Antisense-Oligonukleotide I

Chemische Modifikationen, Wirkmechanismen und therapeutischer Einsatz bei neurodegenerativen Erkrankungen*

C. D. Wurster¹, A. C. Ludolph¹, D. Lehmann^{1,2}, H. Graf²

¹Universität- und Rehabilitationskliniken Ulm, Neurologische Universitätsklinik, Ulm; ²Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie III, Ulm

Schlüsselwörter

Antisense-Oligonukleotide, spinale Muskelatrophie (SMA), Nusinersen, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Chorea Huntington

Zusammenfassung

Molekulargenetische Untersuchungen konnten die Pathomechanismen vieler neurodegenerativer Erkrankungen aufklären, jedoch standen lange Zeit keine krankheitsmodifizierenden Therapieoptionen zur Verfügung. Dies änderte sich seit der Einführung von sogenannten Antisense-Oligonukleotiden in die klinische Praxis. Im Jahr 2016 wurden erstmals Antisense-Oligonukleotide zur Behandlung der spinalen Muskelatrophie und der Muskeldystrophie Duchenne zugelassen. In der Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden waren Hürden zu überwinden und chemische Modifikationen notwendig, die deren Einsatz erst möglich machten. In diesem Artikel stellen wir Prinzipien dieser chemischen Modifikationen und Wirkmechanismen von Antisense-Oligonukleotiden vor. Darüber hinaus geben wir einen Überblick über den aktuellen Stand der Wissenschaft zu verschiedenen Antisense-Oligonukleotiden und fokussieren dabei auf neuromuskuläre und neurodegenerative Erkrankungen wie die spinale Muskelatrophie, die Muskeldystrophie Duchenne, die myotone Dystrophie, Chorea Huntington und die Amyotrophe Lateralsklerose.

Keywords

Antisense oligonucleotides, spinal muscular atrophy (SMA), nusinersen, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington's disease (HD)

Summary

Efforts in molecular biology and genetics provided considerable insights into the pathomechanisms of neurodegenerative disorders, but disease-modifying treatment options were scarce for decades. This changed since antisense oligonucleotide strategies could be translated from the bench to the clinic. In the year 2016, two antisense oligonucleotides were approved for the treatment of spinal muscular atrophy and for Duchenne muscular dystrophy. The development of antisense oligonucleotides was challenging and several chemical modifications were necessary to improve their drug-like properties and their successful introduction into clinical practice. In this review, we provide insights into the chemical modifications and the mechanism of action of antisense oligonucleotides. Moreover, we give an overview on several antisense oligonucleotides for the treatment of neurodegenerative or neuromuscular disorders and focus on spinal muscular atrophy, Duchenne muscular dystrophy, myotonic dystrophy, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis.

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. med. Heiko Graf
Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie III
Leimgrubenweg 12–14, 89073 Ulm
Tel. 0731/50061401, Fax 0731 500 61402
heiko.graf@uni-ulm.de

Antisense oligonucleotides I: chemical modifications, mechanism of action, treatment options in neurodegenerative disorders

Nervenheilkunde 2018; 37: 809–817
eingegangen am: 31. August 2018
angenommen am: 11. September 2018

* Dieser Artikel basiert auf (106)

In den letzten Jahrzehnten konnten durch molekulargenetische Untersuchungen beeindruckende Fortschritte in der Aufklärung der Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen erzielt werden. Dennoch war der Transfer dieser Erkenntnisse in die klinische Praxis bis zuletzt eine große Herausforderung und es standen kaum Therapieoptionen zur Verfügung, die den Verlauf dieser Erkrankungen modifizierten. Dies änderte sich mit der Zulassung des Antisense-Oligonukleotids Eteplirsen für die Behandlung der Muskeldystrophie Duchenne im September 2016 durch die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA (United States Food and Drug Administration). Im Dezember 2016 wurde das Antisense-Oligonukleotid Nusinersen zur Behandlung der spinalen Muskelatrophie zugelassen.

Antisense-Oligonukleotide (ASO) sind synthetische einzelsträngige Nukleinsäuren, die über Watson-Crick-Basenpaarung an die komplementäre Sequenz der prä-mRNA oder mRNA binden und damit deren Funktion modulieren (1). Es stehen damit Substanzen zur Verfügung, die bereits an frühe Pathomechanismen ansetzen, Transkription und Translation modifizieren und gezielt die Synthese krankheitsfördernder Proteine beeinflussen (2).

Im Jahr 1978 konnte erstmals erfolgreich in Zellkulturen nachgewiesen werden, dass ein ASO, das komplementär an die mRNA des Rous-Sarkoma-Virus bindet, die Proteinexpression inhibieren kann (3, 4). Dennoch benötigte es Jahrzehnte bis zur Zulassung von ASOs zur Behandlung neurologischer Erkrankungen. Die Entwicklung von ASOs für den klinischen Einsatz war mit großen Herausforderungen verbunden, da unmodifizierte Oligonukleotide aufgrund ihrer chemischen Struktur

tur schnell durch ubiquitär vorkommende Endo- oder Exonukleasen abgebaut werden (5). Demzufolge waren zunächst zahlreiche chemische Modifikationen erforderlich, die zusammenfassend die Stabilität/Resistenz gegenüber Nukleasen, die Spezifität zur Bindung an die entsprechende RNA, die Halbwertszeit und die Biodistribution (Verteilung in Geweben/Zellen) von ASOs verbesserten (2, 6).

