

## BÖLÜM 18

# DUCHENNE MUSKÜLER DİSTROFİNİN TEDAVİSİNDE EKSON ATLAMA YAKLAŞIMINDAKİ GELİŞMELER

Uğur AKPULAT<sup>1</sup>

### GİRİŞ

Duchenne müsküler distrofi (DMD), kas kaybı ve yıkımı ile karakterize ölümcül bir genetik hastalıktır. Distrofin geninin (DMD) açık okuma çerçevesini bozan mutasyonların sonucu ortaya çıkmaktadır. Günümüzde, DMD için iyileştirici bir tedavi bulunmamaktadır; ancak geliştirilmekte olan ekson atlama yaklaşımları, klinik öncesi çalışmalarda ve klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar sergilemiştir. Yakın zamanda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), DMD geninin 51'inci eksonunu hedefleyen, tüm DMD hastalarının %13'ü için uygulanabilir, fosforodiamidat morfolino oligomeri (PMO) yapısına sahip, 30 nükleotitik Eteplirsen molekülünün hastalar için kullanımına şartlı olarak onay vermiştir. Bununla birlikte Eteplirsen'in, DMD hastalarındaki distrofini restore edebilmesinin klinik tabloya olan etkisi tartışmalıdır. Hayvan modellerinde gözlenen ekson atlama ve distrofini restore edebilme etkinliğine klinik denemelerde henüz ulaşılabilmiştir. Hedeflenen kas liflerine ulaştırılabilen oligonükleotitlerin miktarı, etkinlik gösterme başarısının ana belirleyicilerinden biridir. PMO antisense oligonükleotitlerin (PMO-ASO) çok yüksek maliyeti, klinik denemelerde daha yüksek dozların kullanılmasını sınırlandırarak, dokuda daha yüksek miktarda oligonükleotit bulunmasını ve buna bağlı olarak distrofin restorasyon miktarını etkilemiştir. Yakın zamanda, tasarlanmış olduğumuz daha kısa PMO-ASO'lerin uzun olanlara eş değer miktarda distrofin restorasyonu sağlayabileceğini gösterdik. Burada, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda uygulanan PMO-ASO dozlarının distrofini restore edebilme etkinliği üzerinde ne ölçüde belirleyici olduğunu ve daha kısa tasarımların genel restorasyon verimini nasıl etkileyebileceğini sunulmaktadır.

### DMD'NİN PATOFİZYOLOJİSİ VE GENETİĞİ

Duchenne müsküler distrofi (DMD; OMIM: 310200), nadir gözlenen, ilerleyen kas yıkımı ve zayıflaması ile karakterize, X kromozomuna bağlı resesif geçişli,

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Kastamonu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD., uakpulat@kastamonu.edu.tr

erken ölüme sebep olan nöromusküler bir hastalıktır ve distrofinopatiler olarak bilinen allelik hastalıkların en şiddetlisidir. Dünya genelinde her 3500 - 5000 yenidoğan erkekten birini etkilemektedir [1, 2]. Hastalığın hızlı, ilerleyici ve geri dönüşü olmayan seyri 5 yaşından önce proksimal kaslarda zayıflamaya, 12 ya da daha erken yaşlarda yürüme kaybına, 20'li yaşlarında da artmış kas zayıflamasının sonucunda solunun ya da kalp yetmezliğine bağlı erken ölüme neden olmaktadır [3]. DMD hastalarının henüz tedavi ihtiyacı karşılanamamıştır ve sorumlu gen ve protein yapısı genel olarak tedavi yaklaşımlarını şekillendirmektedir [4, 5].

