

# NOVE MOŽNOSTI ZDRAVLJENJA SPINALNE MIŠIČNE ATROFIJE

## NEW OPTIONS FOR THE TREATMENT OF SPINAL MUSCULAR ATROPHY

AVTOR / AUTHOR:

izr. prof. dr. Aleš Berlec, mag. farm.

*Odsek za biotehnologijo, Institut »Jožef Stefan«,  
Jamova 39, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ales.berlec@ijs.si

## 1 SPINALNA MIŠIČNA ATROFIJA: KLINIČNA SLIKA IN VZROKI

Spinalna mišična atrofija (SMA) je avtosomna recesivna živčno-mišična bolezen, ki vključuje progresivno degeneracijo motoričnih nevronov  $\alpha$  v hrbtenjači. Klinično se kaže kot napredujoča oslabeleost skeletnih in dihalnih mišic, kar vodi v atrofijo mišic in znatno prizadetost, vključno s težavami s hranjenjem in dihanjem. SMA je ena izmed najpo-

### POVZETEK

Spinalna mišična atrofija (SMA) je avtosomna recesivna živčno-mišična bolezen, ki je posledica progresivne degeneracije motoričnih nevronov  $\alpha$  v hrbtenjači. SMA povzročajo mutacije v genu *SMN1*, ki vodijo do izgube izražanja proteina SMN, kar se lahko delno kompenzira z izražanjem iz gena *SMN2*. Odobritev treh novih zdravil, ki omogočajo bistveno manjšo umrljivost in hitrejšo doseganje motoričnih mejnikov pri bolnikih, je imela v zadnjem času velik vpliv na potek bolezni. Protismiselni oligonukleotid nusinersen in majhna molekula risdiplam spodbujata vgradnjo eksona 7 v mRNA *SMN2* in s tem povečata tvorbo SMN. Onasemnogen abeparvovek je gensko zdravilo, ki za dostavo gena divjega tipa *SMN1* v celice motoričnih nevronov uporablja kapsido adeno-povezanega virusa 9. Pri vseh zdravilih je potrebno z zdravljenjem pričeti čim hitreje po diagnozi. V prihodnje bo pomemben razvoj novih zdravil, ki se ne bodo osredotočala samo na centralni živčni sistem, temveč tudi na periferne posledice bolezni.

### KLJUČNE BESEDE:

nusinersen, onasemnogen abeparvovek, risdiplam, spinalna mišična atrofija, zdravljenje

### ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disease resulting from progressive degeneration of  $\alpha$ -motor neurons in the spinal cord. SMA is caused by mutations in the *SMN1* gene that lead to the loss of SMN expression, which may be partially compensated by expression from the *SMN2* gene. The course of the disease has recently been greatly influenced by the approval of three new drugs that enable a significant reduction in mortality and faster achievement of motor milestones in patients. Antisense oligonucleotide nusinersen and small molecule risdiplam promote the incorporation of exon 7 into *SMN2* mRNA, thereby increasing SMN formation. Onasemnogen abeparvovek is a gene therapy that uses the capsid of adeno-associated virus 9 to deliver the wild-type *SMN1* gene into motor neuron cells. For all drugs, treatment should be started as soon as possible after diagnosis. In the future, it will be important to



develop new drugs that focus not only on the central nervous system, but also on the peripheral consequences.

**KEY WORDS:**

nusinersen, onasemnogen abeparvovek, risdiplam, spinal muscular atrophy, treatment

gostejših avtosomno recesivnih boleznih in avtosomna recesivna bolezen z najvišjo stopnjo umrljivosti v otroštvu (1). Bolezen prenaša eden od 40–67 odraslih, zanjo pa zboli eden od 11.000 novorojenih otrok (2).

