prednjem rogu moždine. To je autosomno recesivna bolest uzrokovana delecijom ili mutacijom SMN1 (engl. *survival motor neuron 1*) gena na kromosomu 5q13. Oboljeli najčešće imaju homozigotnu deleciju u SMN1 genu u egzonu 7 i 8, ili samo egzonu 7. Ostatak predstavljaju složeni heterozigoti za lokus, s delecijom ili genskom konverzijom u SMN1 genu na jednom alelu te točkastom mutacijom na drugom alelu (8). Na svakom alelu se može pronaći par suptilno različitih SMN gena, telomerični SMN1 i centromerični SMN2. SMN2 gen se razlikuje po supstituciji C u T u pojačivaču egzonskog prekrajanja. Posljedično tome, glasnička mRNA (mRNA – engl. *messenger RNA*) SMN2 gena ne sadrži egzon 7 te njenom translacijom nastaje skraćeni SMN protein koji je afunkcionalan i podložan razgradnji. Ipak, manji dio mRNA je pune dužine i od njega nastaje normalan SMN protein što objašnjava ulogu broj kopija SMN2 gena u težini bolesti (7). Iako SMN protein sudjeluje u raznim unutarstaničnim procesima, kao što su RNA procesi, regulacija citoskeletne dinamike, autofagija, mitohondrijska te ubikvitinska ravnoteža, dosad nije otkriven odlučujući mehanizam kojim nedostatak SMN proteina uzrokuje SMA (9).

### 2.1. NUSINERSEN

Nusinersen (Spinraza) je bio prvi lijek za liječenje djece i odraslih oboljelih od SMA, odobren od strane FDA (U.S. Food and Drug Administration) 23. prosinca 2016. godine (10). 30. svibnja 2017. godine je odobren i u Europskoj uniji (11). Nusinersen je protusmjerni oligonukleotid koji mijenjanjem prekrajanja pre-mRNA, povećava broj SMN proteina pune dužine dobivenih iz SMN2 gena. Nusinersen se primjenjuje intratekalno putem lumbalne punkcije.

### 2.1.1. Mehanizam djelovanja

Nusinersen je ASO, jednolančana DNA, koja se veže za pre-mRNA nastalu transkripcijom SMN2 gena. Veže se sparivanjem baza na mjesto intronskog prigušivača prekrajanja N1 (ISS-N1 – engl. *intronic splicing silencer N1*) koje se nalazi na intronu 7. Vežanjem nusinersena onemogućeno je vezanje heterogenih nuklearnih ribonukleoproteina (hnRNP – engl. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) koji inače potiskuju prekrajanje i inhibiraju uključivanje egzona 7 u mRNA. Translacijom mRNA s uključenim egzonima 7 nastaju funkcionalni proteini pune dužine i iz SMN2 gena, slično kao što bi nastali iz SMN1 gena kada ne bi bio mutiran (12,13). ASO se nakon intravenske primjene distribuiraju u periferna tkiva, s najvećim afinitetom za jetru, te ne prelaze krvno moždanu barijeru (14). S druge strane, direktna infuzija ASO u središnji živčani sustav povećava SMN protein u motornim neuronima kralježnične moždine. U pretkliničkim istraživanjima je pokazano kako ASO koji se hibridizira s ISS-N1, nakon infuzije u moždani ventrikul miševa, povećava uključivanje egzona 7 u SMN2 transkriptima te humani SMN protein u mozgu i kralježničnoj moždini (15). Također, injekcija nusinersena u živčani sustav miševa u stadiju embrija pokazala je veći učinak u poboljšanju fenotipskih značajki, tj. nekroze udova i repa, nego primjena kod postnatalnih modela, što ukazuje na nužnost rane primjene terapije (15).

### 2.1.2. Klinička istraživanja

U prvim istraživanjima faze I, nusinersen se pokazao sigurnim, a u određenim dozama i s djelovanjem na motoričku funkciju te su istraživanja proširena (16). U fazi I/II istraživanja, nazvanoj CS2, djeca u dobi 2-15 godina, sa SMA tip II i III, podijeljena su u nekoliko kohorti te su intratekalno primala različite doze nusinersena kroz 85 dana. Potom su mogli nastaviti s dozom od 12 mg kroz produžetak istraživanja CS12. U CS2 i CS12 učinkovitost nusinersena se procjenjivala mjerama ishoda poput HFMSE (Hammersmith Functional Motor Scale-Expanded), ULM (Upper Limb Module), 6MWT (6-Minute Walk Test), CMAP (compound muscle action potential) i MUNE (motor unit number estimation) (17). HFMSE je skala s 33 zadatka kojima se procjenjuju motorne mogućnosti u SMA tip II i III, a za razliku od HFMS (Hammersmith Functional Motor Scale) obuhvaća dodatne zadatke za pokretne SMA tip III pacijente (18). ULM mjeri funkciju gornjih udova, čak i u veoma slabih nepokretnih SMA bolesnika (19). U 6MWT ispitanici moraju hodati što više mogu tijekom 6 minuta, a pri tomu je dopušteno stati, ali ne i koristiti pomagala ili sjesti (20). CMAP i MUNE su elektrofiziološke mjere inervacije mišića (21). Ispitanici sa SMA tip II imali su veće povećanje u HFMSE skali

i ULM testu, a sa SMA tip III u 6MWT. Pretpostavlja se kako je veća klinički značajna razlika u HFMSE kod SMA tip II, nego tip III, rezultat većeg mogućeg prostora za napredak u motorički jednostavnijim radnjama kod težeg SMA tip II. Kod SMA tip III, zabilježena je i ponovna uspostava izgubljene mogućnosti hoda (17).

Osim u oboljelih od SMA tip II i III, primjena nusinersena počela se ispitivati i u oboljelih od težeg oblika SMA s razvojem simptoma već u infantilnom razdoblju. U fazi II se procjenjivala primjena nusinersena kod pacijenata u dobi od 3 tjedna do 7 mjeseci s manifestacijom bolesti u dobi između 3 tjedna i 6 mjeseci. U procjeni motorne funkcije koristile su se HINE-2 (Hammersmith Infant Neurological Exam-Part 2) i CHOP INTEND (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders) skala te CMAP (22). HINE se bazira na neurološkoj procjeni i koristi se kod djece u dobi 2-24 mjeseca, a podijeljena je u tri dijela, od kojih HINE-2 ocjenjuje motorički razvoj (23). CHOP INTEND skala je posebno razvijena za SMA tip I pacijente te se pomoću nje ocjenjuje motoričku funkciju s 0-64 boda, a klinički značajnim za SMA smatra se postizanje i održavanje više od 40 bodova skale (24). Istraživanje je pokazalo kako je ponavljana intratekalna primjena nusinersena relativno sigurna i kod dojenčadi te da oboljeli pokazuju napredak u motoričkoj funkciji, razvoju i ventilacijskom statusu, pogotovo pri dozi od 12 mg (22). Ishodi su poduprli fazu III istraživanja, kao što je ENDEAR.

U istraživanju ENDEAR su bila obuhvaćena djeca u istoj dobnoj skupini, dakle dojenčad do 7 mjeseci starosti, a koja ima 2 kopije SMN2 gena. Razlika je što je istraživanje bilo kontrolirano, naime jedna grupa ispitanika (n=80) dobila je intratekalno nusinersen u dozi prilagođenoj volumenu cerebrospinalne tekućine obzirom na dob, a druga (n=41) samo ubod malom iglom na mjesto gdje bi se primijenila intratekalna terapija. Primarni ishod koji se istraživao bio je napredak u motoričkom razvoju prema HINE te vrijeme do smrti ili potrebe za trajnom ventilacijskom potporom. Analiza iz lipnja 2016. g. pokazala je da je u grupi liječenih nusinersenom bio značajno veći udio dojenčadi koja je postigla napredak u motornom razvoju te je istraživanje ranije završeno. Prema rezultatima konačne analize, polovica dojenčadi liječene nusinersenom pokazala je motorički napredak. Naime, 22% je postiglo punu kontrolu pokreta glave, 10% se moglo kotrljati, 8% samostalno sjediti, a 1% stajati. Niti jedno dojenče iz kontrolne skupine nije razvilo takve mogućnosti. Rizik za smrtni ishod ili trajnu ventilaciju bio je smanjen za gotovo polovicu u liječenoj grupi u odnosu na placebo. Ispitanici na terapiji nusinersenom pokazali su i povećanje u CHOP INTEND bodovima te CMAP amplitudi. No, dio pacijenata je preminuo, a zabilježeni motorički napredak nije sustigao očekivani razvoj kod djece bez SMA, što ukazuje da nusinersen ne može izliječiti samu bolest kod simptomatskih

pacijenata (25). Ispitanici su iz istraživanja ENDEAR uključeni u istraživanje SHINE koje procjenjuje dugotrajni utjecaj nusinersena na motornu funkciju i kvalitetu života (26).

CHERISH je faza III placebo kontroliranog kliničkog istraživanja učinkovitosti nusinersena u pacijenata s kasnijim nastupom SMA. Ispitanici su bili djeca koja su razvila simptome nakon 6 mjeseci starosti, a u vrijeme uključivanja su bila u dobi 2-12 godina. Također, mogli su samostalno sjediti, ali ne i hodati. HFSME zbroj bodova im je bio 10-54. Nusinersen skupina je dobivala 12 mg nusinersena intratekalno, a kontrolna grupa samo ubod malom iglom kao simulaciju. Nusinersen je pokazao puno značajnije djelovanje na motoriku u usporedbi s kontrolnom skupinom, a mlađi pacijenti i pacijenti koji su liječeni u kratkom periodu od postavljanja dijagnoze su imali izrazitiju razliku u HFMSE bodovima tijekom perioda od 15 mjeseci (27). Istraživanje je ranije prekinuto, a ispitanici su, također, uključeni u istraživanje SHINE (26).

Za razliku od prethodnih, NURTURE je faza istraživanja kod dojenčadi s presimptomatskom SMA. U analizi provedenoj kada je medijan dobi ispitanika bio gotovo 3 godine, svih 25 ispitanika bilo je živo i bez trajne ventilacije. Osim odstupanja od tipične kliničke slike za SMA, pokazali su i bolje preživljenje u odnosu na studiju ENDEAR. Također, svi ispitanici su mogli samostalno sjediti, a većina, 88% ispitanika, samostalno hodati. Većina ovih motoričkih vještina bila je postignuta u periodu očekivanom za zdravu djecu (28).

U tijeku su istraživanja kao što je DEVOTE, trodijelno istraživanje u fazi II/III kojem je cilj ispitati imaju li više doze nusinersena bolje ishode kod oboljelih u odnosu na trenutno preporučene doze (29), te RESPOND, faza IV u kojoj nusinersen primaju pacijenti koji su pokazali suboptimalan odgovor na prethodno liječenje s onasemnogen abeparvovekom (30).

### 2.1.3. Sigurnost

Lumbalna punkcija je korisna dijagnostička i terapijska procedura u pedijatrijskoj populaciji (31). Iako većinom sigurna, najčešće nuspojave su glavobolja, bol u leđima te prolazno ili trajno istjecanje likvora (postpunkcijski sindrom) (32–34). No, izvedbu lumbalne punkcije kod djece, koja boluju od SMA, otežavaju dodatne okolnosti, primjerice, učestala skolioza. Stoga su Haché i suradnici (35), na temelju faze I istraživanja, proveli analizu s ciljem definiranja sigurnosti i smjernica za intratekalnu primjenu nusinersena. U fazi I je 28 ispitanika, oboljelih od SMA tip II i III, u dobi 2-14 godina, trebalo dva puta primiti intratekalno nusinersen. U produžetak terapije se uključilo njih 18 koji su tada treći puta lumbalno punktirani (16). U većini postupaka su bile korištene igle od 22 i 25 G, djeca su bila u bočnom ili ležećem položaju, a

punktirao se prostor L3-L4 ili L4-L5. Gotovo sve lumbalne punkcije su bile uspješno izvedene i više od polovice nije imalo komplikacija. 32% (23/73) punkcija je bilo popraćeno s nuspojavama, od kojih su se očekivano najviše javljale glavobolja, bol u leđima te postpunkcijski sindrom. Sve nuspojave su regresirale spontano ili uz konzervativnu terapiju, iako je kod jednog ispitanika profilaktički učinjena epiduralna krvna zakrpa. Učestalost navedenih nuspojava bila je veća prilikom korištenja igli većih mjera (21 ili 22 G), starije djece (8-14 godina) te djece oboljele od SMA tip III. Pretpostavlja se da su korištenje većih ili igli režućeg tipa, ponavljanje procedure, veća tjelesna težina, skolioza ili naglašena lumbalna lordoza mogući uzrok češćih nuspojava kod starije djece i djece sa SMA tip III. Stoga autori analize predlažu uporabu spinalne igle od 24 G ili manje. Kod pacijenata sa skoliozom ili kirurškim implantantima u kralježnici moguće je olakšati i poboljšati postupak koristeći se ultrazvukom (35). Pri izvedbi lumbalne punkcije u djece, koriste se opća anestezija i/ili sedacija (36). Obzirom da su djeca oboljela od SMA zbog mišićne slabosti i razvijene skolioze podložna respiratornoj dekompenzaciji, predlaže se što manje moguće korištenje sedativa ili anestezije. Rezultati analize pokazali su kako je intratekalna primjena nusinersena sigurna i dobro podnošljiva, a pogotovo ukoliko se u obzir uzimaju navedene preporuke donesene na temelju istraživanja (35). Kod oboljelih od SMA tip I, dob je jedan od presudnih čimbenika za traumatsku ili neuspješnu lumbalnu punkciju. Pri intratekalnoj primjeni kemoterapije za liječenje akutne limfoblastične leukemije, kao rizični faktor se navodi dob manja od 12 mjeseci (37). Nigrovic i suradnici (38) su kao čimbenik nepovoljnog ishoda lumbalne punkcije naveli dob od 3 mjeseca ili manje. Osim toga, spominju se nemogućnost određivanja lumbalnih spinoznih nastavaka, neiskusani liječnik, nekorištenje lokalnog anestetika i nemir mlađih pacijenata. Također, česte respiratorne i ortopedske komplikacije otežavaju tehničku izvedbu i uzrokuju anesteziološke komplikacije. Zbog smanjene dobi ispitanika sa SMA tip I ne očekuje se učestala pojava postpunkcijskog sindroma (39).