DMD, distrofin proteinini kodlayan *DMD* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. *DMD*, insan genomunun en büyük genidir; 2.5 milyon baz çifti uzunluğunda, tüm insan genomunun %0.1, X kromozomunun ise %1.5'ini oluşturur. Genin kodlayan %1'lik kısmı 79 eksondan oluşmaktadır ve yaklaşık 14000 bç uzunluğunda oldukça büyük bir mRNA sentezlemektedir [6]. Tam uzunlukta ki transkript, 427-kDa büyüklüğünde, ifade yeri iskelet ve kalp kası ve az miktarda da beyinde olan bir protein sentezlemektedir. Yapısal bir protein olarak distrofin, hücre içi iskeletin ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanmasını, distrofin-glikoprotein kompleksinin (DGC) proteinleri ile etkileşime geçerek ve kompleksin sarkolemmada organize olmasını sağlayarak gerçekleştirir. Ayrıca nNOS gibi bağlantılı olduğu proteinler aracılığı ile hücresel sinyal yollarına da katılmaktadır [5]. Distrofin eksikliği ve buna bağlı DGC kompleksinin sarkolemmaya yerleşememesi, kas hücrelerinin kasılma sırasında oluşan gerilime yeterli direnci gösterememesine ve hücre içi kalsiyum miktarının artmasına sebep olmaktadır. Bu durum iskelet ve kalp kasında hücre nekrozu, dokuda inflamasyon ve ileri evrede tamir edilemeyen kasların yerini fibro-adipoz dokunun almasına sebep olmaktadır. Ayrıca iskelet kasında kan akışını düzenleyen nNOS'un DGC kompleksine yerleşememesi iskemiye ve buna bağlı dokudaki patolojinin şiddetlenmesine neden olmaktadır [5].

Çok büyük olması ve yüksek miktarda tekrar dizileri içermesinden dolayı diğer genlere oranla *DMD* geninde mutasyon sıklığı daha fazladır. Şimdiye kadar 7000'den fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır. En sık gözlenen mutasyon tipi, en az bir ekson içeren delesyonlardır (%65); diğerleri ise duplikasyonlar (%10), nokta mutasyonları (%10) ve diğer küçük yeniden düzenlenmelerdir (%15) [7]. Mutasyonlardan mRNA'nın okuma çerçevesini bozanlar, işlevsel bir distrofin proteinini üretimini engellediği için DMD hastalığına neden olmaktadır. Bununla birlikte tüm mutasyonlar genin okuma çerçevesini bozmamaktadır; bu tür mutasyonlar sıklıkla daha kısa ve kısmen işlevsel bir distrofin proteini üretmektedir. Bu tip mutasyonlar daha hafif seyirli bir distrofinopati olan Becker Musküler Distrofi (BMD; OMIM: 300376)'ye neden olmaktadır. DMD hastalarına göre BMD hasta-

larında semptomlar daha geç başlar, daha yavaş seyirlidir ve daha uzun yaşarlar. Bununla birlikte BMD hastaları hafif seyirli ile DMD'ye benzeyenler arasında geniş bir fenotipik heterojenite sergilemektedir. Bunun sebebi farklı BMD hastalarında mutasyona bağlı olarak sentezlenen distrofin proteininin stabilitesinin ve işlevselliğinin farklı olmasıdır [8, 9].

## DMD'DE TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

DMD hastaları için etkin bir tedavi henüz bulunmamaktadır. Hastalıkla mücadelede sekonder olarak gelişen yürüme kaybı, solunum ve kalp yetmezliğini hafifletmeye yönelik palyatif yaklaşımlar uygulanmaktadır ve bunlar hastalığın ilerlemesini ancak erteleyici yaklaşımlardır. Bu amaçla kortikosteroid uygulaması standart bir yaklaşımdır; ancak kilo alımı, kemik kırıkları ve katarakt gibi yan etkiler göstermektedir [10]. Primer kusuru onarmaya yönelik geliştirilmeye çalışılan birtakım tedavi yaklaşımı mevcuttur. Sağlıklı miyoblastların hastalara transplantasyonu, bağışıklık reddi ve hücrelerin sistemik olarak dokuya yeterli miktarda ulaştırılamaması gibi sorunları aşamamıştır. Gen aktarma çalışmaları, DMD geninin büyük olması ve vektörlerin küçük kapasitesinden dolayı, kısmen işlevsel bir protein üreteceği düşünülen daha kısa minidistrofin dizilerinin adeno asosiy vektörler aracılığı ile dokuya iletilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak viral vektöre karşı immün cevap bu yaklaşımı sınırlamaktadır [11].