SMA je heterogena bolezen in njena klinična slika obsega širok razpon simptomov. Glede na starost ob nastopu in dosežene motorične mejnike jo lahko razvrstimo v štiri podtipe, od najhujšega SMA I do najblažjega SMA IV (3). Bolniki s SMA I nikoli ne morejo zavzeti sedečega položaja, klinični začetek boleznih pa se pojavi pred starostjo šestih mesecev, pri čemer so spontani gibi zmanjšani, vzorec dihanja pa je paradoksalen. Pričakovana življenjska doba bolnikov, povezana z odpovedjo dihalnih mišic, je krajša od dveh let. Potek boleznih pri SMA II je blažji z začetkom med šestimi in 18 meseci. Bolniki lahko sedijo, vendar ne morejo samostojno hoditi. Razvijejo prizadetost dihal, ki pred odraslostjo običajno zahteva uporabo neinvazivne ventilacije. Značilni so tudi ortopedski zapleti, kot so huda skolioza in sklepne kontrakture. SMA III in IV sta najblažji obliki, saj pri njihju bolezen nastopi kasneje, bolniki so sposobni samostojne hoje, klinični potek boleznih pa je spremenljiv. Pri SMA IV običajno ne pride do življenjsko nevarnih zapletov (3).

SMA povzročajo mutacije v genu *SMN1* (**S**urvival **M**otor **N**euron **1** oz. preživetveni motonevron 1), ki vodijo do izgube izražanja proteina SMN. Izgubo delno nadomesti izražanje paralognega gena *SMN2*, ki se od *SMN1* razlikuje po enonukleotidnem polimorfizmu v eksonu 7 (4). Sprememba nukleotida povzroči izločitev eksona 7 v večini transkriptov *SMN2* (skoraj 90 %), medtem ko je nastali protein brez eksona 7 (*SMNΔ7*) nestabilen in se hitro razgradi. Na stopnjo resnosti boleznih vpliva število kopij gena *SMN2*, pri čemer manjše število kopij ustreza hujšemu poteku boleznih. Na klinično sliko boleznih vpliva dejstvo, da se protein SMN ne izraža samo v nevronih, ampak tudi v drugih celicah in opravlja pomembno vlogo v celični homeostazi, ki vključuje sestavljanje izrezovalno-povezovalnega kompleksa, endocitozo in prenos proteinov (5).

Na potek boleznih je imela v zadnjem času velik vpliv odobritev treh novih zdravil, kar nekateri označujejo kar za

terapevtsko revolucijo, saj le-ta omogočajo bistveno manjšo umrljivost in večjo zastopanost blažjih oblik boleznih (6).