#### 2.1.4. Klinička primjena

Nusinersen se intratekalno primjenjuje lumbalnom punkcijom u terapijskoj dozi od 12 mg. Doziranje je sistematizirano na udarne (0., 14., 28. i 63. dan) te doze održavanja (jedanput svaka 4 mjeseca). Prije svake doze potrebno je odrediti broj trombocita, jetrene koagulacijske testove te proteine u urinu (40). Bez obzira na mogućnost poboljšanja u kliničkoj slici, nusinersen nije terapija izlječenja za SMA. Obzirom da su najbolji rezultati dobiveni u presimptomatske djece (28), ona bi trebala imati najveću korist od terapije nusinersenom, a pogotovo ukoliko imaju 2

kopije SMN2 gena (vjerojatno će razviti SMA tip I) (41). To bi se moglo omogućiti s novorođenačkim probirom. Sljedeći po odgovoru su SMA tip I, a kod njih je ključno početi liječenje što ranije nakon razvitka simptoma te u što mlađoj dobi. Nije u potpunosti jasna korist kod odraslih sa SMA. Također, kod njih je sama bolest slabije progresivna, u odnosu na agresivnije infantilne oblike, te se teško uočava klinički odgovor na terapiju ako postoji (41).

## 2.2. ONASEMNOGEN ABEPARVOVEK

Onasemnogen abeparvovek (Zolgensma) je 24. svibnja 2019. odobren od strane FDA kao prva terapija zamjenom gena za liječenje djece mlađe od 2 godine oboljele od SMA (42,43). Također, 18. svibnja 2020. uvjetno je odobren od EMA (European Medicines Agency) za liječenje pacijenata s bialelnom mutacijom SMN1 gena, a koji imaju kliničku dijagnozu SMA tip I ili 3 kopije SMN2 gena (44). Cilj ove intravenske terapije je nadomjestiti SMN gen funkcionalnom kopijom gena koja kodira SMN protein. Gen se prenosi putem vektora, adeno asociranih virusa (AAV – engl. *adeno-associated virus*), do stanica motornih neurona pacijenata sa SMA.

### 2.2.1. Mehanizam djelovanja

AAV su poznati vektori u genskoj terapiji. Ovim jednolančanim DNA virusima za replikaciju su potrebni drugi virusi, najčešće adenovirusi, po čemu su i nazvani (45). Neke od prednosti za njihovu široku primjenu u genskoj terapiji su što zahvaćaju proliferativne i neproliferativne stanice, a ne smatraju se uzročnicima bolesti u ljudi (46). U genskoj terapiji se koriste rekombinantni AAV (rAAV – engl. *recombinant AAV*) kojima je ugrađen gen od terapijskog interesa, a imaju uklonjene neželjene viralne gene (47). rAAV se prima putem glikoziliranih receptora te ulazi u stanicu putem endocitoze posredovane klatrinom. Nakon izlaska iz endosoma, rAAV ulazi u jezgru kroz kompleks jezgrinih pora i genetski sadržaj se oslobađa kapside (48). Za razliku od ssAAV (engl. *single-stranded AAV*), koja za tvorbu dvolančane DNA nužne za početak transkripcije treba domaćinovu DNA polimerazu, scAAV (engl. *self-complementary AAV*) je jednolančana DNA komplementarna samoj sebi te formira dvolančani oblik u jezgri neovisno o domaćinovoj DNA sintezi (49). Tako onasemnogen abeparvovek sadrži scAAV te, također, promotor od hibrida pilećeg beta-aktina pojačanog citomegalovirusom (42), kako bi se postigla što brža i intenzivna ekspresija, a u svrhu učinka



na brzoprogresivnu bolest kao što je SMA. Genetski materijal se rijetko ugrađuje u genom domaćina te većinom postoji kao episomalna DNA (48,50), što smanjuje mogućnost insercijske mutageneze (51). Obzirom da je terapijski cilj djelovanje na motorne neurone koji su dugoživuće stanice, jednom primijenjena terapija bi trebala biti dovoljna za doživotnu ekspresiju i dugotrajni učinak (52). Vektor je AAV9 serotipa, jer je pokazano u pretkliničkim istraživanjima da prolazi krvno-moždanu barijeru (53), a što je ključno za pristup motornim neuronima prilikom intravenske primjene lijeka. Naime, Foust i suradnici (53) potvrdili su koncept djelovanja pokazavši kako intravenska injekcija scAAV9 vektora sa SMN genom kod tek rođenih miševa povećava dostupnost SMN proteina u mozgu, kralježničnoj moždini i mišićima. Također, poboljšana je motorika i produljen životni vijek bolesnih životinja, a primijećeno je i kako učinak opada s odgodom terapije. Dodatna pogodnost sistemskog liječenja je i u tome što se u novije vrijeme SMA počinje promatrati kao višesustavna, a ne bolest izolirano motornih neurona (54).

### 2.2.2. Klinička istraživanja

START je faza I istraživanja primjene onasemnogen abeparvovek kod dojenčadi do 6 mjeseci starosti, oboljele od SMA tip I i s 2 kopije SMN2 gena. Kroz dvije kohorte se pratilo 15 ispitanika tijekom dvije godine. Kohorte su se razlikovale po primijenjenoj dozi lijeka, ispitanici u kohorti 2 (n=12) su primili veću dozu ( $2.0 \times 10^{14}$  vg/kg). Također, prosječna dob ispitanika u kohorti 1 za vrijeme primanja lijeka bila je 6.3 mjeseca, a onih u kohorti 2 3.4 mjeseca. Primarno se pratila sigurnost, a sekundarno dob koju pacijenti dožive, a u kojoj nije potrebna trajna ventilacijska potpora. Također, vrednovali su se motorička vještina pomoću CHOP INTEND skale te postignuća u motornom razvoju (55). Svi ispitanici su dosegli starost od barem 20 mjeseci bez potrebe za trajnom ventilacijom (55), dok je u drugim kohortama medijan dobi, u kojoj kod oboljelog od SMA tip I s dvije kopije SMN2 gena nastupa smrt ili pacijenti zahtijevaju trajnu ventilacijsku potporu, samo 10.5 mjeseci (56). Svi ispitanici su pokazali poboljšanje CHOP INTEND skale u odnosu na početne vrijednosti, a klinički istaknut napredak postigli su gotovo svi pacijenti iz kohorte s većom (danas preporučenom) dozom (55). Navedeno je suprotno očekivanom tijeku SMA tip I u kojem djeca progresivno gube motoričku sposobnost (56,57). Ispitanici su ostvarili i znatna postignuća u motornom razvoju. Naime, 11 od 12 ispitanika je moglo samostalno sjediti, kontrolirati pokrete glavom i govoriti, a dvoje čak puzati, stajati i hodati (55), što dotad nije bilo zabilježeno (56,58). Dakle, pokazano je kako jedna intravenska infuzija onasemnogen abeparvoveka kod SMA tip I

oboljele djece može povećati preživljenje uz smanjenje potpornih terapijskih intervencija, kao i motorički razvoj oboljelih u odnosu na dotadašnja opažanja za SMA tip I, ali i dalje ne omogućava izlječenje bolesnika.

Nakon završetka START istraživanja, 13 ispitanika, od kojih 10 iz kohorte koja je primala veću dozu, uključeno je u dugotrajno praćenje, a prema posljednjim podacima, djeca su bila prosječne dobi od 4.8 godina. Niti jedan od ispitanika iz kohorte s terapijskom dozom nije trebao trajnu ventilacijsku potporu te su uspjeli održati motorički napredak (59).

U kasnijoj analizi, ispitanici iz kohorte koja je primila veću dozu, podijeljeni su u tri grupe sukladno vremenu kad su primili terapiju te motoričkim funkcijama prema CHOP INTEND skali prethodno terapiji. Tako je uočeno da je grupa koja je primila terapiju ranije, bez obzira na slabiju početnu motoriku, mogla prije samostalno sjediti, nego grupa koja je početno imala bolji rezultat prema CHOP INTEND skali, ali kasnije primila terapiju. Očekivano, ispitanici koji su primili terapiju prije navršena 3 mjeseca i bili motorički najrazvijeniji, ostvarili su najbrži napredak (60). Obzirom da, ukoliko je rano primijenjen, onasemnogen abeparvovek omogućava brz i značajan motorički napredak kod djece s težom motoričkom nesposobnošću, može se zaključiti da je rana dob primijenjene terapije ključan element u prognozi bolesti te da liječenjem svakako treba obuhvatiti i pacijente s teškim oblikom SMA tip I.

Prethodni rezultati potvrdili su se kroz STRIVE, fazu III multicentričnog istraživanja. Procjenjivala se primjena onasemnogen abeparvovek kod 22 bolesnika sa SMA tip I, mlađih od 6 mjeseci, koji imaju 1 ili 2 kopije SMN2 gena (61). 91% ispitanika doživjelo je dob od 14 mjeseci i pri tome nije trebalo trajnu ventilacijsku potporu. Većina, 59% ispitanika, mogla je u dobi od 18 mjeseci sjediti samostalno barem 30 sekundi, dok djeca sa SMA tip I inače nemaju mogućnost samostalnog sjedenja (58). Dok je većini SMA tip I pacijenata s 12 mjeseci potrebna nutritivna i ventilacijska potpora (57), STRIVE ispitanici, osim motoričkog, pokazali su nutritivni te respiratorni napredak (61).

Za razliku od prethodno navedenih, STRONG je faza I multicentričnog istraživanja u kojoj se onasemnogen abeparvovek primjenjuje intratekalno, i to kod pacijenata oboljelih od SMA tip II s 3 kopije SMN2 gena (62). Međutim, obzirom na rezultate pretkliničkih ispitivanja i toksičan učinak genske terapije na stražnje korijenove eksperimentalnih životinja, za sada je kliničko ispitivanje STRONG za bolesnike sa SMA u dobi od 6 mjeseci do 6 godina obustavljeno. Obzirom na pozitivni odgovor na rano primijenjenu terapiju, u tijeku je i faza III u presimptomatskih pacijenata, SPRINT. Uključeni su pacijenti oboljeli od SMA koji su mlađi od 6 tjedana te posjeduju 2 ili 3 kopije SMN2 gena (63).

### 2.2.3. Sigurnost

Chand i suradnici (64) su analizirali podatke od 31. prosinca 2019. te su obuhvatili 325 pacijenta koji su primili onasemnogen abeparvovek kroz 5 kliničkih istraživanja, MAP (engl. *managed access program*), registar RESTORE i komercijalnu uporabu. Gotovo svi ispitanici iz istraživanja su imali najmanje jedan neželjeni događaj, od kojih se 57% smatralo nuspojavom lijeka, a 11% ozbiljnom nuspojavom. Najčešće prijavljivane nuspojave su bile odstupanje u ALT (alanin-aminotransferaza) ili AST (aspartat-aminotransferaza) te povraćanje. Više od polovice ispitanika imalo je povećanje koncentracije aminotransferaza ili bilirubina prethodno samoj terapiji, s tim da u istraživanje nisu niti bili uključeni oni s GGT (gama-glutamilttransferaza), ALT, AST ili ukupnim bilirubinom povećanim  $>3$  ili  $>2 \times$  ULN (gornja granica normalnih vrijednosti ili engl. *upper limit of normal*). Postoji nekoliko mogućih uzroka za povećanje jetrenih transaminaza kod djece oboljele od SMA. Moguće je da oboljeli od SMA imaju naslijeđene jetrene abnormalnosti povezane s promijenjenim metabolizmom masnih kiselina (65) te reduciranom zalihom glutaciona (66). Potencijalni uzroci su i dodatno korištenje lijekova koji su hepatotoksični (66) te jetrene bolesti koje nisu isključivo vezane za SMA. Prvi pacijent, koji je primio onasemnogen abeparvovek, imao je višestruk porast jetrenih aminotransferaza, ali mu se stanje poboljšalo nakon terapije prednizolonom te se sistemski kortikosteroidi uvode kao standard prije i poslije infuzije kod svih ostalih pacijenata (55). Nakon infuzije onasemnogen abeparoveka kod 90% ispitanika je zabilježena elevacija ALT ili AST. Najčešće su pokazivali bimodalni porast u prvom tjednu te prvom mjesecu s prekidom uzimanja kortikosteroida. U najvećem broju slučajeva odstupanja su bila  $<3 \times$  ULN, a od onih koje su bile iznad toga, 9% elevacija je bilo blago ( $\geq 3 \times$  ULN to  $< 5 \times$  ULN), 6% umjereno ( $\geq 5$  to  $< 20 \times$  ULN) te 5% teško ( $\geq 20 \times$  ULN). Pretpostavlja se da onasemnogen abeparvovek dovodi do hepatotoksičnosti imunskim putem, što objašnjava pozitivan učinak kortikosteroida (64). Vjerojatan mehanizam je CD8+ T stanicama posredovani imunski odgovor na antigene AAV kapside koji se nalaze na površini stanica zaraženih vektorom (67). Obzirom da SMA pacijenti imaju manju količinu SMN proteina nastalu od SMN2 gena, vjerojatno ne dolazi do imunskog odgovora na infuzijom uneseni gen. Za razliku od kliničkih istraživanja s djecom do 6 mjeseci, kroz MAP su onasemnogen abeparvovek primala i starija djeca. Kod njih su najčešće nuspojave bile povećanje aminotransferaza, promjene jetrenih testova, trombocitopenija i povraćanje (64). Onasemnogen abeparvovek može dovesti do povećanja troponina I, ali ono najčešće nije praćeno elektrokardiogramskim ili ehokardiografskim odstupanjima (68).