Primer tedavi yaklaşımları arasında en umut verici olanı ekson atlama yaklaşımıdır. BMD hastalarındaki gibi kısmen işlevsel kısa bir distrofin proteini sentezi sağlamak amacıyla, DMD geni pre-mRNA'sı splicing sırasında antisens oligonükleotidler ile modüle edilerek distrofin restore edilebilmektedir [12]. ASO'ler açık okuma çerçevesini bozan eksonu maskeleyecek şekilde bağlanır, splicing'i düzenleyen proteinlerin bağlanmasını engeller ve böylece eksonun olgun mRNA transkriptinde olması engellenerek okuma çerçevesi yeniden kurulur. ASO'ler hastalarda bulunan mutasyona göre dizayn edilmekte, böylece kişiye özgü tedavi olanağı sağlamaktadır. Ekson atlama uygulamasının, tek bir ekson hedeflendiğinde DMD hastalarının %70'ine, aynı anda birden çok ekson hedeflendiğinde ise %90'ına uygulanabileceği öngörülmektedir [13]. Uygulamanın işe yaradığını gösteren ilk kanıtlar, DMD hastalarına ait miyoblastlarda ve DMD'nin hayvan modellerinde yapılan denemelerden elde edilmiştir [14-16]. DMD hastalarının kaslarında, kapsamlı klinik denemeler ve ayrıntılı analizler ile distrofin restorasyonunun kanıtlanmasının ardından, 2016 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 51'nci eksonu hedefleyen ve böylece tüm DMD hastalarının %13'ü için uygulanabilir olan Exondys51'i (Eteplirsen) şartlı olarak onaylayarak (FDA başvuru no. 206488Orig1s000), ilk kez bir ASO'in DMD hastaları üzerinde kullanılmasına izin

vermiştir. Bunu takiben, ekson 53'ü hedefleyen Golodirsens (hastaların %8'i için uygulanabilir) ve ekson 45'i hedefleyen Casimersens (hastaların %8'i için uygulanabilir) ASO'leri sırasıyla 2019 ve 2021 yılında FDA onayı almışlardır. Bununla birlikte, DMD hastalarında restore etmiş olduğu distrofin proteininin klinik başarıya olan etkisi tartışmalı olup, distrofin ifade seviyesi de kas işlevlerini yeniden kazanmak için gerekli olan %10'un henüz çok altındadır [17].

## **PMO-ASO'LERİN KLİNİK DENEMELERDEKİ ETKİNLİĞİ**

PMO yapısı, modifiye bir RNA analogudur ve kimyasal olarak nötral yapıdadır. Nötral omurgasından dolayı diğer moleküllere afinitesi çok düşüktür, bu yüzden kan dolaşımından kısa sürede elimine olmaktadır. Eteplirsensin klinik etkisi ilk olarak DMD hastalarının ekstansör digitorum brevis (EDB) kaslarına intramusküler enjeksiyonla test edilmiştir ve bu çalışma lokal olarak etkinliğini ölçen ilk ve tek çalışmadır [18]. İki farklı dozun (0.09mg ve 0.9mg) uygulandığı denemede, EDB kaslarında distrofin ifadesinin doza bağlı artış gösterdiği bulunmuştur. Distrofini restore edebilme etkinliği, Eteplirsens uygulanmış ve uygulanmamış kaslardan alınan kesitlerin distrofin ile immünfluoresan boyanması sonucunda, distrofin pozitif kas liflerinin sayısının ve seçilen bölgelerdeki göreceli distrofin ışımaya yoğunluğunun karşılaştırılması ile yapılmıştır. Her iki analiz yaklaşımı da, eteplirsens uygulanan kaslarda distrofin restorasyonunda artış olduğunu göstermiş olsa da; kas dokusu boyunca Eteplirsens'in her yere eşit miktarda dağılım göstermemesi ve kesit alınması sırasında enjeksiyon uygulanan bölgenin tam olarak kesitin içine alınamaması gibi teknik sınırlamalar, aynı miktarda doz uygulanan hastalar arasında değişken sonuçların elde edilmesine neden olmuştur. Klinik denemede, Eteplirsens'in daha yüksek dozlarını içeren doz aralıkları test edilmediğinden ve restorasyon etkinliğini ölçerken distrofin pozitif kas lifi başına ortalama distrofin ışımaya yoğunluğu hesaplanmadığından, en yüksek restorasyon miktarına ulaşmak için kas dokusuna ne miktarda Eteplirsens ulaşması gerektiğini belirleyecek doygunluk dozu bilinmemektedir. İzleyen tüm klinik denemeler, Eteplirsens'in DMD'li hastalara intravenöz uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler, Eteplirsens'in sadece farmakokinetik ve toksisite özelliklerini ortaya koymakla kalmamış aynı zamanda kan dolaşımı yoluyla kas dokularına PMO ulaşımının zorluklarını da ortaya koymuştur. Eteplirsens'in plazma yarı ömrünün, sırasıyla 0.5 - 20.0 mg/kg doz aralığında 1.62 - 3.6 saat [4] ve 30 ve 50 mg/kg dozlar için 3.3 ve 3.2 saat ile oldukça kısa olduğu gösterilmiştir [19]. 0.5 - 50 mg/kg/hafta arasındaki dozlarda ilaç birikimi gözlenmemiştir [4, 19]. Toplam sistemik klirensin yaklaşık %65 - %70'i, Eteplirsens'in birincil eliminasyon yolu olduğu gösterilen böbrekler aracılığıyla doz uygulamasından sonraki ilk 24 saat içerisinde meydana gelmiştir