## 2 NOVI NAČINI ZDRAVLJENJA

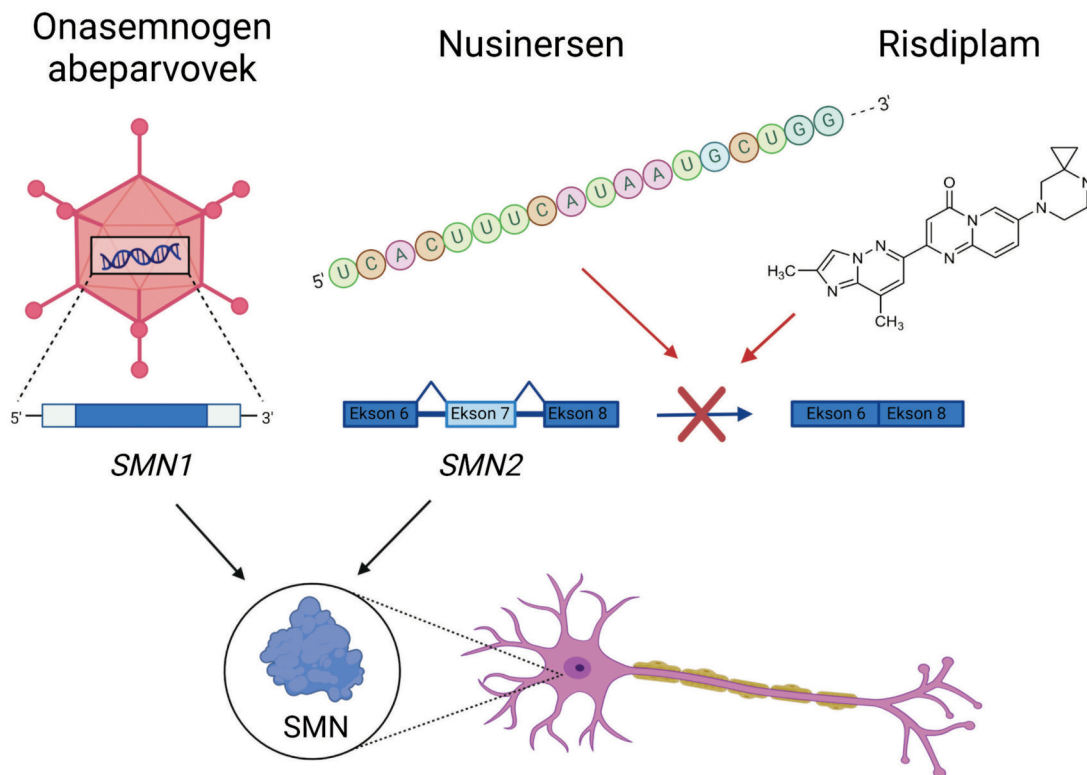
### 2.1 NUSINERSEN

Manipulacija vzorca spajanja (*splicing*) gena *SMN2* ima lahko za posledico popolnoma funkcionalen protein SMN, kar je v različnih eksperimentalnih modelih prispevalo k pomembnemu izboljšanju preživetja in patologije boleznih. Pri zdravljenju so se zato osredotočili na ciljanje regulatornih elementov spajanja RNA, ki spodbujajo vključitev eksona 7 na transkriptu gena *SMN2*. Prvo odobreno zdravilo za SMA je bil protismiselni oligonukleotid nusinersen (7). Protismiselni oligonukleotid je kratka enoverižna DNA, ki je komplementarna tarčni mRNA, ki jo lahko veže in s tem vpliva na njeno regulacijo (slika 1). Izključitev eksona 7 iz transkripta *SMN2* ureja odsek introna 7, imenovan dušilec intronskega spajanja N1 (**I**ntronic **S**plicing **S**ilencer N1, ISS-N1), ki se nahaja neposredno za mestom spajanja eksona 7 (8). Nusinersen se veže na ISS-N1 in zavira delovanje drugih dejavnikov spajanja, kar spodbuja vgradnjo eksona 7 v mRNA (7).

Nusinersen je decembra 2016 po uspešno izvedenih kliničnih raziskavah odobrila ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA), junija 2017 pa še Evropska agencija za zdravila (EMA). Nusinersen ne prehaja skozi krvno-možgansko pregrado, zato so ga v vseh kliničnih raziskavah aplicirali intratekalno (tj. v subarahnoidni prostor v hrbtenični kanal) (3).

#### ALI STE VEDELI?

- Spinalna mišična atrofija je ena izmed najpogostejših avtosomnih recesivnih boleznih in avtosomna recesivna bolezen z najvišjo stopnjo umrljivosti v otroštvu.
- Spinalno mišično atrofijo povzročajo mutacije v genu *SMN1*, ki vodijo do izgube izražanja proteina SMN.
- Tri nova zdravila, nusinersen, risdiplam in onasemnogen abeparvovek, omogočajo bistveno manjšo umrljivost in večjo zastopanost blažjih oblik boleznih.
- Za uspešno zdravljenje spinalne mišične atrofije sta ključna čim zgodnejša diagnoza in začetek zdravljenja.



**Slika 1:** Tri odobrena zdravila za zdravljenje spinalne mišične atrofije in shematski prikaz njihovega delovanja. Slika je bila pripravljena s programom Biorender.

**Figure 1:** Three approved drugs for the treatment of spinal muscular atrophy and schematic depiction of their action. The figure was prepared with Biorender.

V randomizirani, dvojno slepi, kontrolirani klinični raziskavi III. faze ENDEAR (NCT02193074), ki je bila izvedena v letih 2014–2016, so ocenili varnost in klinično učinkovitost nusinersena pri 121 dojenčkih, pri katerih se je SMA pojavila med rojstvom in sedmim mesecem starosti (9). Ob vmesni analizi podatkov so dojenčki, zdravljeni z nusinersenom, dosegli bistveno večji napredek v kategorijah nevrološkega pregleda motoričnih mejnikov po Hammersmithu (**Hammersmith Infant Neurological Examination**, HINE) kot dojenčki v kontrolni skupini (41 % proti 0 %,  $p < 0,001$ ). Poleg tega sta se v skupini, zdravljeni z nusinersenom, izboljšala preživetje in zmanjšala potreba po trajni mehanski ventilaciji. Šest od 73 zdravljenih bolnikov je v obdobju enega leta zdravljenja doseglo neodvisno sedenje (9). V drugo klinično raziskavo III. faze CHERISH (NCT02292537) so bili vključeni nekoliko starejši otroci s kasnejšim pojavom SMA (10). Raziskavo so izvedli med leti 2014–2017 in je vključevala 126 otrok med tretjim in četrtem letom starosti. Ob vmesni analizi podatkov po 15 mesecih zdravljenja so v skupini, ki je prejela nusinersen,