#### 2.2.4. Klinička primjena

Onasemnogen abeparvovek se primjenjuje jednom, putem intravenske infuzije, u preporučenoj dozi od  $1.1 \times 10^{14}$  vg/kg (vektorskog genoma po kilogramu) (42). Djeca sa SMA tip I, koja su započela terapiju s manje od 3 mjeseca i s najmanje 20 CHOP INTEND bodova, pokazuju najbrži motorički odgovor (60), što ukazuje kako je terapiju potrebno primijeniti što ranije. Prethodno infuziji potrebno je procijeniti jetrenu funkciju (AST, ALT, bilirubin, protrombinsko vrijeme), broj trombocita, troponin I te protutijela na AAV9. Također, nužno je započeti terapiju sistemskim kortikosteroidom. Jetrena funkcija, trombociti te troponin I bi se trebali nastaviti nadzirati najmanje 3 naredna mjeseca, tj. do normalizacije nalaza (42).

### 2.3. RISDIPLAM

Risdiplam (Evrysdi) je 7. kolovoza 2020. odobren od strane FDA za liječenje SMA oboljelih u dobi od 2 mjeseca ili starijih (69). 26. ožujka 2021. odobren je i od EMA (70). To je mala molekula, modifikator prekrajanja pre-mRNA SMN2 gena. Za razliku od drugih modifikatora prekrajanja, primjerice, nusinersena, ova mala molekula se koristi oralno, što osim praktičnosti i sigurnosti primjene, otvara i mogućnost djelovanja na druga tkiva u kontekstu SMA kao višesustavnog poremećaja (54).

#### 2.3.1. Mehanizam djelovanja

Nije sasvim poznato kako risdiplam specifično povećava uključivanje egzona 7 u mRNA. Wang i suradnici pokazali su kako se SMN-C2 i SMN-C3, analozi risdiplama, vežu za AGGAAG sekvencu u sredini egzona 7 što dovodi do konformacijske promjene u nukleotidima na spoju introna 6 i egzona 7. Time je omogućeno vezanje specifičnih proteina koji stimuliraju prekrajanje (71). U drugom istraživanju predložen je model u kojem se SMN-C analozi vežu za dva mjesta na egzonu 7: egzonski pojačivač prekrajanja 2 (ESE2 – engl. *exonic splicing enhancer 2*) i 5' mjesto prekrajanja (5'ss – engl. *5' splice site*). Vezanje za 5'ss potiče inkluziju egzona 7 u mRNA, a vezanje za ESE2 onemogućava vezanje hnRNP G te se umjesto njega za ESE2 veže U1 snRNP kompleks bitan za prekrajanje (72). Zbog tih varijacija u prekrajanju, dolazi do povećanog uključivanja egzona 7 u mRNA SMN2 gena te se sintetiziraju normalni SMN proteini. Tako je uočeno da risdiplam primijenjen oralno odlazi u središnji živčani sustav

i periferne organe, uključujući i mišiće, krv i mozak, te povećava količinu SMN proteina u miševa oboljelih od SMA (73).

### 2.3.2. Klinička istraživanja

Postoje 4 multicentrična istraživanja faze II i III koja trenutno proučavaju sigurnost i učinkovitost risdiplama. FIREFISH je dvodijelno istraživanje u kojem se ispituje primjena risdiplama u djece stare od 1 do 7 mjeseci, oboljele od SMA tip I, s 2 kopije SMN2 gena. Primarni cilj prvog dijela je bila selekcija odgovarajuće doze, a drugog dijela procjena učinkovitosti te doze. Primarna mjera učinkovitosti u istraživanju je udio ispitanika koji nakon 12 mjeseci terapije mogu samostalno sjediti barem 5 sekundi (definirano po BSID-III skali) (74). BSID-III (Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition) skala procjenjuje razvoj djece u dobi 1 do 42 mjeseca na temelju zadataka kroz igru. Za oboljele od SMA tip I koristi se modificirana verzija skale za motoriku, kako bi se smanjio umor djece i mogao bolje procijeniti razvoj oboljele dojenčadi (75). U periodu od 12 mjeseci, kad su djeca bila prosječne dobi od gotovo 1.5 godinu, 90% ispitanika je bilo živo i bez potrebe za trajnom ventilacijom (74), dok je medijan dobi za smrtni ishod oboljelih od SMA tip I 10.5 mjeseci (56). Trećina ispitanika, od kojih su svi bili na većoj dozi risdiplama, mogla je samostalno sjediti 5 sekundi. Dio ispitanika ostvario je motorički napredak procijenjen s HINE-2 te CHOP INTEND skalom koji se rijetko mogu vidjeti kod oboljelih od SMA tip I (74).

Učinak risdiplama u pedijatrijskih i odraslih pacijenata (2-25 godina), oboljelih od SMA tip II ili III prati se kroz istraživanje SUNFISH. SUNFISH je jedino od 4 istraživanja koje je kontrolirano placebom, a primarno se mjeri promjena u motorici pomoću MFM-32 (Total Motor Function Measure 32) skale (76). MFM-32 mjeri motoričku funkciju kroz 32 točke podijeljene u tri domene. Prva domena odnosi se stajanje, premještanje i pokretnost, druga na aksijalnu i proksimalnu, a treća distalnu motoričku funkciju (77). Osim motoričkog napretka, u istraživanju se mjeri SMN2 mRNA i SMN protein u krvi, respiratorni status, sigurnost i dr.

U istraživanje JEWELFISH su uključeni ispitanici u dobi od 6 mjeseci do 60 godina, a koji su prethodno sudjelovali u istraživanju drugih modifikatora prekrajanja ili su koristili druge oblike terapije SMA (78). Istraživanje će dati uvid i u to da li oboljeli odgovaraju na terapiju risdiplomom, iako nisu imali zadovoljavajući pomak pri prethodnim terapijama.

Obzirom na važnost ranog početka liječenja SMA, u istraživanje RAINBOWFISH uključuju se presimptomatska dojenčad do 6 tjedana starosti kojima je genetskim testiranjem dijagnosticirano da boluju od SMA (79).

### 2.3.3. Sigurnost

Najčešće nuspojave risdiplama su temperatura, dijareja, osip, ulceracije u području usta, artralgijska te urinarna infekcija. Kod dojenčadi se mogu javiti i infekcije gornjeg respiratornog trakta, pneumonija, konstipacija te povraćanje (74,80). Obzirom da je kod primata pronađena degeneracija mrežnice nakon kroničnog korištenja risdiplama (81), kroz istraživanja FIREFISH, SUNFISH i JEWELFISH je provedena opsežna evaluacija oftalmoloških nuspojava zbog primarne toksičnosti na retinu. Od 158 ispitanika iz FIREFISH, 1. dijela SUNFISH i JEWELFISH istraživanja, 5.7% ih je imalo oftalmološki neželjeni događaj. Smatra se da ti oftalmološki entiteti nisu bili vezani uz izloženost risdiplamu te su se povukli neovisno o nastavku terapije. Slični rezultati su zabilježeni i kod ispitanika koji su primali risdiplam ili placebo u 2. dijelu SUNFISH istraživanja. Zaključeno je kako risdiplam ne dovodi do oftalmološke toksičnosti u pedijatrijskih ili odraslih pacijenata te kako nije potrebno njihovo oftalmološko praćenje (82). Kod primata i štakora je primijećena degeneracija testikularnih zametnih stanica (81) te stoga nije isključen mogući utjecaj risdiplama na smanjenje plodnosti kod muškaraca, a nije isključena ni fetalna toksičnost (80). Etiopatogenetski se radi o učinku risdiplama na prekrivanje drugih gena, kao što su MADD (engl. *MAPK-activating death domain*) i FOXM1 (engl. *forkhead box M1*), koji su bitni za pravilno odvijanje staničnog ciklusa i apoptozu (81).

### 2.3.4. Klinička primjena

Risdiplam se primjenjuje jednom dnevno kao oralna otopina, poslije obroka. Preporučena doza se određuje obzirom na starost i tjelesnu težinu. Tako bi djeca u dobi od 2 mjeseca do 2 godine trebala dobivati 0.2 mg/kg, a starija od 2 godine 0.25 mg/kg, odnosno 5 mg ukoliko su teški 20 kg ili više. Odrasli bi trebali uzimati 5 mg risdiplama dnevno. Kod osoba reproduktivne dobi se preporuča učiniti test na trudnoću prethodno početku terapije te korištenje visoko učinkovite kontracepcijske zaštite tijekom i mjesec dana nakon uzimanja risdiplama. Muške pacijente bi trebalo upozoriti na moguće smanjenje plodnosti (80). Potrebno je redovito praćenje bolesnika na risdiplamu, uključujući i jetrene transaminaze, kompletnu krvnu sliku, ali i očnu pozadinu optičkom koherentnom tomografijom (OCT – engl. *optical coherence tomography*).

### 3. DUCHENNEOVA MIŠIĆNA DISTROFIJA

Duchenneova mišićna distrofija je neuromuskularni poremećaj obilježen progresivnim razvojem slabosti proksimalnih mišića koji se u početku očituje kašnjenjem u motoričkom razvoju, promijenjenim hodom, otežanim uspravljanjem ili nespretnosti s čestim padovima (83). Dijagnoza se postavlja obično oko 4 godine starosti (84), a oboljeli često postaju nepokretni do 12. godine, uz najčešće smrtne respiratorne i srčane komplikacije u drugom desetljeću života (85). DMD uzrokuju mutacije u genu za distrofin na X kromosomu. Najčešće dijagnosticirane mutacije koje obuhvaćaju približno 65% mutacija su delecije, a slijede ih duplikacije. Ostatak čine manje i atipične mutacije. Najčešće su mutirani egzoni 3-7 te 44-53, ali genetska promjena se može pojaviti bilo gdje unutar distrofinskog gena (86). Nedostatak distrofina uzrokuje poremećaj u distrofinskom glikoproteinskom kompleksu (DGC – engl. *dystrophin glycoprotein complex*) jer distrofin jednim krajem veže F-aktin, a drugim  $\beta$ -dystroglikan u mišićima (87). Pretpostavlja se da cjeloviti distrofinski kompleks služi kao membranski stabilizator u mišićnoj kontrakciji te tako sprječava moguća oštećenja (88,89).

#### 3.1. ATALUREN

Ataluren (Translarna) je uvjetno odobren od strane EMA za liječenje DMD uzrokovane besmislenom mutacijom u genu za distrofin, kod pokretnih pacijenata u dobi od 2 godine ili starijih. Iako uvjetno odobren od 31. srpnja 2014., tek kasnije mu je proširena dobna indikacija (90). Približno 10-15% pacijenata oboljelih od DMD ima besmisleno mutaciju (91), a ova mala molekula omogućuje čitanje mutacijom uzrokovanog stop kodona i sintezu distrofina. Primjenjuje se oralno.

##### 3.1.1. Mehanizam djelovanja

Prilikom translacije ribosomi se pomiču duž mRNA i slažu od niza aminokiselina protein sve dok ne dođu do jednog od tri moguća stop kodona. Besmislena mutacija nastaje ukoliko točkasta mutacija uzrokuje promjenu kodona, koji bi inače kodirao novu aminokiselinu, u stop kodon kojim završava translacija. Zbog nedovršene mRNA translacije, nastaje skraćeni protein i razvijaju se simptomi bolesti. U interakciji s ribosomom, ataluren potiče umetanje nove transportne RNA (tRNA – engl. *transfer RNA*) kod mjesta stop kodona (92). Antikodoni te

tRNA se često ne sparuju s prvom i trećom bazom kodona (93). Umetanjem tRNA omogućeno je čitanje preko stop kodona koji bi doveo do preranog završetka translacije. Nastaje protein koji ima u sebi zamijenjenu aminokiselinu, ali je normalne duljine i zadržava endogenu funkciju (92). Pokazano je kako ataluren djeluje putem potiskivanja besmislene mutacije te dovodi do pojave distrofina na membrani mišićnog vlakna u kulturama stanica DMD pacijenata i mišjeg model za DMD, a štiti miševe i od kontrakcijske ozljede (94).

### 3.1.2. Klinička istraživanja

U fazi I na zdravim dobrovoljcima, osim sigurnosti i farmakokinetike, klinički je potvrđeno da ataluren ne dovodi do nespecifičnog čitanja normalnih stop kodona koje bi dovelo do povećanja drugih proteina u tijelu (95).

U fazi IIa istraživanja željelo se vidjeti može li ataluren obnoviti sintezu distrofina u mišićima DMD pacijenata. Kod DMD oboljelih ispitanika napravila se ekscizijska biopsija m. extensor digitorum brevis prije i nakon 28 dana terapije atalurenom. Kvalitativna i kvantitativna analiza imunofluorescencije bioptata pokazala je povećanu ekspresiju distrofina 28 dana nakon terapije atalurenom. Čak i uzorci koji nisu imali željeni ishod, nakon kultivacije mišićnih vlakana i izlaganja atalurenu in vitro, pokazali su povećanu ekspresiju distrofina, što ukazuje da su svi ispitanici mogli pokazati odgovor na staničnoj razini. Promjene u kliničkom stanju nakon 28 dana terapije atalurenom su bile male i nisu bile statistički značajne (96). Obzirom na dokazani terapijski koncept, režimi doziranja iz ove faze ispitivani su kroz multicentrična, randomizirana, dvostruko slijepa i placebo kontrolirana istraživanja faze IIb i III.