[4, 19]. Eteplirsen, hepatik, pulmoner, renal, karaciğer veya kemik iliği işlevleri üzerinde hiçbir olumsuz etki olmaksızın iyi tolere edilmiştir [4, 19]. 0,5 - 50 mg/kg dozlarda Eteplirsen uygulanan tüm hastaların biyopsilerinin RT-PCR analizi ekson 51 atlamasını doğrularken, immünohistokimya (IHC) ve Western blot (WB) ile belirlenen distrofin restorasyonu yalnızca 2 mg/kg/hafta ve üzerindeki dozların uygulandığı hastalarda gözlenmiştir. Eteplirsen uygulanan hastalarda gözlenen distrofin restorasyonu seviyesi önemli ölçüde doza bağlıydı; ancak aynı dozun uygulandığı hastalar ve kaslar arasında restorasyon miktarı açısından değişkenlik bulunuyordu ve distrofin pozitif kaslar içersinde distrofin pozitif kas liflerinin dağılımı homojen olmayıp yamalı görünümdeydi [4, 19, 20]. Distrofin restorasyonunun uzun süreli takip edildiği, düzenli aralıklarla Eteplirsen uygulanan longitudinal klinik denemelerde restorasyon miktarında tutarlı ve sürekli bir artış olduğu belirlenmiştir [19, 20]. 180 hafta boyunca, 30 mg/kg ve 50 mg/kg Eteplirsen uygulanan hastaların birlikte yapılan WB temelli miktar belirleme analizleri, süre sonunda sağlıklı bireylerde gözlenen distrofin ifadesinin %0.93'ü kadar distrofin ifadesi seviyesine ulaşılabilirdiğini göstermiştir [20]. DMD hastalarının kas işlevlerinde önemli ölçüde işlevsel bir geri kazanım elde etmek için, hastaların tüm kaslarında, normal bireylerin distrofin ifadesi miktarının en az %10'u kadar distrofine ihtiyaç olduğu hesaplanmıştır [17]. Bu nedenle, klinik denemelerde Eteplirsen tarafından restore edilen distrofin seviyeleri henüz işlevsel bir kazanıma ulaştıracak miktarın çok altındadır.