opazili povprečno zvišanje ocene funkcijske motorične sposobnosti po Hammersmithu za 4,0 točke v primerjavi s povprečnim znižanjem za 1,9 točke v kontrolni skupini ( $p < 0,001$ ). V končni analizi po 15 mesecih zdravljenja so opazili zvišanje ocene funkcijskih motoričnih sposobnosti za skupno 3,0 točke pri 57 % bolnikov z nusinersenom v primerjavi s 26 % bolnikov v kontrolni skupini (10). Na podlagi zgoraj opisanih ugodnih rezultatov so obe raziskavi predčasno prekinili in bolnike vključili v odprto podaljšano raziskavo SHINE (NCT02594124), da bi ocenili dolgoročno varnost, prenašanje in klinične učinke nusinersena. Vmesna analiza po več kot treh letih zdravljenja je pokazala nadaljevanje koristi nusinersena na motorične sposobnosti, pri čemer je bil učinek večji, če so prvi odmerki prejeli mlajši bolniki. Do podobne ugotovitve so prišli tudi v vmesni odprti študiji NURTURE (NCT02386553), kjer so poudarili pomen proaktivnega zdravljenja z nusinersenom takoj po postavitvi genetske diagnoze pri dojenčkih s simptomi in utemeljili nujnost uvedbe presejalnega testiranja novorojenčkov (11).

## 2.2 RISDIPLAM

Risdiplam je majhna molekula za zdravljenje SMA, ki jo je FDA odobrila leta 2020 in EMA leta 2021 (12). Risdiplam cilja podobno molekulsko tarčo kot nusinersen (slika 1). Deluje kot modulator spajanja *SMN2*, pri čemer se neposredno veže na pre-mRNA *SMN2* na dveh mestih, in sicer na zaporedje ojačevalca eksona v eksonu 7 in na mesto 5' spajanja introna 7 (13). Risdiplam stabilizira ribonukleoproteinski kompleks, spodbuja vključitev eksona 7 in poveča tvorbo funkcionalnega proteina SMN. Sposobnost specifične vezave risdiplama na dve mesti pre-mRNA *SMN2* zmanjša njegovo možnost delovanja na druge pre-mRNA in s tem prepreči neželene učinke. Predklinične raziskave so pokazale, da lahko risdiplam doseže centralni živčni sistem in periferne organe ter povzroči znatno povečanje proteina SMN v krvi, možganih in mišicah. Ena od prednosti te učinkovine je možnost peroralnega načina jemanja. Poleg tega sistemska porazdelitev omogoča delovanje tudi v drugih tkivih, ne samo v nevronih centralnega živčevja.

V klinični raziskavi I. faze na 25 zdravih prostovoljcih (NCT02633709) so potrdili varnost, določili optimalni odmerek in pokazali, da risdiplam poveča razmerje mRNA *SMN2/SMNΔ7* v odvisnosti od odmerka (14), kar je predstavljalo osnovo za nadaljnje raziskave II/III. faze. V klinično raziskavo II/III. faze FIREFISH (NCT02913482) so vključili 21 dojenčkov s SMA I, starih od 1 do 7 mesecev, ki so prejeli bodisi nižji (0,08 mg risdiplama na kg telesne mase na dan) ali višji odmerek (0,20 mg risdiplama na kg telesne mase na dan). Z višjim odmerkom so dosegli višjo koncentracijo proteina SMN v krvi. Pri višji koncentraciji je sedem dojenčkov lahko sedelo brez opore vsaj pet sekund (vnaprej določen razvojni mejnik), medtem ko v skupini z nižjim odmerkom to ni uspelo nobenemu (15). Raziskava se zato nadaljuje z višjim odmerkom, pri čemer spremljajo dolgotrajnejšo učinkovitost risdiplama.