Chemische Modifikationen

Die erste und wichtigste chemische Modifikation war die die Phosphothioat-Modifikation, in der ein Sauerstoffatom der Phosphodiestergruppe durch Schwefel ersetzt wurde und damit die Resistenz gegenüber Nukleasen und die Aufnahme in Zellen verbesserte (7). Darüber hinaus werden durch die Phosphothioat-Modifikation Endonukleasen (z. B. RNase H1) aktiviert, die wiederum zur Degradation der Ziel-mRNA führen; ein entscheidender Wirkmechanismus der ASOs (2). Eine weitere wesentliche chemische Modifikation bestand in der Veränderung der Zuckerbausteine. So konnte durch Methylierung (2'-O-Me) oder Methoxyethylierung (2'-MOE) der 2'-OH-Gruppe des Riboseringes die Affinität zur Ziel-RNA und die Resistenz gegenüber Nukleasen weiter erhöht werden. Allerdings aktivieren diese derart veränderten ASOs nicht RNase H1, führen damit nicht zum Abbau der mRNA, und hätten sich daher nur für die Modulation von Spleißprozessen (splicing) oder zur Inhibition der Translation geeignet (8). Diese Limitation motivierte die Entwicklung chimerischer ASOs mit einem modifizierten Phosphothioat-Grundgerüst, das von 2'-O-Me oder 2'-MOE modifizierten Oligonukleotiden an deren Enden flankiert wird (8). Diese 'Gapmer' ASOs ermöglichen den Abbau der Ziel-mRNA durch Aktivierung der RNase H1 durch die Zentralregion, während die äußeren Anteile des ASOs die erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen und die verbesserte Bindungsaffinität gewährleisten (8). Weitere chemische Modifikationen umfassen bei den *locked* Nukleinsäuren (LNA) die Ausbildung eines zyklischen Ethers zwischen der 2'-OH-Gruppe und des Riboseringes. Die

LNAs weisen ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen und eine erhöhte Bindungsaffinität auf. Sie aktivieren wiederum nicht RNase H1, sodass auch hier Gapmer bzw. chimerische Modifikationen erforderlich sind (9). Zudem wurde eine erhöhte Hepatotoxizität der LNAs beobachtet, die wiederum durch die Kombination mit 2'-MOE modifizierten Nukleinsäuren reduziert werden kann. Andere Modifikationen umfassen den Einbau von Morpholino-Monomere anstelle des Riboseringes in Oligonukleotide. Diese Morpholino-ASOs sind wiederum sehr resistent gegenüber dem Abbau durch Nukleasen und interagieren aufgrund ihrer neutralen Ladung weniger mit Proteinen. Allerdings aktivieren sie nicht RNase H1 und werden daher vorwiegend zur Inhibition der Translation eingesetzt (2, 10). Zwischenzeitlich wurden eine Vielzahl chemischer Modifikationen entwickelt, die die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften von ASOs verbesserten (1, 2, 11, 12).

Trotz der erfolgreichen Anstrengungen zur Verbesserung der chemischen Struktur, die den therapeutischen Einsatz vorantreiben, bringt die Entwicklung der ASO-Therapie bei neurologischen Erkrankungen weiterhin große Herausforderungen mit sich. Ein limitierender Faktor der klinischen Anwendung bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) liegt in der unzureichenden Überwindung von Membranbarrieren. Aufgrund ihrer Größe und Ladung diffundieren ASOs nicht durch eine intakte Blut-Hirn-Schranke (2). So gelangen bei systemischer Gabe von ASOs nur etwa 1% der verabreichten Menge in das ZNS (6, 13, 14). Derzeit konzentrieren sich wissenschaftliche Untersuchungen auf die Entwicklung geeigneter Applikationsformen und -systeme. Die Verbesserung der rezeptorvermittelten Endozytose von ASOs mittels monoklonaler Antikörper (15), zellpenetrierender Peptide (CPP) (16), Nanopartikelsysteme (17) oder (Adeno-) Virusvektoren (18) sind nur einige Beispiele hierfür und könnten zukünftig die zelluläre Aufnahme und systemische (intravenöse, subkutane, orale und nasale) Gabe ermöglichen. Derzeit müssen die meisten der zur Verfügung stehenden ASOs zur Behandlung neurologischer Er-

krankungen jedoch noch intrathekal mittels Lumbalpunktion verabreicht werden.

Grundlegende Wirkmechanismen von ASOs

ASO bewirken ihre Effekte in Abhängigkeit ihrer chemischen Struktur und ihrer Zielstruktur durch verschiedene molekulare Wirkmechanismen (2, 11, 12). Grundsätzlich unterscheidet man Gruppen von ASOs, die zum Abbau der RNA führen, von denen, die Translation und/oder Transkription modulieren ohne die RNA abzubauen. Wie erwähnt können ASOs aufgrund ihrer chemischen Struktur das Enzym RNase H aktivieren, das physiologisch RNA-DNA-Heteroduplexe erkennt und den RNA-Strang abbaut, der nach der Genexpression nicht mehr benötigt wird. Die Bindung von ASOs an ihre Ziel-mRNA imitiert diese DNA-RNA-Paarung. Durch Aktivierung der RNase H1 wird die Ziel-mRNA abgebaut. Dies führt letztlich zur verminderten Synthese des entsprechenden Proteins (12, 19). Andere Wirkmechanismen von ASOs zur Veränderung der Proteinbiosynthese umfassen wiederum die Inhibition der Translation oder die Modulation der RNA-Stabilität ohne dabei den Abbau der RNA zu bewirken (12) (► Abb. 1).