## **PMO-ASO'LERİN KLİNİK ÖNCESİ HAYVAN MODELİ ÇALIŞMALARINDA ETKİNLİĞİ**

Klinik denemelerde PMO'ların distrofin restorasyon etkinlikleri beklentilerin çok altında kalmıştır; diğer yandan, çeşitli hayvan modelleri ile yapılan klinik öncesi çalışmalar daha iyi distrofin restorasyonu sergilemiştir ve klinik denemelerde gözlemlenen hastalar ve kaslar arasındaki ifade farklılıklarını ve kas boyunca yamalı distrofin dağılımını açıklayabilecek bazı biyolojik olguları ortaya çıkarmıştır. Eteplirsen'in sinomolgus maymunlarında farmakolojik güven aralığının değerlendirildiği çalışmada, intravenöz ve subkutan olarak 320 mg/kg'a kadar uygulanan dozların, kardiyovasküler, solunum, nörolojik ve renal işlevler üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını gösterilmiştir [21]. Mdx farelerde, ekson 23'ü hedefleyen bir PMO-ASO'in, 0.03 – 3g/kg aralığındaki dozlarının tek seferde intravenöz uygulandığı bir çalışmada, distrofin restorasyonunun vücut boyunca tüm kaslarda doza bağlı artış gösterdiği bulunmuştur [22]. 0.15g/kg ve üzerindeki PMO dozları, distrofin ifadesini uyarmıştır. IHC ile belirlenen distrofin pozitif kas liflerin yüzdesi 0.15g/kg dozda yaklaşık %15 iken, doza bağlı olarak artış göstermiştir ve

en yüksek dozda yaklaşık %100'e ulaşmıştır. Doz artışıyla birlikte distrofin pozitif liflerin sinyal yoğunluğu da artmıştır. Western blot ile ölçülen distrofin miktarı, 0.3 - 0.6g/kg aralığındaki dozlarda kontrol kasların seviyesinin %10-15'i kadar bulunmuştur ve en yüksek dozda tüm iskelet kaslarında kontrol kasların seviyesinin %50'sine ulaşmıştır. Klinik denemelere benzer şekilde, her bir doz için distrofin ifade seviyesi fareler arasında ve kaslar arasında değişkenlik göstermiştir ve düşük dozlarda distrofin pozitif kas liflerinin kas boyunca dağılımında homojenlik bulunmuyordu. Bununla birlikte PMO dozunun artırılması kas boyunca yamalı distrofin ifadesini önemli ölçüde azaltılmıştır [22]. PMO'ların uzun süreli toksisitesi ayrıca *mdx* farelerde de test edilmiştir ve 6 ay boyunca 1.5g/kg'a kadar PMO uygulanan farelerin vücut ağırlığı, serum enzim testleri ve histoloji analizlerinde herhangi bir toksisite belirtisi gözlenmemiştir [23]. DMD'nin köpek modelinde, 6-8'inci eksonları hedefleyen PMO'lardan oluşan kokteylin, 22 hafta boyunca 120 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında, haftalık veya iki haftada bir sistemik intravenöz enjeksiyonlar halinde uygulanması, distrofin restorasyonunu doza bağlı uyarmıştır ve en yüksek dozun uygulandığı grupta süreç sonunda terapötik distrofin ifadesi seviyelerine ulaşılmıştır (normal kontrol köpeklerin ortalama %26'sı); bu köpeklerde aynı zamanda hiçbir toksisite bulgusuna rastlanmadan inflamasyon belirteçlerinin azaldığı ve kas işlevlerini gösteren klinik sonuç ölçütlerinde iyileşme olduğu bulunmuştur [16]. Bununla birlikte, DMD'nin köpek modelinde de denekler ve kaslar arasında distrofin ifadesinde değişkenlik ve kas kesitleri boyunca yamalı ifade örüntüsü gözlenmiştir [16]. Klinik denemelerde ve klinik öncesi çalışmalarda gözlemlenen distrofin ifadesindeki değişkenliğin ve yamalı ifade dağılımının nedenlerini anlamaya yönelik çalışmalar da yürütülmüştür. PMO birikiminin başlıca doku içi enflamasyonun gerçekleştiği bölgelerde olduğu ve bu bölgelerde enflamaturar hücrelere, farklılaşmakta olan miyoblastlara ve yeni oluşmakta olan kas liflerine penetre olduğu gösterilmiştir [24]. Bu nedenle, intravenöz PMO uygulamalarında gözlemlenen distrofin ifadesindeki değişkenliğin çoğu, dokuya PMO ulaşımını sınırlayan ardışık iki olayın gerçekleşmesine duyulan ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır: Birincisi, miyopatik lezyonlarla bağlantılı olarak enflamaturar hücreler aracılığıyla PMO'ların vasküler yataktan interstisyuma taşınması ve ikincisi, PMO ile yüklü farklılaşmış miyoblastların tamir edilmekte olan kas lifleri ile füzyonu [24].