V klinični raziskavi II/III. faze SUNFISH (NCT02908685) so ocenjevali varnost, prenašanje in učinkovitost pri bolnikih s SMA tipa II in III, starih od 2 do 25 let. V prvem delu raziskave so pri 51 bolnikih ocenili varnost, farmakodinamiko, farmakokinetiko in optimalno odmerjanje risdiplama, medtem ko so njegovo učinkovitost v primerjavi s placebom preskušali v drugem delu. V drugem delu so pri zdravljenju z risdiplamom dosegli bistveno izboljšanje motoričnih sposobnosti v primerjavi s placebom (16). Skrbniki in bolniki v zdravljeni skupini so poročali o izboljšanju neodvisnosti pri opravljanju vsakodnevnih dejavnosti.

V teku je še več kliničnih raziskav risdiplama III. faze, pri čemer v raziskavi JEWELFISH (NCT03032172) proučujejo

učinke risdiplama pri bolnikih, ki so bili predhodno zdravljeni z drugimi terapijami, v raziskavi RAINBOWFISH (NCT03779334) pa proučujejo učinke risdiplama pri dojenčkih s presimptomatsko SMA, ki so bili pri prvem odmerku mlajši od 6 tednov.

## 2.3 ONASEMNOGEN ABEPARVOVEK

Vzrok za SMA je okvara le enega gena, ki vodi do izgube proteina SMN. Dobro možnost za zdravljenje zato predstavlja nadomestno gensko zdravljenje. Onasemnogen abeparvovek (17) uporabljamo za nadomestno zdravljenje z genom *SMN1*, ki za dostavo gena divjega tipa *SMN1* v celice motoričnih nevronov uporablja kapsido adeno-povezanega virusa 9 (**Adeno-Associated Virus 9**, AAV9), ki se v organizmu ne more replicirati (slika 1) (18). Vektor AAV9, ki nosi komplementarno rekombinantno DNA proteina *SMN1* pod nadzorom hibridnega promotora (citomegalovirusni ojačevalec/kokošji- $\beta$ -aktin promotor), lahko po intravenski aplikaciji preide skozi krvno-možgansko pregrado in učinkovito transducira ciljne celice v osrednjem živčevju, vključno z motoričnimi nevroni v hrbtnjači, in omogoči trajno izražanje proteina SMN. Glavna prednost tega pristopa je, da je za zdravljenje potreben enkratni odmerek, ki vodi do sistemskega izražanja proteina SMN (19). FDA je onasemnogen abeparvovek odobrila leta 2019, EMA pa mu je podelila pogojno dovoljenje za promet leta 2020.

Klinično raziskavo I. faze so z onasemnogen abeparvovekom izvedli na 15 dojenčkih, obolelih za SMA I. Onasemnogen abeparvovek so jim vbrizgali kot enkratno intravensko injekcijo v dveh različnih odmerkih, nižjem ( $6,7 \times 10^{13}$  vektorskih genomov na kg) ali višjem ( $2,0 \times 10^{14}$  vektorskih genomov na kg). Vsi bolniki so preživel do 20. meseca. Pri višjem odmerku je prišlo do hitrega izboljšanja motoričnih sposobnosti. Enajst bolnikov je doseglo motorični mejnik sedenja brez pomoči, medtem kot sta dva lahko brez pomoči tudi hodila (20).

Cilj klinične odprte multicentrične raziskave III. faze STRIVE (NCT03306277) je bila ocena varnosti in učinkovitosti onasemnogen abeparvoveka pri 22 simptomatskih dojenčkih s SMA I, starih manj od 6 mesecev, ki so v genomu vsebovali eno ali dve kopiji gena *SMN2*. Učinkovitost so primerjali s preteklimi podatki 23 dojenčkov, ki niso prejeli zdravljenja. Trinajst dojenčkov (59 %) je lahko funkcionalno sedelo vsaj 30 sekund pri 18 mesecih starosti, kar v kontrolni skupini ni uspelo nobenemu. Dvajset bolnikov (91 %) ni potrebovalo respiratorne podpore do 14. meseca starosti v primerjavi s šestimi v kontrolni skupini (26 %) (21). Glavni

neželeni učinek zdravljenja z onasemnogen abeparvovekom je hepatotoksičnost, kar v večini primerov zahteva tudi hkratno zdravljenje s prednizolonom (6).