ASOs bei spinaler Muskelatrophie (SMA)

Aufgrund der beeindruckenden Ergebnisse aus klinischen Studien bei Kindern mit SMA, wird das ASO Nusinersen (Spinraza®) als Paradebeispiel für den Wirksamkeitsnachweis bei neurologischen Erkrankungen herangezogen (20). Die SMA ist eine autosomal-rezessive vererbte Erkrankung, bei der es zur progressiven Degeneration der alpha-Motoneurone kommt. Klinisch ist die Erkrankung durch eine proximale spinale und bulbäre Muskelschwäche und -atrophie gekennzeichnet. Aufgrund der im Verlauf möglichen respiratorischen Insuffizienz geht die Erkrankung mit einer verminderten Lebenserwartung einher. In Abhängigkeit des klinischen Phänotyps und des Alters der Betrof-

fenen bei klinischer Erstmanifestation, werden 4 Typen (Typ 1 bis 4) der Erkrankung unterschieden. Klinisch am schwersten betroffen sind Patienten mit SMA Typ 1 (Werdnig-Hoffmann), bei denen klinische Symptome der Erkrankung bereits vor dem 6. Lebensmonat auftreten. Das freie Sitzen ist den betroffenen Säuglingen nicht möglich und die Überlebenszeit beträgt im Spontanverlauf in der Regel nur wenige Monate (21).

Pathogenetisch liegt der Erkrankung zumeist eine homozygote Deletion oder Mutation im SMN1 (survival motor neuron)-Gen auf Chromosom 5q13 zugrunde. Das SMN1-Gen kodiert das ‚survival motor neuron‘ (SMN) Protein, das für die Funktion von alpha-Motoneurone notwendig ist (21–23), und aufgrund der Genveränderung bei Patienten mit SMA nicht synthetisiert wird. Durch evolutionäre Gendopplung liegen beim Menschen jedoch ein oder mehrere SMN2-Gene vor, die sich vom SMN1-Gen in nur wenigen Basen unterscheiden (24). Eine Basenänderung im Exon 7 des SMN2-Gens führt dazu, dass durch posttranskriptionelles Spleißen das Exon 7 entfernt wird und daher nur eine geringe Menge (ca. 10%) an vollständig funktionsfähigem SMN-Protein produziert wird (21). Die verminderte Synthese funktionsfähigen Proteins über SMN2 ist bei Gesunden von untergeordneter Bedeutung. Motorische Funktionen bei Patienten mit SMA sind jedoch von dieser geringeren Menge des SMN-Proteins abhängig. So sind bei Patienten mit einer höheren Anzahl an SMN2-Genkopien größere Mengen an SMN-Protein vorhanden und geringere motorische Funktionseinschränkungen zu beobachten (25).

Im Dezember 2016 wurde durch die FDA das ASO Nusinersen zur Behandlung der 5q-assoziierten SMA zugelassen. Im Juni 2017 folgte die Zulassung durch die Europäische Arzneimittelkommission EMA. Das 2'-MOE Phosphorthioat ASO Nusinersen (26) bindet an eine spezifische Sequenz des Introns 7 der SMN2 prä-mRNA und erhöht durch die Inhibition von Spleißfaktoren den Einschluss von Exon 7 in die mRNA. Dies wiederum führt zur einer vermehrten Synthese von SMN-Protein über SMN2, und damit zu einem klinisch weniger schweren Phänotyp (27, 28). In ei-

Abb. 1 Schematische Darstellung wesentlicher Wirkmechanismen von Antisense-Oligonukleotiden (ASOs, angelehnt an 11). Durch Bindung von ASOs kann das ko- bzw. posttranskriptionelle 5'-Capping (Anfügen einer 5'-Kappe) verhindert werden, das für den Transport der RNA aus dem Kern (Nucleus) ins Zytoplasma und die darauffolgende Translation der mRNA durch Ribosomen wichtig ist (1. Binden ASOs an Intron-Exon-Übergänge so können Spleißprozesse („splicing“) moduliert werden (2 oder Translation durch Bindung von ASOs an das Poly(A)-Ende inhibiert werden (3. Ein wichtiger Wirkmechanismus vieler ASOs ist die Aktivierung der RNase H1 die den Abbau der entsprechenden mRNA induziert (4). Durch die direkte Bindung des ASO an die mRNA kann weiterhin die Vereinigung der ribosomalen 60S- und 40S-Untereinheit verhindert werden und die Translation der mRNA am Ribosom und damit die Proteinbiosynthese nicht stattfinden (5). Die direkte Bindung von ASOs an mikroRNA-Sequenzen (6, kann deren eigentliche komplementäre mRNA nicht binden. Darüber hinaus können ASO an natürliche Antisense-Transkripte (natural antisense transcripts (NAT), d. h., endogene RNA-Stränge, die komplementär zu anderen endogenen RNA-Strängen binden und deren Funktion modulieren) binden und damit Proteinbiosynthese verändern. (*) Die Bindung von ASOs an mikroRNA-Sequenzen oder NATs kann ebenfalls im Zellkern stattfinden (modif. nach 11, reref)

ner Phase-I-Studie wurden die Sicherheit und die pharmakokinetischen Eigenschaften von Nusinersen an 28 Patienten mit SMA Typ 2 oder 3 überprüft (29) (ClinicalTrials.gov. NCT01494701 und NCT01780246). Neben dem guten Sicherheitsprofil der Substanz zeigte sich bereits nach einer einmaligen intrathekalen Gabe eine klinische Wirksamkeit mit Verbesserung der motorischen Funktionen der Patienten. Diese Ergebnisse konnten in einer Phase-II-Studie an Patienten mit SMA Typ 1 über einen Beobachtungszeitraum bis zu 32 Monaten repliziert werden (26). Zudem wurde eine signifikante Verbesserung der motorischen Funktionen und der Überlebensraten sowie eine geringere Notwendigkeit der permanenten Beatmung der Patienten im Vergleich zu Studienbeginn bzw. zum Spontanverlauf beobachtet (Clinical-