U fazi IIb istraživanja 174 ispitanika u dobi od najmanje 5 godina bilo je raspoređeno u tri grupe (dnevna doza 80 mg/kg, 40 mg/kg i placebo). Primarni ishod bio je izmjeriti promjenu u udaljenosti 6MWT nakon godinu dana primjene atalurena. Ispitanici su izvorno morali moći prehodati barem 75 m u 6MWT. Ataluren je usporio gubitak sposobnosti hoda kod DMD pacijenata, a razlika u odnosu na neliječene od više od 30 m smatra se i klinički značajnom. Naime, prema post hoc analizi ishoda ispitanici, koji su bili na dnevnoj terapiji od 40 mg/kg atalurena, su imali prosječno skraćanje udaljenosti 6MWT za 12.9 m, a oni koji su primali placebo za 44.1 m. Ataluren je, također, usporio progresiju bolesti, a što je vidljivo u gotovo dvostruko manjem postotku tih ispitanika s perzistentnim 10%-tnim pogoršanjem udaljenosti hoda kroz 48 tjedana, u odnosu na placebo skupinu. Najveće razlike u odnosu na placebo bile su u podskupini s početnom udaljenosti 6MWT manjom od 350 m te podskupini u fazi pada pokretljivosti. Navedeno se objašnjava većom stabilizacijom mišićne funkcije atalurenom u



pacijenata s uočljivim napredovanjem bolesti, nego u pacijenata koji su još u ranim stabilnim fazama bolesti (97).

U fazi III istraživanja proučavala se djelotvornost atalurena kod 230 pacijenata s DMD uzrokovanom besmislenom mutacijom. Ispitanici su bili u dobi 7-16 godina te su morali imati početnu udaljenost izmjerenu 6MWT od najmanje 150 m do najviše 80% predviđene normalne vrijednosti za dob i spol. Ispitanici su bili podijeljeni u skupinu koja je primala ataluren u dozi od 40 mg/kg/danu i skupinu koja je primala placebo. Bolesnici liječeni atalurenom imali su određeno kliničko poboljšanje, ali razlike u odnosu na placebo nisu bile statistički značajne. Slično kao u prethodnim istraživanjima, ataluren je postigao klinički najveću i statistički značajnu djelotvornost u podskupini s početnim vrijednostima 6MWT u rasponu od najmanje 300 m do najviše 400 m, tj. kod bolesnika koji ulaze u fazu pogoršanja pokretljivosti (98).

Ataluren se ispitivao i za liječenje cistične fibroze uzrokovane besmislenom mutacijom, ali nisu pronađene značajne razlike u usporedbi s placebo skupinom u promjenama plućne funkcije (99,100).

### 3.1.3. Sigurnost

Sigurnosne značajke atalurena su se bazirale na rezultatima Iib i III faze istraživanja, dakle 232 ispitanika koja su primala ataluren, u usporedbi sa 172 placebo pacijenta (97,98). Najčešći zabilježeni neželjeni učinci, koji su se javili u najmanje 5% pacijenata, bili su povraćanje, proljev, mučnina, glavobolja i bol u gornjem abdomenu. U djece starosti 2-5 godina primijećene su i učestala slabost, vrućica, upale uha i osip, ali to su stanja koja se i inače češće javljaju u toj dobnoj skupini (90). Registar STRIDE (Strategic Targeting of Registries and International Database of Excellence) je internacionalni registar za praćenje iskustva s atalurenom u kliničkoj praksi. Pacijenti se uključuju od ožujka 2015., a prema podacima od srpnja 2018. napravljena je sigurnosna procjena na temelju 213 muških ispitanika koji nisu uključeni u neko od istraživanja atalurena, nego ga primaju komercijalno (101). Neželjene učinke prilikom terapije (poremećaj hoda, kašalj, proljev, prijelom femura, povraćanje, bol u truhu, glavobolja) imalo je 20.2% pacijenta, a većinom su bili blagi ili umjereni i neovisni o atalurenu. Uz ataluren su bile vezane gastroenterološke tegobe (bol u truhu, dijareja, povraćanje), glavobolja te povećanje lipida, a zabilježene su u samo 2.3% bolesnika. Poremećaj u lipidogramu te porast krvnog tlaka vjerojatno su bili posljedica korištenja kortikosteroida u sklopu standarda njege. Nije bilo značajnih poremećaja jetrenih enzima ili bubrežne funkcije (102). Obzirom na gubitak

mišićne mase i poremećaj u metabolizmu kreatinina kod pacijenata s DMD moguće je smanjenje serumskog kreatinina (103).

#### 3.1.4. Klinička primjena

Prije liječenja je nužno genetski testirati bolesnike kako bi se potvrdilo da je njihovu bolest uzrokovala besmislena mutacija na koju ataluren može djelovati. Ataluren se uzima oralno, a ukupna dnevna doza od 40 mg/kg je raspoređena u tri manje doze (10 mg/kg ujutro, 10 mg/kg u podne, 20 mg/kg navečer). Potrebno je pratiti trigliceride, kolesterol, krvni tlak, te bubrežnu funkciju, dušik ureje u krvi (BUN – engl. *blood urea nitrogen*), serumski kreatinin i cistatin C (90). Landfeldt i suradnici su dali mišljenje da bi se liječenje trebalo započeti što ranije te da ono prestaje biti učinkovito kad se forsirani vitalni kapacitet (FVC – engl. *forced vital capacity*) smanji ispod 30%, odnosno kad pacijenti dođu do šestog stupnja Brookove skale za procjenu gornjih ekstremiteta, pri čemu ne mogu prinijeti ruke ustima i ruke nemaju korisnu funkciju (104).

### 3.2. ETEPLIRSEN

Eteplirsen (Exondys 51) je ASO koji omogućava obnavljanje okvira čitanja preskakanjem egzona 51. Eteplirsen je ubrzano odobren od FDA 19. rujna 2016. za DMD pacijente kojima je dokazana mutacija na koju se može utjecati eliminacijom egzona 51 (105). Primjenjuje se putem intravenske infuzije. Osim eteplirsena, FDA je odobrila i casimersen za mutacije podložne preskakanju egzona 45 te golodirsen i viltolarsen za egzon 53 (106–108).

#### 3.2.1. Mehanizam djelovanja

Za nedostatak distrofina u DMD većinom su odgovorne delecije jednog ili više egzona koje pomiču okvir čitanja. Sve što nastane translacijom takvog izmijenjenog transkripta vjerojatno će se razgraditi proteasomom i neće imati funkciju. Ako delecija ne dovode do pomaka okvira čitanja, što je najčešće slučaj kod Beckerove mišićne distrofije (BMD), sintetizirat će se distrofin koji će, posljedično deleciji, biti kraći, ali i dalje djelomično funkcionalan (109,110). Time je objašnjen lakši tijek bolesti kod BMD, a po tom principu funkcionira i terapija preskakanja egzona. Protusmjerni oligonukleotidi se vežu za pre-mRNA i maskiraju

odgovarajući egzon od enzima za prekrajanje te će takav egzon biti isključen iz sastava mRNA. Bez tog egzona obnavlja se okvir čitanja i sintetizira distrofin. Postojanje skraćenog i djelomično funkcionalnog distrofina radi tranziciju težeg DMD u blaži BMD fenotip (110). Preskakanjem specifično egzona 51 obnovio bi se okvir čitanja čiji je pomak uzrokovan nekim od čestih delecija, kao što su delecije koje završavaju egzonom 50 i obuhvaćaju egzone 49-50, 48-50, 47-50 i 45-50 te delecija egzona 52 (109). Tako su Bladen i suradnici (111) predložili da bi se terapijom preskakanja egzona 51 moglo djelovati na 14% svih DMD mutacija. Prva istraživanja pokazala su kako intravenskom terapijom koja dovodi do isključivanja egzona 51 dolazi do sinteze nepotpunog distrofina čija se očuvana funkcija vidi u oporavku mišićne funkcije i razine kreatin kinaze kod mišjeg DMD modela (112).

### 3.2.2. Klinička istraživanja

Distrofin se eksprimira lokalno u tretiranim mišićima DMD bolesnika nakon intramuskularne primjene eteplirsena, a tom potvrdom pokrenula su se i istraživanja sisteme primjene eteplirsena (113). U fazi I/II istraživanja 19 ispitanika je primalo različite doze eteplirsena u tjednim intravenskim infuzijama kroz 3 mjeseca. Metodom RT-PCR je primijećeno preskakanja egzona 51 kod svih ispitanika. 37% ispitanika, većinom iz kohorti s najvećim dozama od 10 i 20 mg/kg, imalo je povećanu ekspresiju distrofina, u odnosu na biopsije prije terapije. Ekspresija  $\alpha$ -sarkoglikana i neuronalne sintaze dušikovog oksida (NOS – engl. *nitric oxide synthase*) te smanjenje upalnih infiltrata potvrdili su funkcionalnost obnovljenog distrofina. Obzirom je period primanja eteplirsena bio samo 12 tjedana, nije uočen značajan klinički napredak (114).

Stoga je uslijedilo istraživanje faze II u kojem je sudjelovalo 12 pacijenata koji su bili randomizirani u tri skupine koje su intravenski dobivale tjednu dozu eteplirsena od 30 mg/kg, 50 mg/kg ili placebo kroz duže razdoblje. Nakon 24 tjedna i placebo skupina je započela terapiju eteplirsenom. Pacijenti su bili 7-13 godina i s dokazanom delecijom podložnom terapiji preskakanjem egzona 51. Također, bili su u mogućnosti hodati od 200 do 400 m u 6MWT. Produkcija distrofina, tj. postotak distrofin-pozitivnih vlakana, mjerila se s 12 tjedana u kohorti koja je primala 50 mg/kg, 24 tjedna u kohorti s 30 mg/kg te 48 tjedana kod svih ispitanika (115). Slično prethodnim rezultatima (114), pokazano je kako je potrebno najmanje 12 tjedana da bi nastalo uočljivo povećanje u produkciji distrofina (115). McDonald i suradnici su opisali kako povećanjem dobi i visine kod DMD pacijenta ne raste dužina koraka, a naglo se smanjuje ritam hoda, što dovodi do slabijih rezultata u 6MWT te otežanog kretanja (116). Stoga su dvoje

blizanaca iz kohorte s 30 mg/kg, koji su vrlo brzo postali nepokretni, isključeni iz analize. Naime, bili su najviši te su imali gotovo 10 godina i loše početne rezultate u 6MWT, a što je prognostički za gubitak pokretnosti u DMD. Ostali, pokretni pacijenti, koji su kroz 48 tjedana primali eteplirsena, imali su razliku u 6MWT u odnosu na početne vrijednosti 67.3 m veću, nego placebo pacijenti koji su nakon 24 tjedna počeli primati eteplirsena. Dakle, može se zaključiti da duža primjena eteplirsena, omogućavajući preskakanje egzona 51, povećava funkcionalni distrofin, te dovodi do relativne stabilizacije hoda pacijenata s DMD (115). Kroz 3 godine praćenja ispitanika zabilježeno je statističko i klinički značajno smanjenje pada sposobnosti hoda i manji udio nepokretnih pacijenata u usporedbi s neliječenom kontrolom, kao i stabilizacija u testovima plućne funkcije (117).

### 3.2.3. Sigurnost

Tjedne intravenske infuzije eteplirsena do 20 mg/kg nisu bile popraćene neželjenim događajima vezanima uz terapiju tijekom 12 tjedana. Nisu uočena odstupanja u plućnoj, bubrežnoj, jetreoj ili hematološkoj funkciji. Kod jednog pacijenta terapija je prekinuta obzirom na pogoršanje kardiomiopatije zbog progresije DMD. Smanjenje upalnih infiltrata u mišićima te nedostatak antidistrofinskih protutijela, potvrđuju da obnovljeni distrofin ne izaziva imunološke reakcije (114). Također, eteplirsena zbog svog kemijskog sastava ima smanjenu imunogenost, a i općenito je sigurniji zbog svoje neutralnosti i biološke stabilnosti (118,119). Slična opažanja vrijedila su i za više tjedne doze od 30 ili 50 mg/kg koje su pacijenti primali dugotrajno. Poremećaj ravnoteže, povraćanje i kontaktni dermatitis javljali su se češće u eteplirsena skupini, nego u placebo skupini (120). U približno 3 godine terapije eteplirsenom, infuzije su bile dobro tolerirane, bez teških neželjenih događaja vezanih uz terapiju. Najčešći neželjeni događaji su bili glavobolje, bolovi vezani uz same procedure biopsija i postavljanja katetera te proteinurija. Proteinurija je prolazila spontano i nije bila povezana s bubrežnom toksičnošću. Niti jedan od neželjenih događaja nije uzrokovao prekid liječenja ili smrtni ishod (117).

### 3.2.4. Klinička primjena

Pacijenti bi trebali imati potvrđenu mutaciju na koju se terapijski može djelovati preskakanjem egzona 51, inače terapija neće imati učinak. Eteplirsena se prima putem intravenske infuzije svaki tjedan u preporučenoj dozi od 30 mg/kg. Razrijeđena otopina bi se trebala infundirati kroz 35-60 min (120).