## 3 OSTALE UČINKOVINE V KLINIČNIH RAZISKAVAH

Branaplam je majhna molekula, ki podobno kot risdiplam deluje kot modulator spajanja *SMN2*, saj stabilizira komplekse *SMN2* mRNA z dejavniki spajanja, s čimer preprečuje izločitev eksona 7. Pri aplikaciji branaplama mišim s SMA so opazili od odmerka odvisno povečanje vključenosti eksona 7 in izražanja proteina SMN, hkrati pa je prišlo tudi do povečanja telesne mase in podaljšanja življenjske dobe miši (22). Klinična raziskava I/II. faze na ljudeh se je začela leta 2015 (NCT02268552) na pediatričnih bolnikih s SMA, mlajših od 6 mesecev, z dvema genomskima kopijama *SMN2*. Nove terapije se poleg delovanja na tarče v nevronih osredotočajo tudi na krepitev mišic pri bolnikih. Reldesemtiv je nizkomolekularni selektivni aktivator troponina v skeletnih mišicah. Deluje tako, da poveča afiniteto troponina C do kalcija, poveča občutljivost sarkomer za delovanje kalcija in okrepi krčenje mišic (23). Njegovo varnost so potrdili v klinični raziskavi I. faze. V dvojno slepi, randomizirani, s placebom kontrolirani klinični raziskavi II. faze (NCT02644668) na 70 bolnikih s SMA II do SMA IV so proučili učinek reldesemtiva na funkcionalne in dihalne zmogljivosti bolnikov. Reldesemtiv so aplicirali peroralno v dveh različnih odmerkih (150 mg dvakrat dnevno, 450 mg dvakrat dnevno). V skupini z višjimi odmerki so opazili trend izboljšanja pri šestminutnem testu hoje in pri maksimalnem tlaku izdiha (24). SRK-015 je monoklonsko protitelo, ki selektivno zavira miostatin, spodbuja rast in diferenciacijo mišičnih celic ter izboljša mišično moč pri miših s SMA (25). V klinični raziskavi I. faze (NCT02644777) so potrdili njegovo varnost in dobro prenašanje, medtem ko klinična raziskava II. faze TOPAZ (NCT03921528), ki vključuje 58 bolnikov s SMA II in SMA III, starih od dveh do 21 let, še poteka.

## 4 SKLEP

Zdravljenje SMA predstavlja področje medicine, ki je v zadnjem obdobju doživelo obsežno razširitev terapevtskih

možnosti z uspešnim kliničnim odzivom. Tri trenutno odobrena zdravila za zdravljenje SMA (februar 2022), nusinersen, risdiplam in onasemnogen abeparvovek, omogočajo zdravljenje bolezni, ki je prej veljala za neozdravljivo, s čimer dajejo upanje tako bolnikom kot njihovim svojcem. Zdravila spreminjajo potek bolezni, kot je bil poznan do sedaj, saj podaljšujejo življenjsko dobo in izboljšujejo nevro-mišične simptome, pri čemer je ključnega pomena čim hitrejši začetek zdravljenja.

Kljub velikemu uspehu pa je potrebno omeniti, da trenutno zdravljenje ne prinaša ozdravitve, saj bolniki še vedno potrebujejo dolgotrajni skrb in nego. Poleg tega so zdravila manj učinkovita pri bolnikih, pri katerih bolezen diagnosticirajo pozneje v življenju ali pa se kaže z blažjimi simptomi. Omeniti je potrebno tudi visoke stroške zdravljenja, ki omejujejo njegovo splošno dostopnost. Nusinersen stane do 110.000 EUR na odmerek, kar predstavlja 665.000 EUR prvo leto in nato 330.000 EUR vsako naslednje leto. Onasemnogen abeparvovek stane 1.900.000 EUR, pri čemer je potreben le en odmerek, medtem ko zdravljenje z risdiplamom stane do 300.000 EUR na leto, v odvisnosti od potrebnega odmerka (6).