Trials.gov. NCT01839656). Das ASO Nusinersen führte zur effizienten Korrektur von SMN2 Spleißmechanismen und man geht von einer 2- bis 6-fachen Erhöhung von SMN2-Transkripten, und damit von einer erhöhten Menge an funktionstüchtigem SMN-Protein aus, die in diesem Ausmaß bislang nicht bei Patienten mit SMA nachgewiesen werden konnte. In einer kürzlich publizierten Phase-III-Studie (30) wurde bei etwa der Hälfte der behandelten Patienten (bei 41% in der Zwischenanalyse, bei 51% in der Endauswertung) ebenfalls eine signifikante Verbesserung der motorischen Funktionen nachgewiesen. Diese Verbesserungen waren in der Placebogruppe wiederum nicht zu beobachten. Die positiven Ergebnisse führten zum vorzeitigen Ende der Studie und Nusinersen wurde zur Zulassung bei der FDA eingereicht. Eine wei-

tere Phase-III-Studie (ClinicalTrials.gov. NCT02292537) an 126 Patienten mit SMA Typ 2 und 3 wurde ebenfalls aufgrund der signifikanten Verbesserung motorischer Funktionen in Interimsanalysen vorzeitig beendet. In einer noch andauernden Open-label-Studie an präsymptomatischen Patienten mit SMA wird die Wirksamkeit des ASOs in Abhängigkeit vom Therapiebeginn untersucht. Auch hier zeigten Zwischenanalysen beeindruckende Ergebnisse und Patienten erreichten im Mittel nach 317 Tagen nach Beginn der Behandlung motorische Meilensteile, die im Spontanverlauf der Erkrankung zuvor nicht beobachtet werden konnten.

Während der Zulassungsstudien waren keine schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen während der Behandlung mit Nusinersen aufgetreten. So wurde zunächst lediglich auf unspezifische Nebenwirkungen wie Blutgerinnungsstörungen und Störungen der Nieren- und Leberfunktion hingewiesen, die zuvor bei der systemischen Gabe anderer ASOs beobachtet wurden. Im Juli 2018 informierte der Hersteller jedoch über das Auftreten eines kommunizierenden Hydrozephalus bei 4 Kindern und einer Erwachsenen mit SMA während der Behandlung mit Nusinersen, der nicht mit einer Meningitis oder Blutung in Verbindung stand.

Neben Nusinersen befinden sich weitere ASOs für die Behandlung der SMA in der Entwicklung. Im Tierversuch wurde ein ASO untersucht, das an „long non-coding“ RNA-Stränge bindet, die vom komplementären Strang des SMN-Gens gebildet werden (SMN-AS1) und die SMN-Proteinsynthese hemmen. Durch die Inhibition von SMN-AS1 durch das ASO konnte die Hemmung der SMN-Biosynthese aufgehoben werden und in neuronalen Zellkulturen sowie im ZNS erhöhte Konzentration an SMN nachgewiesen werden (31). Bemerkenswerterweise konnte durch die gleichzeitige Gabe eines weiteren ASOs, das Spleißprozesse von SMN2 moduliert (z. B. Nusinersen), die Menge an SMN-Protein noch weiter erhöht und Überlebensraten im Tiermodell verbessert werden.

Die Einführung des ASOs Nusinersen gilt schon jetzt als Meilenstein in der Behandlung der SMA. Nicht unerwähnt blei-

ben soll jedoch in diesem Zusammenhang die Genersatztherapie in der Behandlung der SMA. So konnte in einer Phase-I/II-Studie an 15 Patienten mit SMA Typ 1 gezeigt werden, dass mittels eines Adenovirusvektors erfolgreich eine unveränderte menschliche SMN1-Gensequenz intravenös verabreicht werden konnte (32) (ClinicalTrials.gov. NCT02122952). Bei guter Verträglichkeit der Substanz waren im Vergleich zum natürlichen Verlauf der Erkrankung bereits nach einer Einmalgabe signifikante Verbesserungen motorischer Funktionen und längere Überlebensraten zu beobachten.

ASO bei Muskeldystrophie Duchenne

Die Muskeldystrophie Duchenne (DMD) ist eine X-chromosomale vererbte Muskelkrankung mit klinischer Erstmanifestation zwischen dem 1. und 6. Lebensjahr. Die Erkrankung ist klinisch gekennzeichnet durch eine primär im Beckengürtelbereich lokalisierte progrediente Muskelschwäche und -atrophie, die im weiteren Verlauf auf die Schultergürtelmuskulatur übergeht. Durchschnittlich 10 Jahre nach klinischer Erstmanifestation sind die erkrankten Jungen gehunfähig. Aufgrund respiratorischer und auch kardialer Dysfunktionen ist die DMD mit einer verminderten Lebenserwartung verbunden und verläuft meist zwischen der 2. und 3. Lebensdekade letal (33, 34). Die Erkrankung ist pathogenetisch durch eine Mutation im Dystrophin-Gen auf dem X-Chromosom (Xp21) bedingt, die zu einem fehlenden oder vermindertem funktionstüchtigem Dystrophin-Protein führt.