## 4. POMPEOVA BOLEST

Pompeova bolest pogađa različite dobne skupine, a klinička slika se razlikuje u težini. Ipak, česta je podjela na dva osnovna tipa ovisno o vremenu pojave i kardiomiopatiji - klasični infantilni ili kasni tip Pompeove bolesti. Teži, infantilni oblik, prezentira se u dojenačkoj dobi s hipertrofičnom kardiomiopatijom i opstrukcijom na izlazu iz lijevog ventrikula, mišićnom slabosti te respiratornom insuficijencijom, a oboljeli često ne prežive godinu dana. Lakši, kasni oblik, razvija se kasnije, a osnovne značajke su slabost i gubitak mišića te posljedična nepokretnost i respiratorna insuficijencija (121). Osim fenotipski, Pompeova bolest razlikuje se i genotipski, dosad je opisano gotovo 600 mogućih mutacija. To je autosomno recesivna bolest u kojoj je mutiran GAA gen koji se nalazi na kromosomu 17q25.2-q25.3 (122). Više od polovice čine mutacije krivog smisla (*missense*), a slijede ih male delecije, varijante prekrajanja i besmislene mutacije (123). Mutacije dovode do potpune ili djelomične deficijencije enzima kisele alfa-glukozidaze (GAA – engl. *acid alpha-glucosidase*). GAA je lizosomski enzim koji razgrađuje glikogen do glukoze, cijepajući  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glukozidne veze. 1,4-veze povezuju glukozu u linearnim lancima, a 1,6-veze mjesta grananja. Zbog nedostatka enzima, glikogen se taloži u tkivu, posebice mišićnom, te se razvijaju simptomi Pompeove bolesti (124).

### 4.1. ALGLUKOZIDAZA ALFA

Alglukozidaza alfa je humana GAA dobivena iz stanične kulture rekombinantnom DNA tehnologijom - rhGAA (engl. *recombinant human GAA*). FDA je odobrila Lumizyme 24. svibnja 2010. za pacijente s kasnim oblikom Pompeove bolesti koji nemaju dokazanu srčanu hipertrofiju te koji su u dobi od osam godina ili stariji. Od 2014. je prošireno odobrenje za sve dobne skupine i tipove bolesti. Myozyme je odobrila FDA 28. travnja 2006. i EMA 28. ožujka 2006. za odrasle i pedijatrijske pacijente (125,126). Primjenjuje se u intravenskoj infuziji.

#### 4.1.1. Mehanizam djelovanja

Ideja o nadomještanju enzima u lizosomskim bolestima odlaganja krenula je od radova Neufeld i Fratatonija (127) koji su uočili da ukoliko se pomiješaju fibroblasti pacijenata koji boluju od Hurler i Hunter sindroma, uočava se normalan metabolizam mukopolisaharida. Dakle, stanice

koje nemaju genetski defekt za određeni lizosomski enzim, sintetiziraju enzim koji okolne stanice s defektom mogu preuzeti i koristiti. Ovaj princip danas se koristi i u liječenju Pompeove bolesti gdje se rhGAA dobivena u staničnoj kulturi unosi kao pacijentov izvor GAA. Zdrave stanice proizvode GAA koja se glikozilira i fosforilira te time dobiva manoza-6-fosfat koji se veže za lizosomske receptore ili, ukoliko je enzim izlučen, za receptore na staničnoj površini (128). Terapijska rhGAA je egzogeni prekursor koji, također, sadrži manoza-6-fosfat receptor čijim posredstvom može ući u stanicu te ciljano do lizosoma stanica u kojima nedostaje. Ovakva postranslacijska modifikacija karakteristična je za stanice sisavaca (129), a omogućava da egzogena rhGAA nadomjesti endogeni nedostatak GAA i omogući razgradnju glikogena.

#### 4.1.2. Klinička istraživanja

Početakom 1999., kod četiri dojenčeta s uznapredovalim infantilnim oblikom Pompeove bolesti primijenila se rhGAA iz mlijeka transgeničnih zečeva u tjednoj dozi od 15 do 40 mg/kg. Nakon 12 tjedana intravenske terapije smanjila se veličina srca kod svih ispitanika te poboljšanjem srčane funkcije produžio život ispitanika. Motorički odgovor varirao je među ispitanicima, a dojenčad koja je počela primati terapiju rhGAA prije 3 mjeseca starosti, imala je najveći napredak, što ukazuje na nužnost ranog početka liječenja (130). Svi pacijenti su doživjeli dob od barem četiri godine (131), dok je od 6 do 8 mjeseci medijan dobi koju dožive pacijenti s infantilnim oblikom Pompeove bolesti bez enzimske zamjenske terapije (132).

Kishnani i suradnici u istraživanju su koristili rhGAA iz CHO (engl. *Chinese hamster ovary*) staničnih kultura. Uključili su 8 ispitanika, s GAA aktivnosti manjom od 1% normalne, kardiomiopatijom i hipotonijom. Nakon 52 tjedna terapije rhGAA, 75% (6/8) ispitanika je bilo živo, a samo jedan od njih je bio ovisan o invazivnoj ventilacijskoj potpori. Smanjenje srčane hipertrofije bilo je primijećeno u svih pacijenata neovisno o stadiju bolesti. Većina ispitanika je pokazala napredak u motornom razvoju, a troje s najvećim rezultatom AIMS (Alberta Infant Motor Scale) skale je čak moglo samostalno hodati. Očekivano slabiji ili nemjerljiv motorički odgovor imali su ispitanici koji su započeli liječenje rhGAA u naprednom stadiju bolesti. Preživjeli ispitanici su ukupno praćeni 153 tjedna te su pokazivali daljnje smanjenje srčane hipertrofije, napredak u rastu, motoričkom te mentalnom razvoju. Tijekom praćenja, većina ispitanika je preminula od respiratorne insuficijencije, a dvoje preživjelih je bilo starije od 3 godine i mogli su se penjati i spuštati stepenicama, udarati loptu ili čak voziti tricikl (133). Iako enzimska zamjenska terapija rhGAA povećava preživljenje bez invazivne ventilacije i

omogućava oboljelima inače rijetko dostižna motorička dostignuća, enzimska terapija i dalje ne dovodi do izlječenja te su komplikacije bolesti i dalje značajan uzrok mortaliteta oboljelih. Na temelju ranih kliničkih istraživanja, 18 pacijenata u dobi do 26 tjedana, s hipertrofičnom kardiomiopatijom te neovisno o ventilacijskoj potpori, uključeno je u fazu II/III međunarodnog istraživanja u kojem se uspoređivao učinak rhGAA u odnosu na povijesnu kohortu pacijenata koji nisu primili enzimsku terapiju. Polovica ispitanika je bila liječena intravenskom infuzijom rhGAA u dozi 20 mg/kg, a polovica 40 mg/kg svaki drugi tjedan kroz 52 tjedna, a zatim u dužem praćenju do tri godine trajanja terapije (134,135). Smanjeni rizik za smrtni ishod za 95% te rizik za invazivnu ventilaciju ili smrt za 91%, smanjena ili u normalnom rasponu masa lijevog ventrikula te određeni napredak u motoričkom razvoju pokazan je u kohorti liječenih rhGAA, u odnosu na kontrolu (135). Nešto slabiji rezultati zabilježeni su u ispitanika s nastupom simptoma do 12 mjeseci, a koji su rhGAA počeli primati u dobi od 6 do 36 mjeseci, te koji su se u istraživanje mogli uključiti iako su bili ovisni o invazivnoj ventilacijskoj potpori (136). Pretpostavlja se da CRIM-status (engl. *cross-reacting immunologic material*) utječe na učinak terapije rhGAA. Ovisno o tome imaju li pacijenti potpuni ili djelomični nedostatak GAA, smatraju se CRIM-negativnim, kod kojih se očekuje i veći razvoj protutijela, ili CRIM-positivnim. U analizi Kishnanija i suradnika čak više od polovice CRIM-negativnih pacijenata je preminulo ili bilo ovisno o invazivnoj ventilaciji nakon terapije alglukozidazom alfa, dok je samo manje od 5% (1/21) pacijenata bilo ovisno o invazivnoj ventilaciji u skupini CRIM-positivnih. Također, CRIM-negativni ispitanici su imali i slabiji motorički te srčani odgovor na terapiju (137). Poznato je da pacijenti s potpunim nedostatkom GAA u podlozi imaju teže mutacije (138), ali Kishnani i suradnici, obzirom na pad u kliničkom napretku u vrijeme pojave protutijela, predlažu i imunološki uzrok smanjenju učinkovitosti kod CRIM-negativnih pacijenata (137).

RhGAA kod većine pacijenata s infantilnim tipom Pompeove bolesti značajno utječe na srčani mišić te ublažava kardiomiopatiju, a manje pacijenata će razviti značajan motorički odgovor. Ipak, moguće je postići stupanj motoričkog razvoja veći od očekivanog za prirodni tijek bolesti. Da bi terapija bila učinkovita bitno ju je započeti što ranije, a prognoza ovisi i o imunosnom statusu. Zahvaljujući boljem srčanom i respiratornom statusu produljeno je i preživljenje bez invazivne ventilacije. Usprkos tomu, rhGAA ne dovodi do izlječenja te su morbiditet i mortalitet vezano uz progresiju Pompeove bolesti i dalje značajni, a liječenjem je i promijenjen fenotip bolesti. Nedostatak liječenja alglukozidazom alfa je što ne prolazi krvno moždanu barijeru te je tako i dalje omogućeno odlaganje glikogena u središnji živčani sustav. U dugotrajnom praćenju pacijenata s infantilnim oblikom bolesti, a koji su na terapiji

algukozidazom alfa, zamijećeno je da se kroz godine razvijaju progresivne promjene u bijeloj tvari mozga, a što se može vjerojatno povezati i s odstupanjima u inteligenciji, održavanju pažnje, pamćenju i ponašanju (139).

Nakon prve uspješne primjene kod dojenčadi s infantilnim oblikom bolesti, uslijedilo je i pilot istraživanje primjene rhGAA iz zečjeg mlijeka na oboljelima od kasnog oblika Pompeove bolesti. Pacijenti u dobi od 16, 32 i 11 godina te različitim stadijima bolesti praćeni su kroz 3 godine. Kod pacijenta s najboljim odgovorom došlo je do normalizacije mišićne funkcije i snage te se mogao kretati bez invalidskih kolica, dok je kod ostalih s razvijenijom bolešću smanjen umor, poboljšana kvaliteta života i smanjena potreba za dnevnom ventilacijom (140). Rossi i suradnici (141) koristili su veće doze rhGAA, u odnosu na prethodne, iz CHO stanica, te su prvi opisali slučaj pacijenta s Pompeovom bolešću koji je tijekom liječenja postao neovisan o ventilacijskoj potpori, naglašavajući da do respiratornog i mišićnog poboljšanja dolazi samo ukoliko se rhGAA primijeni prije opsežnog mišićnog oštećenja. Kod pacijenta s uznapredovalim stupnjem bolesti terapija nije pokazala učinak te je došlo do smrtnog ishoda (141).

U fazi III kontroliranog istraživanja GAA, 90 pacijenata s kasnom Pompeovom bolesti je bilo randomizirano u skupinu koja je primala 20 mg/kg intravenski GAA, svaki drugi tjedan kroz 78 tjedana, te placebo grupu. Pacijenti su bili 10-70 godina, pokretni te nisu bili na invazivnoj ventilaciji. Primarni ishodi kojima se procjenjivala učinkovitost su bili udaljenost prehodana u 6MWT te postotak predviđenog FVC. Skupina koja je primala rhGAA imala je povećanje parametra primarnih ishoda, dok su oni s vremenom padali u placebo tretiranoj skupini. Iako su ispitanici s početnim 6MWT od najmanje 300 m te 55% predviđenog FVC imali bolje rezultate, nisu bili dokazani prognostički faktori (142). Obzirom se pretpostavlja da je mišićna patologija samo djelomično reverzibilna usprkos dugotrajnom liječenju, u produženom istraživanju do ukupno dvije godine ispitanici su održali postignuta poboljšanja bez većih napredaka (143). No, uzevši u obzir pad u 6MWT i FVC u neliječenih, kao i to da nakon 10-15 godina od postavljanja dijagnoze približno polovica pacijenata s kasnim oblikom bolesti ovisi o kolicima ili ventilacijskoj potpori (144), stabilizacija motoričke i respiratorne funkcije ima terapijsku važnost u ovoj progresivnoj bolesti.

#### 4.1.3. Sigurnost

Približno polovica pacijenata s infantilnim oblikom i 28% s kasnijim oblikom bolesti razvija neželjene reakcije vezane uz infuziju rhGAA (125). U dojenčadi su nastupale prilikom primanja



infuzije ili unutar nekoliko sati, a većinom su bile blage do umjerene i prestajale na usporenje infuzije. Najčešće nuspojave su bile osip, urtikarija, vrućica i pad saturacije kisikom, a vrlo česti su bili i tahikardija, tahipneja, kašalj i povraćanje (134–136). Najčešće neželjene reakcije u starijih pacijenata su bile padovi, glavobolja i nazofaringitis, ali su se javljali i kod pacijenata koji nisu primali rhGAA. Jedinstveno za infuziju rhGAA, 5-8% pacijenata imalo je anafilaktičke i alergijske reakcije vezano za infuziju poput urtikarije, crvenila, hiperhidroze, pritiska u prsima, povraćanja i povišenog krvnog tlaka. U nekim reakcijama bila su razvijena IgE protutijela na rhGAA te su se manifestirale simptomima respiratornog ili kožnog sustava i teškim edemom jezika, a uspješno se primijenila desenzitizacija pod kliničkim nadzorom (142,143). Mali broj pacijenata (manje od 1%) u kliničkim istraživanjima i komercijalnoj upotrebi razvije anafilaktički šok ili srčani arest nedugo nakon započinjanja infuzije. Pacijenti s uznapredovalom Pompeovom bolešću imaju rizik za teže nuspojave obzirom na razvijene srčane i respiratorne komplikacije bolesti. Titar IgG protutijela bi trebao biti redovito kontroliran, a kod pacijenata s visokim titrom IgG trebalo bi raditi periodične analize urina jer je nefrotski sindrom moguća imunosno-posredovana reakcija (125).