V prihodnje bo zato zelo pomemben razvoj novih zdravil, ki se ne bodo osredotočala samo na centralni živčni sistem, ampak tudi na periferne posledice bolezni, kar bo omogočilo dodatno izboljšanje kakovosti življenja. V predkliničnih in kliničnih raziskavah so zato že pristopi, ki niso povezani z delovanjem na protein SMN, ampak se osredotočajo na poti celične razgradnje proteinov, delujejo na citoskelet, mišice, nevro-mišični stik in izkazujejo nevroprotektivno delovanje.

## 5 LITERATURA

1. Mercuri E, Bertini E, Iannaccone ST. Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. *Lancet Neurol.* 2012;11(5):443-52.
2. Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlf's EM, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(1):27-32.
3. Messina S, Sframeli M. New treatments in spinal muscular atrophy: Positive results and new challenges. *J Clin Med.* 2020;9(7).
4. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Hum Mol Gen.* 1999;8(7):1177-83.



5. Hamilton G, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. *Trends Mol Med.* 2013;19(1):40-50.
6. Chaytow H, Faller KME, Huang YT, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: From approved therapies to future therapeutic targets for personalized medicine. *Cell Rep Med.* 2021;2(7):100346.
7. Corey DR. Nusinersen, an antisense oligonucleotide drug for spinal muscular atrophy. *Nat Neurosci.* 2017;20(4):497-9.
8. 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 Gen.* 2008;82(4):834-48.
9. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1723-32.
10. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, et al. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2018;378(7):625-35.
11. De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu WL, Crawford TO, Finkel RS, et al. 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.
12. Dhillon S. Risdiplam: First Approval. *Drugs.* 2020;80(17):1853-8.
13. Sivaramkrishnan M, McCarthy KD, Campagne S, Huber S, Meier S, Augustin A, et al. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. *Nat Comm.* 2017;8(1):1476.
14. Sturm S, Gunther A, Jaber B, Jordan P, Al Kotbi N, Parkar N, et al. A phase 1 healthy male volunteer single escalating dose study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of risdiplam (RG7916, RO7034067), a SMN2 splicing modifier. *Br J Clin Pharmacol.* 2019;85(1):181-93.
15. Baranello G, Darras BT, Day JW, Deconinck N, Klein A, Masson R, et al. Risdiplam in Type 1 Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2021;384(10):915-23.
16. Mercuri E, Barisic N, Boespflug-Tanguy O, Deconinck N, Kostera-Pruszyk A, Masson R, et al. SUNFISH Part 2: Efficacy and Safety of Risdiplam (RG7916) in Patients with Type 2 or Non-Ambulant Type 3 Spinal Muscular Atrophy (SMA) (1260). *Neurology.* 2020;94(15 Supplement):1260.
17. Hoy SM. Onasemnogene Abeparovvec: First Global Approval. *Drugs.* 2019;79(11):1255-62.
18. Valori CF, Ning K, Wyles M, Mead RJ, Grierson AJ, Shaw PJ, et al. Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med.* 2010;2(35):35ra42.
19. Meyer K, Ferraiuolo L, Schmelzer L, Braun L, McGovern V, Likhite S, et al. Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. *Mol Ther.* 2015;23(3):477-87.
20. 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.
21. Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, Darras BT, et al. Onasemnogene abeparovvec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(4):284-93.
22. Palacino J, Swalley SE, Song C, Cheung AK, Shu L, Zhang X, et al. SMN2 splice modulators enhance U1-pre-mRNA association and rescue SMA mice. *Nat Chem Biol.* 2015;11(7):511-7.
23. Cheng AJ, Hwee DT, Kim LH, Durham N, Yang HT, Hinken AC, et al. Fast skeletal muscle troponin activator CK-2066260 increases fatigue resistance by reducing the energetic cost of muscle contraction. *J Physiol.* 2019;597(17):4615-25.
24. Rudnicki SA, Andrews JA, Duong T, Cockroft BM, Malik FI, Meng L, et al. Reldesemtiv in Patients with Spinal Muscular Atrophy: a Phase 2 Hypothesis-Generating Study. *Neurotherapeutics.* 2021;18(2):1127-36.
25. Long KK, O'Shea KM, Khairallah RJ, Howell K, Paushkin S, Chen KS, et al. Specific inhibition of myostatin activation is beneficial in mouse models of SMA therapy. *Hum Mol Gen.* 2019;28(7):1076-89.