Dystrophin ist ein Strukturprotein der Skelett- und Herzmuskelzellen und Bestandteil des Dystrophin-Glykoproteinkomplex, und damit ein wichtiger Bestandteil der molekularen Verbindung zwischen extrazellulärer Basalmembran und intrazellulärem Zellskelett. Etwa 60% der Dystrophin-Mutationen sind Insertionen oder Deletionen, die den Leserahmen (reading frame) verändern oder zerstören. In etwa 40% der Fälle sind Punktmutationen nachzuweisen (2, 35–37). Bei der Mehrzahl der Patienten mit DMD ist Dystrophin nicht

nachzuweisen (38, 39). Mit der Muskeldystrophie vom Typ Becker (BMD) ist eine klinisch mildere Form dieser Erkrankung beschrieben, die durch die Reduktion der Menge oder eine veränderten Größe des Dystrophin Proteins verursacht ist (37).

Da mehrere bzw. verschiedene genetische Veränderungen im Dystrophin-Gen zur DMD oder BMD führen, kann kein einzelnes ASO allein zur Behandlung des gesamten Spektrums der Muskeldystrophien eingesetzt werden. Daher soll der Fokus in diesem Artikel auf zwei ASOs liegen, deren Wirkmechanismen darauf beruhen, das Exon 51 zu eliminieren. Das „skipping“ (Überlesen) des Exons 51 stellt den Leserahmen der Dystrophin-RNA wieder her und ermöglicht die Translation eines zwar verkürzten, aber zumindest teilweise funktionsfähigen Proteins (2, 40, 41); und damit eine phänotypische Konversion der DMD in die klinisch mildere Verlaufsform BMD (42, 43).

Das 2'-O-Me Phosphorothioat ASO Drisapersen bindet selektiv an das Exon 51 und führt zu dessen „skipping“ mit der Folge eines um den in diesem Exon kodierten Abschnitt verkürzte Variante des Dystrophin-Proteins (2, 41, 44). Nach 25 Wochen einer einmal wöchentlichen subkutanen Gabe des ASOs, wurde eine signifikante Verbesserung der Gehstrecke in 6 Minuten (6-Minuten-Gehstreckentest) im Vergleich zu Placebo beobachtet (44) (ClinicalTrials.gov. NCT01153932). Allerdings waren diese motorischen Verbesserungen nach 49 Wochen im Vergleich zu Placebo nicht mehr nachzuweisen (44, 45). Eine weitere Untersuchung konnte nach 48 Wochen ebenfalls keine signifikanten Verbesserungen im 6-Minuten-Gehstreckentest nachweisen, so dass das ASO Drisapersen die Zulassungsvoraussetzungen verfehlte (2, 45).

Das „Morpholino“ ASO Eteplirsen bindet ebenfalls an Exon 51 der Dystrophin prä-mRNA (46). Unter Anwendung 6 Dosen der intramuskulär verabreichten Substanz konnte in Muskelbiopsien unter der höchsten Dosierung (0,9 mg) eine erhöhte Menge an Dystrophin-Protein nachgewiesen werden. Weiterhin traten keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf (47, 48). Allerdings waren auch nach 24 Wochen der Behandlung keine signifikanten

Verbesserungen motorischer Funktionen im 6-Minuten-Gehstreckentest nachzuweisen. Nach 48 Wochen der Behandlung zeigte sich hingegen eine signifikante Verbesserung in motorischen Funktionen, während sich die Patienten in der Placebo-Gruppe – wie zu erwarten – verschlechterten. Zudem zeigte sich eine Erhöhung von Dystrophin in Muskelgewebe bei den behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe, was ebenfalls als In-vivo-Beweis für einen therapeutischen Effekt beim Mensch gewertet werden kann. Aufgrund der positiven Ergebnisse, die in einer weiteren Untersuchung bestätigt werden konnten (49), wurde Eteplirsen im September 2016 für die Behandlung von Patienten mit DMD und nachgewiesener Genmutation, die für das Exon-51-skipping zugänglich ist, zugelassen. Diese Genmutation trifft jedoch für nur etwa 13% der Patienten mit DMD zu. Wie erwähnt können mehrere genetische Veränderungen im Dystrophin-Gen zur Muskeldystrophie führen, sodass wissenschaftliche Studien sich auf die Entwicklung von ASOs konzentrieren, die ein „multitoxon skipping“ ermöglichen. Hiervon könnten wiederum 50–70% der Patienten mit DMD profitieren (50). Darüber hinaus befinden sich die ASOs Golodirsen (Exon 53-skipping) (ClinicalTrials.gov. NCT 02500381) und Casimersen (Exon 45-skipping) (ClinicalTrials.gov. NCT 03532542) in Phase-III-Studien.

ASOs bei Myotoner Dystrophie

Myotone Dystrophien (MD) sind autosomal-dominant vererbte Multisystemerkrankungen, die klinisch durch die distale Myotonie, proximale Muskeldystrophie, Herzrhythmusstörungen, Katarakt und endokrinen Störungen wie Diabetes mellitus oder Hypogonadismus gekennzeichnet sind (51). In Abhängigkeit vom klinischen Bild und der genetischen Veränderungen werden zwei Subtypen der MD unterschieden. Das Vollbild der Erkrankung wurde erstmals 1909 beschrieben und ist seither unter Myotone Dystrophie Curschmann-Steinert (Myotone Dystrophie Typ 1; MD1) bekannt. Der MD1 liegt eine CTG-Trinukleotid-Expansion im 3' nicht translatier-