#### 4.1.4. Klinička primjena

Alglukozidaza alfa se koristi putem intravenske infuzije u dozi od 20 mg/kg svaki drugi tjedan (125). Ukoliko pacijenti imaju bolest nalik gripi (kombinacija vrućice, zimice, bolova u mišićno-koštanom sustavu, slabost) kao ponavljajuću reakciju na infuziju, prilikom ponovne terapije mogu se koristiti manje doze ili prethodno terapiji primijeniti protuupalni lijekovi ili kortikosteroidi. Pacijente s umjerenim i teškim reakcijama vezanim uz infuziju može se testirati na specifična protutijela na alglukozidazu alfa. Obzirom da se povezuje uz teške infuzijske reakcije, potrebno je imati dostupnu kardiopulmonalnu resuscitacijsku opremu, a pacijente je potrebno pratiti. Blage i prolazne reakcije ponekad ne zahtijevaju medicinsku intervenciju ili prekid infuzije, a većina reakcija može se tretirati smanjenjem brzine ili privremenim zaustavljanjem infuzije te prethodnom terapijom oralnim antihistaminikom, antipireticima ili kortikosteroidima (125). Kod CRIM-negativnih pacijenata pozitivan klinički učinak pokazuje profilaktička primjena režima za indukciju imunosne tolerancije. Primjerice, režim s rituksimabom, metotreksatom i intravenskim imunoglobulinima smanjuje titar protutijela, rizik od smrtnog ishoda ili invazivne ventilacije kod CRIM-negativnih pacijenata, ali su moguće infekcije zbog imunosupresije (145).

## 5. GENSKA TERAPIJA OSTALIH NEUROMUSKULARNIH BOLESTI U FAZI KLINIČKIH ISTRAŽIVANJA

Pojasnim mišićnim distrofijama (LGMD – engl. *limb girdle muscular dystrophy*) se smatraju neuromuskularne bolesti koje dovode do progresivne slabosti mišića u zdjeličnom i ramenom obuču (146). Pojasne mišićne distrofije tip 2C, 2D, 2E i 2F su recesivni poremećaji u kodiranju jednog od četiri sarkoglikana ( $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\delta$ -sarkoglikan) čija je svrha stabiliziranje veze distrofina s  $\alpha$ - i  $\beta$ -distroglikanom u sklopu DGC (147). Pojasna mišićna distrofija tip 2E (LGMD2E) nastaje mutacijom gena za  $\beta$ -sarkoglikan (SGCB gen) koji se nalazi na kromosomu 4q11 i uzrokuje poremećaj spomenutog sarkoglikanskog tetramera (148). U svrhu liječenja ovog poremećaja istražuje se genska terapija kojom se dostavlja funkcionalna kopija humanog SGCB gena i ispravlja temeljni poremećaj u LGMD2E. Istraživanje lijeka SRP-9003 je u fazi I/II, ispituje unos humanog SGCB gena putem virusa AAVrh74, a uz pomoć MHCK7, promotora koji kontrolira aktivnost gena specifično u mišićnim stanicama (149). LGMD2D nastaje mutacijom gena za  $\alpha$ -sarkoglikan (SGCA gen) na kromosomu 17q21.33, a LGMD2C mutacijom gena za  $\gamma$ -sarkoglikan (SGCG gen) na 13q12.12 (148). Genska terapija za ove poremećaje prošla je kroz faze I lokalne primjene (150,151). U LGMD2D, terapija SRP-9004, ispitala se primjenom intramuskularne injekcije AAV1 virusa sa SGCA genom pod kontrolom skraćenog mišićnog MCK promotora (engl. *muscle creatine kinase promoter*) (151,152). Iako je dokazan koncept, za klinički značajne ishode bilo je potrebno primijeniti gensku terapiju intravaskularno kako bi djelovala na brojne mišićne skupine. Tako je u fazi I/II, preuzevši ideju infuzije s primjenom u udove u kemoterapiji tumora ograničenih na donji ud (153), perkutanom pristupom femoralnoj arteriji dostavljen gen u donje oslabljene udove, no to se nije pokazalo u potpunosti učinkovitim (154).

Miotonična distrofija tip 1 (DM1) je neuromuskularna bolest s velikim fenotipskim rasponom, od letalnih posljedica u dojenčadi, do degenerativnih poremećaja s nastupom u odrasloj dobi, a zahvaća brojna tkiva, kao što su skeletni i srčani mišić, mozak, oko ili endokrini sustav (155). DM1 uzrokuje ekspanzija CTG ponavljanja u genu za distrofijsku protein kinazu – DMPK (engl. *myotonic dystrophy protein kinase*) na kromosomu 19q13.3 (156). Mutirana mRNA s CUG ponavljanjima stabilnija je i akumulira se u oboljelim stanicama. Također, utječe na proteine s djelovanjem na translaciju, prekrajanje i stabilnost RNA. Tideglusib, koji se istražuje

kao mogućnost liječenja, je inhibitor glikogen sintaza kinaze 3 (GSK3 - engl. *glycogen synthase kinase 3*). Tako Tideglusib djeluje na aktivnost proteina uključenih u metabolizam RNA te smanjuje količinu mutirane DMPK mRNA (157). Ispitivala se primjena kod adolescenata i odraslih pacijenata (13-34 godine), oboljelih od kongenitalne ili u djetinjstvu razvijene DM1. Obzirom na pozitivne rezultate faze II (158), istraživanja su ušla u fazu II/III te se u placebom kontrolirano istraživanje uključuju pacijenti starosti od 6 do 16 godina s dijagnosticiranom kongenitalnom DM1 (159).

X-vezana miotubularna miopatija (XLMTM) je uzrokovana mutacijama u MTM1 genu za protein miotubularin. Miotubularin je važan za održavanje strukture i funkciju stanica skeletnih mišića (160). Oboljela muška dojenčad je najčešće hipotona i s mišićnom slabosti te zbog respiratorne insuficijencije ovisna o umjetnoj ventilaciji (161). Prva genska terapija u kliničkim istraživanjima je intravenska terapija resamirigene bilparvovec (AT132). Radi se o genskoj terapiji u kojoj se funkcionalni humani MTM1 gen unosi putem AAV8 vektora, a istraživanje je trenutačno u fazi I/II (162). U fazi I/II ispituje se i primjena ASO u pacijenata s mutacijama DNM2 ili MTM1 (163).

## 6. ZAKLJUČAK

Iako su saznanja o naslijeđenim neuromuskularnim bolestima u posljednjih nekoliko desetljeća proširena, neuromuskularne bolesti su i dalje uzrokom značajnog morbiditeta i mortaliteta oboljelih pacijenata. Sveobuhvatnu osnovu liječenja predstavlja primjena standarda zbrinjavanja unutar multidisciplinarnog tima, a za nekoliko bolesti su odobrene i terapije koje djeluju mijenjajući sami tijek bolesti. Odobrene su terapije koje mijenjaju gensku ekspresiju za DMD i SMA, genska terapija za SMA te enzimska zamjenska terapija u Pompeovoj bolesti. Unatoč rastućem broju novih terapija, koje su pospješile preživljenje, izlječenje neuromuskularnih bolesti, posebice SMA, za sada još uvijek nije moguće. Također, osim i dalje nedostižnog cilja izlječenja ovih bolesti, s novim terapijama postavlja se i pitanje ranog probira, populacije koja će primiti pojedinu terapiju, dostupnosti, neželjenih učinaka vezano uz samu terapiju, ali i promijenjeni fenotip dugotrajno liječenih pacijenata. U tijeku su brojna pretklinička i klinička istraživanja te se nastavlja tragati za unaprjeđenjem postojećih i razvitkom novih terapijskih mogućnosti kako bi se pacijentima s neuromuskularnim bolestima omogućio što duži i kvalitetniji život.

## 7. ZAHVALE

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Nini Barišić, na znanju i usmjeravanju prilikom izrade ovog rada, kao i strpljenju i vremenu uloženom za moje nedoumice.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na velikoj ljubavi i podršci koju su mi pružili.

## 8. LITERATURA

1. Dowling JJ, D Gonorazky H, Cohn RD, Campbell C. Treating pediatric neuromuscular disorders: The future is now. *Am J Med Genet Part A*. 2018;176(4):804-41. doi: 10.1002/ajmg.a.38418
2. Bonne G, Rivier F, Hamroun D. The 2018 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord*. 2017;27(12):1152–83. doi: 10.1016/j.nmd.2017.10.005
3. Korinthenberg R. Neuromuscular disorders in children and adolescents. *Neuropediatrics*. 2017; 48(4):209–10. doi: 10.1055/s-0037-1603980
4. Ryder-Cook AS, Sicinskil P, Thomas K, Davies KE, Worton RG, Barnard EA, i sur. Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. *EMBO J*. 1988;7(10):3017-21.
5. Ricci F, Vacchetti M, Brusa C, Vercelli L, Davico C, Vitiello B, i sur. New pharmacotherapies for genetic neuromuscular disorders: opportunities and challenges. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2019; 12(8):757–70. doi: 10.1080/17512433.2019.1634543
6. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:71. doi: 10.1186/1750-1172-6-71
7. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy. *Neurol Clin*. 2015;33(4):831-46. doi: 10.1016/j.ncl.2015.07.004
8. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat*. 2000;15(3):228-37. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(200003)15:3<228::AID-HUMU3>3.0.CO;2-9
9. Chaytow H, Huang YT, Gillingwater TH, Faller KME. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(21):3877-3894. doi: 10.1007/s00018-018-2849-1
10. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); c2021. FDA approves first drug for spinal muscular atrophy; 2016 Dec 23 [ažurirano 28.03.2018.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-spinal-muscular-atrophy>
11. European Medicines Agency (EMA) [Internet]. Amsterdam (NL): European Medicines Agency; c1995-2021. Spinraza; [ažurirano 22.02.2021.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza>
12. Rigo F, Hua Y, Chun SJ, Prakash TP, Krainer AR, Bennett CF. Synthetic oligonucleotides recruit ILF2/3 to RNA transcripts to modulate splicing. *Nat Chem Biol*. 2012;8(6):555-61. doi: 10.1038/nchembio.939

13. Li Q. Nusinersen as a therapeutic agent for spinal muscular atrophy. *Yonsei Med J.* 2020;61(4):273-283. doi: 10.3349/ymj.2020.61.4.273
14. Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet.* 2008;82(4):834-48. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.01.014
15. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 2010;24(15):1634-44. doi: 10.1101/gad.1941310
16. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN Rx ) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2016;86(10):890-7. doi: 10.1212/WNL.0000000000002445
17. Darras BT, Chiriboga CA, Iannaccone ST, Swoboda KJ, 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):e2492-506. doi: 10.1212/WNL.0000000000007527
18. O'Hagen JM, Glanzman AM, McDermott MP, Ryan PA, Flickinger J, Quigley J, et al. An expanded version of the Hammersmith Functional Motor Scale for SMA II and III patients. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(9-10):693-7. doi: 10.1016/j.nmd.2007.05.009
19. Mazzone E, Bianco F, Martinelli D, Glanzman AM, Messina S, Sanctis R De, et al. Assessing upper limb function in nonambulant SMA patients: development of a new module. *Neuromuscul Disord.* 2011;21(6):406-12. doi: 10.1016/j.nmd.2011.02.014
20. Montes J, McDermott MMP, Martens WB, Dunaway S, Glanzman DAM, Riley DS, et al. Six-Minute Walk Test demonstrates motor fatigue in spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2010;74(10):833-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181d3e308
21. Lewelt A, Krosschell KJ, Scott C, Sakonju A, Kissel JT, Crawford TO, et al. Compound muscle action potential and motor function in children with spinal muscular atrophy. *Muscle and Nerve.* 2010;42(5):703-8. doi: 10.1002/mus.21838
22. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet.* 2016;388(10063):3017-26. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31408-8
23. Haataja L, Mercuri E, Regev R, Cowan F, Rutherford M, Dubowitz V, et al. Optimality score for the neurologic examination of the infant at 12 and 18 months of age. *J Pediatr.* 1999;135(2). 153-61. doi: 10.1016/s0022-3476(99)70016-8
24. Glanzman AM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJ, et al. The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): test development and reliability. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(3):155-61. doi: 10.1016/j.nmd.2009.11.014

25. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, i sur. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1723–32. doi: 10.1056/NEJMoa1702752
26. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier NCT02594124, A Study for Participants With Spinal Muscular Atrophy (SMA) Who Previously Participated in Nusinersen (ISIS 396443) Investigational Studies. (SHINE); 2015 Oct 30 [citirano 24.04.2021.]; Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02594124>
27. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, i sur. Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2018;378(7):625–35. doi: 10.1056/NEJMoa1710504
28. De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu WL, Crawford TO, Finkel RS, i sur. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: interim efficacy and safety results from the phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord.* 2019;29(11):842–56. doi: 10.1016/j.nmd.2019.09.007
29. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier: NCT04089566, Study of Nusinersen (BIIB058) in Participants With Spinal Muscular Atrophy (DEVOTE); 2019 Sept 11 [citirano 24.04.2021.]; Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04089566>
30. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier NCT04488133, A Study of Nusinersen Among Participants With Spinal Muscular Atrophy Who Received Onasemnogene Apeparvovec (RESPOND); 2020 Jul 20 [citirano 24.04.2021.]; Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04488133>
31. Bonadio W. Pediatric lumbar puncture and cerebrospinal fluid analysis. *J Emerg Med.* 2014;46(1):141-50. doi: 10.1016/j.jemermed.2013.08.056
32. Kiechl-Kohlendorfer U, Unsinn KM, Schlenck B, Trawöger R, Gassner I. Cerebrospinal fluid leakage after lumbar puncture in neonates: incidence and sonographic appearance. *AJR Am J Roentgenol.* 2003;181(1):231-4. doi: 10.2214/ajr.181.1.1810231
33. Ebinger F, Kosel C, Pietz J, Rating D. Headache and backache after lumbar puncture in children and adolescents: a prospective study. *Pediatrics.* 2004;113(6):1588-92. doi: 10.1542/peds.113.6.1588
34. Lowery S, Oliver A. Incidence of postdural puncture headache and backache following diagnostic/therapeutic lumbar puncture using a 22G cutting spinal needle, and after introduction of a 25G pencil point spinal needle. *Paediatr Anaesth.* 2008;18(3):230–4. doi: 10.1111/j.1460-9592.2008.02414.x
35. Haché M, Swoboda KJ, Sethna N, Farrow-Gillespie A, Khandji A, Xia S, i sur. Intrathecal injections in children with spinal muscular atrophy: nusinersen clinical trial experience. *J Child Neurol.* 2016;31(7):899–906. doi: 10.1177/0883073815627882



36. Ljungman G, Gordh T, Sörensen S, Kreuger A. Lumbar puncture in pediatric oncology: conscious sedation vs. general anesthesia. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36(3):372-9. doi: 10.1002/mpo.1088
37. Howard SC. Risk factors for traumatic and bloody lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA.* 2002;288(16):2001-7. doi: 10.1001/jama.288.16.2001
38. Nigrovic LE, Kuppermann N, Neuman MI. Risk factors for traumatic or unsuccessful lumbar punctures in children. *Ann Emerg Med.* lipanj 2007;49(6):762-71. doi: 10.1016/j.annemergmed.2006
39. Pechmann A, Langer T, Wider S, Kirschner J. Single-center experience with intrathecal administration of nusinersen in children with spinal muscular atrophy type 1. *Eur J Paediatr Neurol.* 2018;22(1):122–7. doi: 10.1016/j.ejpn.2017.11.001
40. Spinraza (nusinersen) injection for intrathecal use [uputa o lijeku na internetu]. Cambridge (MA): Biogen, 2016 [citirano 30.04.2021.]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/2095311bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/2095311bl.pdf)
41. CADTH Common Drug Review. Clinical Review Report (Resubmission): Nusinersen (Spinraza) [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. 2019 Apr - [pristupljeno 30.04.2021.]. Dostupno na: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542379/pdf/Bookshelf\\_NBK542379.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542379/pdf/Bookshelf_NBK542379.pdf)
42. Zolgensma (onasemnogene abeparvovec) solution for infusion [uputa o lijeku na internetu]. Bannockburn (IL): AveXis, 2019 [citirano 30.04.2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/media/126109/download>
43. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); c2021. FDA approves innovative gene therapy to treat pediatric patients with spinal muscular atrophy, a rare disease and leading genetic cause of infant mortality; 2019 May 24 [ažurirano 24.05.2019.; pristupljeno 30.04.2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-rare-disease>
44. European Medicines Agency (EMA) [Internet]. Amsterdam (NL): European Medicines Agency; c1995-2021. Zolgensma; [ažurirano 19.04.2021.; pristupljeno 30.04.2021.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zolgensma>
45. Berns KI, Giraud C. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;218:1-23. doi: 10.1007/978-3-642-80207-2\_1
46. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Franç Oise Montus M, i sur. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther.* 2010;21(6):704-12. doi: 10.1089/hum.2009.182
47. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs.* 2017;31(4):317-34. doi: 10.1007/s40259-017-0234-5

48. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(5):358-78. doi: 10.1038/s41573-019-0012-9
49. McCarty D, Monahan P, Samulski R. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 2001.;8(16):1248-54. doi: 10.1038/sj.gt.3301514
50. Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudas L, Zhang Y, et al. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol.* 1998;72(11):8568-77. doi: 10.1128/JVI.72.11.8568-8577
51. Athanasopoulos T, Munye MM, Yáñez-Muñoz RJ. Nonintegrating gene therapy vectors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(5):753-70. doi: 10.1016/j.hoc.2017.06.007
52. Al-Zaidy SA, Mendell JR. From clinical trials to clinical practice: practical considerations for gene replacement therapy in SMA type 1. *Pediatr Neurol.* 2019;100:3-11. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.06.007
53. Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, et al. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol.* 2010;28(3):271-4. doi: 10.1038/nbt.1610
54. Hamilton G, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. *Trends Mol Med.* 2013 Jan;19(1):40-50. doi: 10.1016/j.molmed.2012.11.002
55. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1713-22. doi: 10.1056/NEJMoa1706198
56. Finkel RS, McDermott MP, Kaufmann P, Darras BT, Chung WK, Sproule DM, et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology.* 2014;83(9):810-7. doi: 10.1212/WNL.0000000000000741
57. Kolb SJ, Coffey CS, Yankey JW, Krosschell K, Arnold WD, Rutkove SB, et al. Baseline results of the NeuroNEXT spinal muscular atrophy infant biomarker study. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3(2):132-45. doi: 10.1002/acn3.283
58. De Sanctis R, Coratti G, Pasternak A, Montes J, Pane M, Mazzone ES, et al. Developmental milestones in type I spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2016;26(11):754-9. doi: 10.1016/j.nmd.2016.10.002
59. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Lehman KJ, McColly M, Lowes LP, Alfano LN, et al. Five-year extension results of the phase 1 START trial of onasemnogene abeparvovec in spinal muscular atrophy. *JAMA Neurol [Internet].* 2021 May 17 [pristupljeno 24.04.2021.];e211272. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33999158/>
60. Lowes LP, Alfano LN, Arnold WD, Shell R, Prior TW, McColly M, et al. Impact of age and motor function in a phase 1/2A study of infants with SMA type 1 receiving single-dose

gene replacement therapy. *Pediatr Neurol.* 2019;98:39–45. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.05.005

61. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier: NCT03306277, Gene Replacement Therapy Clinical Trial for Participants With Spinal Muscular Atrophy Type 1 (STRIVE); 2017 Oct 2 [citirano 23.04.2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03306277>

62. Finkel RS, Day JW, Darras BT, Kuntz NL, Connolly AM, Crawford TO, i sur. Intrathecal administration of onasemnogene abeparvovec gene-replacement therapy (GRT) for spinal muscular atrophy type 2 (SMA2): phase 1/2a study (STRONG). *Neuromuscul Disord.* 2019;29(Suppl 1):S207

63. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier NCT03505099, Pre-Symptomatic Study of Intravenous Onasemnogene Abeparvovec-xioi in Spinal Muscular Atrophy (SMA) for Patients With Multiple Copies of SMN2 (SPRINT); 2018 Apr 13 [citirano 23.04.2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03505099>

64. Chand D, Mohr F, McMillan H, Tukov FF, Montgomery K, Kleyn A, i sur. Hepatotoxicity following administration of onasemnogene abeparvovec (AVXS-101) for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Hepatol.* 2021;74(3):560–6. doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.001

65. Zolkipli Z, Sherlock M, Biggar WD, Taylor G, Hutchison JS, Peliowski A, i sur. Abnormal fatty acid metabolism in spinal muscular atrophy may predispose to perioperative risks. *Eur J Paediatr Neurol.* 2012;16(5):549–53. doi: 10.1016/j.ejpn.2012.01.004

66. Brehm TT, Wehmeyer MH, Fuhrmann V, Schäfer H, Kluwe J. Severe acute liver injury following therapeutic doses of acetaminophen in a patient with spinal muscular atrophy. *Am J Ther.* 2019;26(4):e528-e529. doi: 10.1097/MJT.0000000000000829

67. Colella P, Ronzitti G, Mingozi F. Emerging issues in AAV-mediated in vivo gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;8:87-104. doi: 10.1016/j.omtm.2017.11.007

68. Friese J, Geitmann S, Holzwarth D, Müller N, Sassen R, Baur U, i sur. Safety monitoring of gene therapy for spinal muscular atrophy with onasemnogene abeparvovec – a single centre experience. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(2):209-16. doi: 10.3233/JND-200593

69. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); c2021. FDA Approves Oral Treatment for Spinal Muscular Atrophy; 2020 Aug 7 [ažurirano 07.08.2020.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-oral-treatment-spinal-muscular-atrophy>

70. European Medicines Agency (EMA) [Internet]. Amsterdam (NL): European Medicines Agency; c1995-2021. Evrysdi; [ažurirano 04.05.2021.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/evrysdi>

71. Wang J, Schultz PG, Johnson KA. Mechanistic studies of a small-molecule modulator of SMN2 splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(20):E4604–12. doi: 10.1073/pnas.1800260115
72. Sivaramakrishnan M, McCarthy KD, Campagne S, Huber S, Meier S, Augustin A, i sur. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. *Nat Commun*. 2017;8(1):1476. doi: 10.1038/s41467-017-01559-4
73. Poirier A, Weetall M, Heinig K, Bucheli F, Schoenlein K, Alsenz J, i sur. Risdiplam distributes and increases SMN protein in both the central nervous system and peripheral organs. *Pharmacol Res Perspect*. 2018;6(6):e00447. doi: 10.1002/prp2.44
74. Baranello G, Darras BT, Day JW, Deconinck N, Klein A, Masson R, i sur. Risdiplam in type 1 spinal muscular atrophy. *N Engl J Med*. 2021;384(10):915-23. doi: 10.1056/NEJMoa2009965
75. Albers CA, Grieve AJ. Test Review: Bayley, N. (2006). Bayley Scales of Infant and Toddler Development – Third Edition. *J Psychoeduc Assess*. 2007;25(2):180-90. doi:10.1177/0734282906297199
76. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier: NCT02908685, A Study to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of Risdiplam (RO7034067) in Type 2 and 3 Spinal Muscular Atrophy (SMA) Participants (SUNFISH); 2016 Sept 19 [citirano 24.04.2021.]. Dostupno na: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02908685>
77. Trundell D, Le Scouiller S, Le Goff L, Gorni K, Vuillerot C. Assessment of the validity and reliability of the 32-item Motor Function Measure in individuals with type 2 or non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238786. doi: 10.1371/journal.pone.0238786
78. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier: NCT03032172, A Study of Risdiplam (RO7034067) in Adult and Pediatric Participants With Spinal Muscular Atrophy (Jewelfish); 2017 Jan 24 [citirano 24.04.2021.]. Dostupno na: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03032172>
79. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier: NCT03779334, A Study of Risdiplam in Infants With Genetically Diagnosed and Presymptomatic Spinal Muscular Atrophy (Rainbowfish); 2018 Dec 17 [citirano 24.04.2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03779334>
80. Evrysdi (risdiplam) for oral solution [uputa o lijeku na internetu]. South San Francisco (CA): Genentech, 2020 [citirano 30.04.2021.]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2020/213535s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/213535s000lbl.pdf)
81. Ratni H, Ebeling M, Baird J, Bendels S, Bylund J, Chen KS, i sur. Discovery of risdiplam, a selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifier for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). *J Med Chem*. 2018;61(15):6501–17. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00741

82. Sergott RC, Amorelli GM, Baranello G, Barreau E, Beres S, Kane S, i sur. Risdiplam treatment has not led to retinal toxicity in patients with spinal muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021;8(1):54–65. doi: 10.1002/acn3.51239
83. Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health.* 2015;(8):759-64. doi: 10.1111/jpc.12868
84. Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti PA, i sur. Delayed diagnosis in Duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr.* 2009;155(3):380-5. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.02.007
85. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002;359(9307):687-95. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7
86. Ferlini A, Neri M, Gualandi F. The medical genetics of dystrophinopathies: molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice. *Neuromuscul Disord.* 2013;23(1):4-14. doi: 10.1016/j.nmd.2012.09.002
87. Falzarano M, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy. *Molecules.* 2015;20(10):18168-84. doi: 10.3390/molecules201018168
88. Gao QQ, McNally EM. The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1223-39. doi: 10.1002/cphy.c140048
89. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(8):3710-4. doi: 10.1073/pnas.90.8.3710
90. European Medicines Agency (EMA) [Internet]. Amsterdam (NL): European Medicines Agency; c1995-2021. Translarna; [ažurirano 05.05.2021.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/translarna>
91. Laing NG, Davis MR, Bayley K, Fletcher S, Wilton SD. Molecular diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies. *Clin Biochem Rev.* 2011;32(3):129–34.
92. Siddiqui N, Sonenberg N. Proposing a mechanism of action for ataluren. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(44):12353-55. doi: 10.1073/pnas.161554811
93. Roy B, Friesen WJ, Tomizawa Y, Leszyk JD, Zhuo J, Johnson B, i sur. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(44):12508–13. doi: 10.1073/pnas.1605336113
94. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, i sur. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature.* 2007;447(7140):87–91. doi: 10.1038/nature05756
95. Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, i sur. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation

suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2007;47(4):430–44. doi: 10.1177/0091270006297140

96. Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, Bönnemann C, Sampson J, Sweeney HL, i sur. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2013;8(12):e81302. doi: 10.1371/journal.pone.0081302

97. Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, i sur. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle and Nerve.* 2014;50(4):477–87. doi: 10.1002/mus.24332

98. McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, Finkel RS, Flanigan KM, Goemans N, i sur. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390(10101):1489–98. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31611-2

99. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, i sur. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2014;2(7):539–47. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70100-6