## **HAYVAN MODELLERİNDEN ELDE EDİLEN BULGULARIN KLİNİK DENEME TASARIMLARINA YÖN VERMESİ**

PMO-ASO'ler ile ekson atlama aracılı distrofin restorasyonu uygulaması, klinik denemeler ve klinik öncesi hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarında, ekson

atlama ve distrofin restorasyon etkinliğinde doza bağlı artış olması, hastalar veya hayvanlar arasında ve farklı kaslar arasında distrofin ifadesinin değişkenlik göstermesi ve kas boyunca distrofin restorasyonu dağılımının yamalı örüntü sergilemesi gibi bazı benzer sonuçlar sergilemiştir. Bununla birlikte, hayvan modeli çalışmalarındaki uygulama tasarımları, terapötik düzeyde distrofin restorasyonuna ulaşma açısından klinik denemelerdeki tasarımlardan daha iyi performans ortaya koymuştur. PMO'ların dokuya ulaşım yerlerinin inflamatuvar lezyonların bulunduğu bölgelere olması ve ardından hücre içine alımın tercihen yenilenmekte olan kas liflerinde meydana gelmesi nedeniyle, bu başarı kısmen farklı türlerin kaslarının rejeneratif kapasitesindeki çeşitliliğe atfedilebilir. Bununla birlikte, hayvan modeli çalışmalarında, klinik denemelerden önemli ölçüde daha yüksek dozlarda PMO'ların kullanılmış olması muhtemelen PMO doku alımını artırmıştır. Bu durum, sonuçta çok daha fazla distrofin restorasyonu gözlenmesi ve ifade değişiminde daha az varyasyon ile sonuçlanmıştır. Mevcut literatürde, hayvan modeli çalışmalarında çok daha yüksek PMO dozlarının güvenli olduğu gösterilmiş olsa da, klinik denemelerde kullanılan dozların seçimine ilişkin makul bir açıklama bulunmamaktadır. Ancak bu tercihin belirleyicilerinden biri, PMO üretim sürecinin yüksek maliyet içermesidir; çalışmalarda kullanılan model hayvanlar, insanlara göre daha az vücut kütlelerine sahip olduğundan, klinik denemelere göre daha yüksek dozlarda çalışmalar tasarlamak mümkün olmuştur. Model hayvan çalışmaları, dokuya ulaşan PMO miktarı ve restorasyon cevabının seviyesi açısından seçilen dozun önemli bir parametre olduğunu göstermektedir; buna göre, PMO'ların kimyasal niteliğini değiştirmeden, üretim sürecinin yüksek maliyet baskısının oluşturduğu sınırlamayı azaltarak daha yüksek PMO dozları kullanmanın rasyonel bir yolu daha kısa PMO'lar kullanmaktır. Bu amaçla, Eteplirsen ile aynı bölgeyi hedefleyen daha kısa alternatif PMO'lar tasarlanmıştır ve etkinlikleri, *in vitro* şartlarda *mdx52* miyoblast hücre hattında ve *in vivo* olarak *mdx52* farelerde test edilmiştir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* analizler, PMO'ların hücrelere ve dokuya doyumluk seviyesinde ulaştırıldığında, daha kısa izoformların etkinliğinin Eteplirsen ile özdeş olabileceğini göstermiştir [25]. Bulgular, sadece distrofin üretimini artırmak için daha kısa izoformların ekonomik olarak uygun alternatifler olduğunu değil, aynı zamanda yeni klinik denemeler tasarlanırken bir kas dokusunun alabileceği en yüksek PMO kapasitesi olan PMO doyumluk seviyesinin de belirlenmesi gerektiğini göstermektedir. DMD hastalarının kasları için PMO doyumluk seviyelerinin belirlenmesi, PMO-ASO aracılı ekson atlama uygulamalarının nihai kapasitesi olacak en yüksek beklenen distrofin restorasyonunu sağlayacaktır.