ten Bereich (UTR) des Myotonen Dystrophie Proteinkinase-Gens (DMPK1) auf Chromosom 19q13.3 zugrunde. Das Gen kodiert für eine Myosinkinase in der Skelettmuskulatur (51–54). Später wurde eine milder verlaufende Form der Multisystemerkrankung mit vorwiegend proximaler (statt distaler) Paresen, Myalgien und Katarakt beschrieben. Eine klinische fassbare Myotonie ist bei dieser Erkrankung häufig die Ausnahme (51, 55–58). Der zugrunde liegende Gendefekt liegt in einer Tetranukleotid-Expansion (CCTG) im Intron 1 des 5' nicht translatierten Bereichs des Zinkfingerprotein-9-Gens (CNBP) auf Chromosom 3q21 (59, 60). Patienten mit vorwiegend proximalen Paresen und Nachweis eines CCTG-Repeats auf Chromosom 3q21 werden daher als MD Typ 2 (proximale myotone Myopathie, PROMM, MD2) klassifiziert (61).

Die Mutationen führen zu veränderten RNAs mit CUG- bzw. CCUG-Wiederholungen, die wiederum im Zellkern verbleiben und alternative Spleißfaktoren wie das „Muscleblind-like Protein 1“ (MBNL) beeinflussen. Die veränderten Spleißprozesse der prä-mRNAs scheinen wiederum für die meisten Symptome von MD1 und MD2 verantwortlich zu sein. Ziel der ASOs zur Behandlung der MD war demnach die Reduktion der CUG-Expansionen in der mRNA.

Ein von Mulders und Kollegen (62) entwickeltes 2'-MOE Phosphorothioat ASO inhibiert die RNA-Expression des DMPK1-Gens und konnte die Menge der im Zellkern aggregierten Ribonukleinsäuren signifikant vermindern. Weiterhin wurde in einem MD1-Tiermodell eine verminderte Anzahl toxisch wirkender RNA, welche CUG-Wiederholungen enthielt, nachgewiesen. Darüber hinaus war eine Normalisierung des nachfolgenden Spleißprozesses beobachtet worden. Eine weitere Studie mit ähnlich wirksamen ASOs zeigte im MD1-Mausmodell, dass die systemische Gabe der ASOs zu einer verminderten Konzentration an RNA mit CUG-Wiederholungen in Skelettmuskeln führte und anschließende Spleißprozesse normalisiert werden konnten, einhergehend mit einer klinischen Verbesserung der Myotonie. Bemerkenswerterweise konnte die klinische Verbesserung auch noch ein Jahr nach der

Behandlung beobachtet werden (63). Eine andere Studie untersuchte die Wirksamkeit eines weiteren hochaffinen ASOs bei MD1 (64). Die systemische Gabe führte zu einer Verminderung der DMPK mRNA um bis zu 90% in Skelettmuskeln. Ähnlich beeindruckende Ergebnisse konnten in Herzmuskeln (bis zu 50%) und mehreren Skelettmuskeln (bis zu 70%) bei transgenen Mäusen und Affen demonstriert werden und diese Effekte waren noch 13 bis 16 Wochen nach Behandlung nachzuweisen.

Aufgrund dieser Befunde aus tierexperimentellen Untersuchungen wurde die Arzneimittelsicherheit des ASOs ISIS-DMPKRx (ClinicalTrials.gov. NCT023412011) im Rahmen einer placebokontrollierten Phase-I/II-Studie an Erwachsenen mit MD1 überprüft. Es wurde keine schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen beobachtet (65), erste Ergebnisse zur Wirksamkeit der Substanz werden in Kürze erwartet.

ASOs bei Chorea Huntington

Chorea Huntington (CH) ist eine monogenetische und autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, die klinisch durch unwillkürliche hyperkinetische Bewegungsstörungen, Dystonien, kognitive Defizite und psychische Symptome gekennzeichnet ist. Pathogenetisch liegt der Trinukleotid-Erkrankung eine Amplifikation des CAG-Nukleotids im Exon 1 des Huntingtin (HTT)-Gens auf dem kurzen Arm des Chromosom 4 zugrunde. Das HTT-Gen kodiert für das Huntingtin-Protein, das in eine Reihe zellulärer Funktionen involviert und für den Erhalt der Axonstabilität bedeutend ist (66). In der Normalbevölkerung liegen zwischen 6 und 26 CAG-Wiederholungen vor. Beim Vorliegen von 37 bis 39 CAG-Wiederholungen tritt die Erkrankung mit unvollständiger Penetranz auf, während ab 40 CAG-Wiederholungen CH mit vollständiger Penetranz auftritt. Bemerkenswert ist die meiotische Instabilität der CAG-Sequenz ab 27 Wiederholungen (67).

Das mutierte Huntingtin-Protein enthält aufgrund der CAG-Wiederholungen eine verlängerte Polyglutamin-Sequenz,

das die intraneuronale Aggregation des Proteins, zytotoxische Effekte und eine veränderte Interaktion mit anderen Proteinen und Kaskaden ermöglicht, an deren Ende eine gestörte Zellfunktion und Zelltod stehen (68). Besonders vulnerabel gegenüber diesen toxischen Effekten scheinen dabei offenbar die efferenten striatalen Neurone (medium spiny neurons) zu sein (69).