100. Konstan MW, VanDevanter DR, Rowe SM, Wilschanski M, Kerem E, Sermet-Gaudelus I, i sur. Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: the international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF). *J Cyst Fibros.* 2020;19(4):595–601. doi: 10.1016/j.jcf.2020.01.007

101. Muntoni F, Desguerre I, Guglieri M, Osorio AN, Kirschner J, Tulinius M, i sur. Ataluren use in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy: patient demographics and characteristics from the STRIDE Registry. *J Comp Eff Res.* 2019;8(14):1187–200. doi: 10.2217/cer-2019-0086

102. Mercuri E, Muntoni F, Osorio AN, Tulinius M, Buccella F, Morgenroth LP, i sur. Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD Natural History Study. *J Comp Eff Res.* 2020;9(5):341–60. doi: 10.2217/cer-2019-0171

103. Wang L, Chen M, He R, Sun Y, Yang J, Xiao L, i sur. Serum creatinine distinguishes Duchenne muscular dystrophy from Becker muscular dystrophy in patients aged  $\leq 3$  years: a retrospective study. *Front Neurol.* 2017;8:196. doi: 10.3389/fneur.2017.00196

104. Landfeldt E, Sejersen T, Tulinius M. A mini-review and implementation model for using ataluren to treat nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *Acta Paediatr.* 2019;108(2):224–30. doi: 10.1111/apa.14568

105. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); c2021. FDA grants accelerated approval to first drug for Duchenne muscular dystrophy; 2016 Sep 19 [ažurirano 29.09.2016.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno

na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-first-drug-duchenne-muscular-dystrophy>

106. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); c2021. FDA grants accelerated approval to first targeted treatment for rare Duchenne muscular dystrophy mutation; 2019 Dec 12 [ažurirano 12.12.2016.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-first-targeted-treatment-rare-duchenne-muscular-dystrophy-mutation>

107. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); c2021. FDA Approves Targeted Treatment for Rare Duchenne Muscular Dystrophy Mutation; 2020 Aug 12 [ažurirano 12.08.2020.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-targeted-treatment-rare-duchenne-muscular-dystrophy-mutation>

108. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); c2021. FDA Approves Targeted Treatment for Rare Duchenne Muscular Dystrophy Mutation; 2021 Feb 25 [ažurirano 25.02.2021.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-targeted-treatment-rare-duchenne-muscular-dystrophy-mutation-0>

109. Kole R, Krieg AM. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;87:104-7. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.008

110. Le Rumeur E. Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015;15(3):14-20. doi: 10.17305/bjbms.2015.636

111. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, i sur. The TREAT-NMD DMD global database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* 2015;36(4):395-402. doi: 10.1002/humu.22758

112. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, i sur. In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther.* 2010;18(11):1995-2005. doi: 10.1038/mt.2010.186

113. Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C, i sur. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 2009;8(10):918-28. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70211-X

114. Arechavala-Gomez V, Feng L, Torelli S, Phd A, Sewry C, Morgan JE, i sur. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet.* 2011;378(9791):595-605. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60756-3

115. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP, i sur. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2013;74(5):637-47. doi: 10.1002/ana.23982

116. McDonald CM, Henricson EK, Han JJ, Abresch RT, Nicorici A, Elfring GL, i sur. The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*. 2010;41(4):500–10. doi: 10.1002/mus.21544
117. Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Shao J, i sur. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2016;79(2):257–71. doi: 10.1002/ana.24555
118. Moulton JD. Guide for morpholino users: toward therapeutics. *J Drug Discov Dev Deliv*. 2016;3(2):1023.
119. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997;7(3):187-95. doi: 10.1089/oli
120. Exondys 51 (eteplirsen) injection for intravenous use [uputa o lijeku na internetu]. Cambridge (MA): Sarepta Therapeutics, 2016 [citirano 30.04.2021.]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/206488lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/206488lbl.pdf)
121. Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe disease: From basic science to therapy. *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):928-942. doi: 10.1007/s13311-018-0655-y
122. Martiniuk F, Mehler M, Pellicer A, Tzall S, La Badie G, Hobart C, i sur. Isolation of a cDNA for human acid alpha-glucosidase and detection of genetic heterogeneity for mRNA in three alpha-glucosidase-deficient patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(24):9641-4. doi: 10.1073/pnas.83.24.9641
123. Peruzzo P, Pavan E, Dardis A. Molecular genetics of Pompe disease: a comprehensive overview. *Ann Transl Med*. 2019;7(13):278. doi: 10.21037/atm.2019.04.13
124. Taverna S, Cammarata G, Colomba P, Sciarrino S, Zizzo C, Francofonte D, i sur. Pompe disease: pathogenesis, molecular genetics and diagnosis. *Aging (Albany NY)*. 2020.;12(15):15856-74. doi: 10.18632/aging.103794
125. Myozyme (alglucosidase alfa) powder for concentrate for solution for infusion [uputa o lijeku na internetu]. Amsterdam (NL): Genzyme Europe B.V., 2006 [citirano 30.04.2021.]. Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/myozyme-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/myozyme-epar-product-information_en.pdf)
126. European Medicines Agency (EMA) [Internet]. Amsterdam (NL): European Medicines Agency; c1995-2021. Myozyme; [ažurirano 28.04.2021.; pristupljeno 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/myozyme>
127. Neufeld EF, Fratantoni JC. Inborn errors of mucopolysaccharide metabolism: faulty degradative mechanisms are implicated in this group of human diseases. *Science* 1970;169(3941):141-6. doi: 10.1126/science.169.3941.141
128. Thurberg BL, Maloney CL, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen EH, i sur. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest*. 2006;86(12):1208-20. doi: 10.1038/labinvest.3700484



129. Van Hove JL, Yang HW, Wu JY, Bradyt RO, Chen YT. High-level production of recombinant human lysosomal acid  $\alpha$ -glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):65-70. doi: 10.1073/pnas.93.1.65
130. Van den Hout H, Reuser AJ, Vulto AG, Loonen MC, Cromme-Dijkhuis A, Van der Ploeg AT. Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet*. 2000;356(9227):397-8. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02533-2
131. Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, Arts WF, De Klerk JB, Christa Loonen MB, i sur. Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human-glucosidase from milk. *Pediatrics*. 2004;113(5):e448-57. doi: 10.1542/peds.113.5.e448
132. van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, Smeitink JA, Smit GP, Poll-The BT, i sur. The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics*. 2003;112(2):332-40. doi: 10.1542/peds.112.2.332
133. Kishnani PS, Nicolino M, Voit T, Rogers RC, Tsai AC, Waterson J, i sur. Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr*. 2006.;149(1):89–97. doi: 10.1016/j.jpeds.2006.02.035
134. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, i sur. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*. 2007;68(2):99-109. doi: 10.1212/01.wnl.0000251268.41188.04
135. Kishnani PS, Corzo D, Leslie ND, Gruskin D, Van Der Ploeg A, Clancy JP, i sur. Early treatment with alglucosidase alfa prolongs long-term survival of infants with Pompe disease. *Pediatr Res*. 2009;66(3):329–35. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181b24e94
136. Nicolino M, Byrne B, Wraith JE, Leslie N, Mandel H, Freyer DR, i sur. Clinical outcomes after long-term treatment with alglucosidase alfa in infants and children with advanced Pompe disease. *Genet Med*. 2009;11(3):210–9. doi: 10.1097/GIM.0b013e31819d0996
137. Kishnani PS, Goldenberg PC, DeArme SL, Heller J, Benjamin D, Young S, i sur. Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab*. 2010;99(1):26–33. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.08.003
138. Bali DS, Goldstein JL, Banugaria S, Dai J, Mackey J, Rehder C, i sur. Predicting cross-reactive immunological material (CRIM) status in Pompe disease using GAA mutations: lessons learned from 10 years of clinical laboratory testing experience. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2012;160 C(1):40–9. doi: 10.1002/ajmg.c.31319
139. Ebbink BJ, Poelman E, Aarsen FK, Plug I, Régál L, Muentjes C, i sur. Classic infantile Pompe patients approaching adulthood: a cohort study on consequences for the brain. *Dev Med Child Neurol*. 2018;60(6):579–86. doi: 10.1111/dmcn.13740
140. Winkel LP, Van Den Hout JM, Kamphoven JH, Disseldorp JA, Remmerswaal M, Arts WF, i sur. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up. *Ann Neurol*. 2004;55(4):495–502. doi: 10.1002/ana.20019

141. Rossi M, Parenti G, Della Casa R, Romano A, Mansi G, Agovino T, i sur. Long-term enzyme replacement therapy for Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase derived from Chinese hamster ovary cells. *J Child Neurol.* 2007;22(5):565–73. doi: 10.1177/0883073807302598
142. Van Der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld J, i sur. A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1396-406. doi: 10.1056/NEJMoa0909859
143. Van der Ploeg AT, Barohn R, Carlson L, Charrow J, Clemens PR, Hopkin RJ, i sur. Open-label extension study following the Late-Onset Treatment Study (LOTS) of alglucosidase alfa. *Mol Genet Metab.* 2012;107(3):456–61. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.09.015
144. Hagemans ML, Winkel LP, Hop WC, Reuser AJ, Van Doorn PA, Van der Ploeg AT. Disease severity in children and adults with Pompe disease related to age and disease duration. *Neurology.* 2005;64(12):2139-41. doi: 10.1212/01.WNL.0000165979.46537.56
145. Banugaria SG, Prater SN, Patel TT, DeArme SM, Milleson C, Sheets KB, i sur. Algorithm for the early diagnosis and treatment of patients with cross reactive immunologic material-negative classic infantile Pompe disease: a step towards improving the efficacy of ERT. *PLoS One.* 2013;8(6):e67052. doi: 10.1371/journal.pone.0067052
146. Bushby KM. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: Report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 1995;5(1):71-4. doi: 10.1016/0960-8966(93)e0006-g
147. Wicklund MP. The limb-girdle muscular dystrophies. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2019;25(6):1599-1618. doi: 10.1212/CON.0000000000000809
148. Nigro V, Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol.* 2014;33(1):1-12.
149. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier NCT03652259, Gene Delivery Clinical Trial of SRP-9003 for Patients With LGMD2E (Beta-sarcoglycan Deficiency); 2018 Aug 28 [citirano 29.04.2021.]. Dostupno na: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03652259?cond=Limb+Girdle+Muscular+Dystrophy&phase=1&draw=2&rank=2>
150. Herson S, Hentati F, Rigolet A, Behin A, Romero NB, Leturcq F, i sur. A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1- $\gamma$ -sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. *Brain.* 2012;135(2):483-92. doi: 10.1093/brain/awr342
151. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales-Quintero X, Kota J, Coley BD, Galloway G, i sur. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores  $\alpha$ -sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol.* 2009;66(3):290–7. doi: 10.1002/ana.21732
152. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales XQ, Coley BD, Galloway G, Lewis S, i sur. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol.* 2010;68(5):629–38. doi: 10.1002/ana.22251

153. Seinen JM, Hoekstra HJ. Isolated limb perfusion of soft tissue sarcomas: a comprehensive review of literature. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(6):569-77. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.10.005
154. Mendell JR, Chicoine LG, Al-Zaidy SA, Sahenk Z, Lehman K, Lowes L, i sur. Gene delivery for limb-girdle muscular dystrophy type 2D by isolated limb infusion. *Hum Gene Ther.* 2019;30(7):794–801. doi: 10.1089/hum.2019.006
155. Thornton CA. Myotonic dystrophy. *Neurol Clin.* 2014;32(3):705-19, viii. doi: 10.1016/j.ncl.2014.04.011
156. David Brook J, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, i sur. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell.* 1992;68(4):799-808. doi: 10.1016/0092-8674(92)90154-5
157. Wang M, Weng WC, Stock L, Lindquist D, Martinez A, Gourdon G, i sur. Correction of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in myotonic dystrophy 1 reduces the mutant RNA and improves postnatal survival of DMSXL mice. *Mol Cell Biol.* 2019;39(21):e00155-19. doi: 10.1128/MCB.00155-19
158. Horrigan J, Gomes TB, Snape M, Nikolenko N, McMorn A, Evans S, i sur. A phase 2 study of AMO-02 (tideglusib) in congenital and childhood-onset myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Pediatr Neurol.* 2020;112:84–93. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.001
159. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier NCT03692312, Efficacy and Safety of Tideglusib in Congenital Myotonic Dystrophy; 2018 Mar 16 [citirano 29.04.2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03692312?term=tideglusib&draw=2&rank=3>
160. Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, Pellissier JF, i sur. The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):15060-5. doi: 10.1073/pnas.212498399
161. Pierson CR, Tomczak K, Agrawal P, Moghadaszadeh B, Beggs AH. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(7):555-64. doi: 10.1097/01.jnen.0000171653.17213.2e
162. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier: NCT03199469, Gene Transfer Clinical Study in X-Linked Myotubular Myopathy (ASPIRO); 2017 Jun 21 [citirano 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03199469>
163. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 -. Identifier: NCT04033159, Early Phase Human Drug Trial to Investigate Dynamin 101 (DYN101) in Patients  $\geq$  16 Years With Centronuclear Myopathies (Unite-CNM); 2019 Jun 12 [citirano 01.05.2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04033159?term=dyn101&draw=2&rank=2>

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 6. svibnja 1996. g. Pohađala sam Osnovnu školu Dragutina Tadijanovića u Petrinji, a od 2011. g. Srednju školu Petrinja. 2015. g. sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za ak. g. 2016./2017. g. dobila sam Dekanovu nagradu za uspjeh te 2019./2020. za doprinos ugledu fakulteta za sudjelovanje u projektu „Čuvajmo naše srce“ u organizaciji Studentske sekcije za kardiologiju.