## SONUÇ

PMO-ASO'lerin aracılık ettiği ekson atlama yaklaşımları, klinik denemelerde önemli bir başarıya ulaşmış olsa da; hala DMD hastaları için terapötik düzeyden uzaktır. Ancak DMD'nin hayvan modeli çalışmalarında bu seviye elde edilmiştir. Bu nedenle, hayvan modeli çalışmalarından elde edilen tecrübeler yeni klinik denemelerin tasarımları sırasında kullanılmalıdır. Model hayvan çalışmalarının en belirleyici sonucu, restore olmuş distrofin ifadesinin miktarını artırma ve denekler ve kaslar arasındaki varyasyonu azaltma açısından uygun PMO dozunun belirlenmesinin önemidir.

## KAYNAKLAR

1. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 1987. 51(6): p. 919-28.
2. Emery, A.E., Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord*, 1991. 1(1): p. 19-29.
3. Bello, L., et al., DMD genotypes and loss of ambulation in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology*, 2016. 87(4): p. 401-9.
4. Cirak, S., et al., 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): p. 595-605.
5. Cirak, S., et al., Restoration of the dystrophin-associated glycoprotein complex after exon skipping therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 2012. 20(2): p. 462-7.
6. Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini, Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*, 2003. 2(12): p. 731-40.
7. Bushby, K., et al., Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*, 2010. 9(1): p. 77-93.
8. Gao, Q.Q. and E.M. McNally, The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol*, 2015. 5(3): p. 1223-39.
9. Bushby, K.M., et al., The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities. *J Neurol*, 1993. 240(2): p. 105-12.
10. McDonald, C.M., et al., Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet*, 2018. 391(10119): p. 451-461.
11. Lim, K.R., R. Maruyama, and T. Yokota, Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther*, 2017. 11: p. 533-545.
12. Arechavala-Gomez, V., et al., Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. *Hum Gene Ther*, 2007. 18(9): p. 798-810.
13. Yokota, T., W. Duddy, and T. Partridge, Optimizing exon skipping therapies for DMD. *Acta Myol*, 2007. 26(3): p. 179-84.
14. van Deutekom, J.C., et al., Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(15): p. 1547-54.
15. Mann, C.J., et al., Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(1): p. 42-7.
16. Yokota, T., et al., Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol*, 2009. 65(6): p. 667-76.



17. van den Bergen, J.C., et al., Dystrophin levels and clinical severity in Becker muscular dystrophy patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014. 85(7): p. 747-53.
18. Kinali, M., et al., 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): p. 918-28.
19. Mendell, J.R., et al., Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 2013. 74(5): p. 637-47.
20. Charleston, J.S., et al., Eteplirsen treatment for Duchenne muscular dystrophy: Exon skipping and dystrophin production. *Neurology*, 2018. 90(24): p. e2146-e2154.
21. Sazani, P., D.L. Weller, and S.B. Shrewsbury, Safety pharmacology and genotoxicity evaluation of AVI-4658. *Int J Toxicol*, 2010. 29(2): p. 143-56.
22. Wu, B., et al., Dose-dependent restoration of dystrophin expression in cardiac muscle of dystrophic mice by systemically delivered morpholino. *Gene Ther*, 2010. 17(1): p. 132-40.
23. Wu, B., et al., One-year treatment of morpholino antisense oligomer improves skeletal and cardiac muscle functions in dystrophic mdx mice. *Mol Ther*, 2011. 19(3): p. 576-83.
24. Novak, J.S., et al., Myoblasts and macrophages are required for therapeutic morpholino antisense oligonucleotide delivery to dystrophic muscle. *Nat Commun*, 2017. 8(1): p. 941.
25. Akpulat, U., et al., Shorter Phosphorodiamidate Morpholino Splice-Switching Oligonucleotides May Increase Exon-Skipping Efficacy in DMD. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018. 13: p. 534-542.