Seit der klinischen Erstbeschreibung der Erkrankung 1872 stehen keine therapeutischen Optionen zur Verfügung, die den Krankheitsverlauf modulieren und die Behandlung beschränkt sich auf supportive Maßnahmen. Dies scheint sich mit der Entwicklung von ASO-Strategien zu ändern. Im Jahr 2012 untersuchten Kordasiewicz und Mitarbeiter im Mausmodell und in vivo die Effekte eines 2'-MOE Phosphorothioat ASOs, das selektiv an die HTT-mRNA bindet und das Enzym RNase H aktiviert. Nach intrathekalen Infusion des ASOs in symptomatischen CH Mäusen zeigte sich eine signifikante Verlangsamung des Krankheitsverlaufs und eine verminderte Konzentration von Huntingtin-Protein. Das ASO bewirkte damit einen enzymatischen (RNase H) vermittelten Abbau der HTT-mRNA. Interessanterweise waren dabei länger eine verminderte Huntingtin-Proteinkonzentration nachzuweisen als der hemmende Effekt des ASOs auf die mRNA anhielt (12, 70). Im Tiermodell mit schwerem Krankheitsverlauf konnte sogar eine Verminderung der mutierten HTT-mRNA um bis zu 50–80% nachgewiesen werden. Wenngleich die Gabe des ASOs mit keinen schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen verbunden war, so muss berücksichtigt werden, dass nicht nur mutiertes, sondern die Gesamtkonzentration von Huntingtin-Protein reduziert wurde. Demnach fokussierten sich Folgestudien auf die spezifische Inhibition mutanter HTT-Allele und zeigen erste Erfolge (71).

Trotz der anhaltenden und generellen Diskussion, inwiefern Ergebnisse aus Tiermodellen auf den Menschen übertragbar sind, so belegen die tierexperimentellen Untersuchungen zumindest die prinzipielle Anwendbarkeit. Kürzlich wurde eine Phase-I/IIa-Studie an Patienten mit CH in frühen klinischen Stadien beendet, die mit einem intrathekal verabreichten ASO (IO-

NIS-HTTRx; ClinicalTrials.gov. NCT 02519036) behandelt wurden. Bei der Anwendung des ASOs zeigten sich keine schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen und einer Pressemitteilung zufolge waren erste Verbesserungen klinischer Symptome zu beobachten.

ASOs bei Amyotropher Lateralsklerose

Die ALS ist eine neurodegenerative Motoneuronenerkrankung mit einem progredienten Funktionsverlust des ersten und zweiten Motoneurons. Klinische Symptome der Erkrankung umfassen Faszikulationen, progressive Muskellähmung und -atrophie bis hin zur respiratorischen Insuffizienz. Die Überlebenszeit ist deutlich verringert und Betroffene versterben in der Regel 2 bis 4 Jahre nach Diagnosestellung (72–74). In Europa beträgt die Inzidenz 1,7–3,0 pro 100 000 Einwohner (75, 76). Die der ALS zugrunde liegenden Pathomechanismen sind nicht vollständig geklärt. Studien bekräftigen jedoch, dass das phosphorylierte 43-kDa Transactivating Response Region (TAR) DNA-Binding-Protein (pTDP-43) eine zentrale Rolle in der ALS-Pathologie spielt (77, 78). Es wird angenommen, dass eine Aggregation und fortschreitende Akkumulation von pTDP-43 in Neuronen und Oligodendrozyten zum Verlust von deren physiologischer Funktion führt (79). Übereinstimmend mit dem klinischen Verbreitungsmuster scheint sich die pTDP-43-Pathologie durch Zell-zu-Zell-Übertragung mittels axonalem Transport und durch synaptische Kontakte kortikaler Neurone in andere Hirnregionen und das Rückenmark auszubreiten (80).

Etwa 95% der ALS-Erkrankungen treten sporadisch auf (sALS), wohingegen etwa 5–10% der Fälle vererbt werden (76, 81). Verschiedene Genmutationen konnten sowohl mit der sALS als auch der familiären (fALS) ALS assoziiert werden (82, 83). Das auf Chromosom 21q lokalisierte SOD1 (Superoxid-Dismutase 1)-Gen ist das am besten untersuchte ALS-assoziierte Gen (83, 84). Allein im SOD1-Gen wurden über 180 Mutationen beschrieben, die für bis zu 20% der fALS- und bis zu 2–3% der sALS-Fälle ursächlich sind (85, 86). SOD1 ko-

diert die Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (Cu/Zn SOD), ein Metalloenzym, das Kupfer und strukturelle Zinkionen bindet und Superoxidradikale katalysiert (87). Obwohl die Pathomechanismen noch nicht gänzlich verstanden sind, wird angenommen, dass mutierte SOD1-Formen zu einer Abnahme der Konformationsstabilität führen und eine Fehlfaltung des SOD1-Proteins begünstigen (88). Man ging davon aus, dass durch diese Fehlfaltung schädliche bzw. toxische Wirkungen entstehen und zur SOD-assoziierten ALS führen (84). Mittlerweile bestehen jedoch Hinweise darauf, dass der dadurch bedingte Funktionsverlust des Proteins bei der Pathogenese wesentlich ist (89). Es schien daher folglich richtig eine ASO-Strategie zu entwickeln, die die SOD1-Expression moduliert, insbesondere da eine verminderte Konzentration an mutiertem SOD1-Protein den Krankheitsprogress verlangsamen kann (90).

Im Tiermodell reduzierte ein 2'-MOE Phosphorothioat ASO, das an die SOD1-mRNA bindet, nach intrathekalen Gabe signifikant die SOD1-Protein- und SOD1-mRNA-Konzentration im Gehirn und Rückenmark (91). Retrospektive Analysen zeigten dabei, dass bei frühzeitiger Gabe des ASOs bereits vor Symptombeginn die Krankheitsprogression verzögert und das Überleben verlängert werden kann (91). In einer randomisierten, placebo-kontrollierten Phase-I-Studie (ClinicalTrials.gov. NCT01041222) wurde das ASO bei Patienten mit SOD1-assoziiierter ALS untersucht und es zeigte sich ausgezeichnetes Sicherheits- und Verträglichkeitsprofil (92). Ein ASO der zweiten Generation (IONIS-SOD1Rx) wird in einer Phase-I/II-Studie (ClinicalTrials.gov. NCT02623699) zur Bewertung der Sicherheit, Verträglichkeit und der pharmakokinetischen Eigenschaften in einer Einzeldosis und anschließend in einer Mehrfachdosis bei Patienten mit SOD1-assoziiierter ALS untersucht.

Neben der SOD1-Pathologie konnten zuletzt Hexanukleotid-Wiederholungen in einem offenen Leserahmen des Chromosoms 9p21.72 (C9orf72) als die häufigste genetische Ursache der ALS identifiziert werden, die für ungefähr 30% der fALS und bis zu 5% der sALS-Fälle verantwortlich sind (93, 94). Die GGGGCC-Hexanu-

kleotid-Expansion tritt zwischen zwei nicht kodierenden C9orf72-Exons auf. Das Gen kodiert für ein Protein, dessen Funktion nicht vollständig geklärt ist. Es wird allerdings vermutet, dass es eine wichtige Rolle beim Membrantransport und der Autophagie spielt (95, 96). Der Verlust der normalen C9orf72-Funktion erscheint plausibel, da beeinträchtigte Autophagie und endolysosomaler Abbau bei neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet werden konnten (97). Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen in einem Zebrafisch-Modell. Das Ausschalten des C9orf72-Gens war mit einer Axonopathie und motorischen Defiziten assoziiert, die durch die Expression von humaner C9orf72-mRNA wiederhergestellt werden konnten (98). Übereinstimmend hierzu führte im Tiermodell ein homozygoter knock-out von C9orf72 zu einer Degeneration von Motoneuronen und motorischen Defiziten (99). Neben Proteinfunktionsverlusten wurden 2 Mechanismen der Funktionszunahme diskutiert: die Bildung von repetitiven RNA-Aggregaten (RNA-Foci) in neuronalen Zellkernen und die Entstehung von toxischen Dipeptid-Repeats (DPR)-Peptiden (79, 100, 101).

Die Entwicklung effizienter Behandlungsoptionen hat darüber hinaus eine hohe Priorität, da C9orf72-Repeat-Expansionen eine Hauptursache sowohl der frontotemporalen Demenz (FTD) als auch der ALS darstellt (93). In einer Studie wurden mehrere ASOs, die entweder die RNase H aktivieren oder die Interaktion zwischen der Repeat-Expansion und RNA-bindenden Proteinen blockieren, untersucht (102). Dabei konnte eine Reduktion von toxischen RNA-Foci als auch die Wiederherstellung normaler Genexpressionsmarker erzielt werden. Übereinstimmend wurde eine Verminderung verschiedener pathologischer Merkmale, einschließlich RNA-Foci und DPRs, für ASOs in primären kortikalen Neuronen von Mäusen gezeigt (103). Diese Ergebnisse wurden in einer Studie mit ASOs am Tiermodell bestätigt. Die untersuchten ASOs zielten selektiv auf Repeat-enhaltende RNAs und führten zu einer raschen RNA-Foci- und DPRs-Reduktion (104). Weitere vielversprechende Ergebnisse wurden durch ASOs, die die Expression des Ataxin-2 (ATNX2)-Gens

Fazit für die klinische Praxis

ASO sind synthetische einzelsträngige Nukleinsäuren, die an die komplementäre Sequenz der prä-mRNA oder mRNA binden und damit deren Funktion modulieren. Neben der Gentherapie stehen damit Substanzen zur Verfügung, die bereits auf Ebene der Transkription und Translation eingreifen und gezielt die Synthese krankheitsfördernder Proteine modulieren. Im Jahr 1978 konnte erstmals in Zellkulturen die Proteinexpression durch eine ASO Strategie moduliert werden. Seither waren wissenschaftliche Bemühungen erforderlich, die den Einsatz von ASO in die klinische Praxis ermöglichten. Im Jahr 2016 wurden erstmals zwei Antisense-Oligonukleotide zur Behandlung der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne und der spinalen Muskelatrophie zugelassen. Mittlerweile werden mehrere ASOs zur Behandlung neuromuskulärer und neurodegenerativer Erkrankungen im Tiermodell oder aber bereits in klinischen Studien untersucht und die bisherigen Ergebnisse hierzu sind vielversprechend. Dennoch sind weitere Entwicklungen notwendig. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Behandlung mit ASO scheinbar mit keinen schweren unerwünschten Arzneimittelwirkungen verbunden ist. Ein Nachteil ist jedoch die unzureichende Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, sodass die meisten der zur Verfügung stehenden ASOs zur Behandlung neurologischer Erkrankungen intrathekal verabreicht werden müssen. Strategien, die eine systemische und weniger invasive Applikation ermöglichen, sind jedoch bereits in Entwicklung.

Trotz dieser Einschränkungen ist insbesondere am Beispiel des ASOs Nusinersen in der Behandlung der spinalen Muskelatrophie eine vielversprechende Zukunft erkennbar und es besteht für Patienten, Behandler und Angehörige die berechtigte Hoffnung, dass in den kommenden Jahren erfolgreiche Behandlungsoptionen zur Verfügung stehen werden, die noch vor wenigen Jahren nicht vorstellbar gewesen wären.

modulieren, gezeigt. ATNX2 ist an der Pathogenese der spinocerebellären Ataxie Typ 2 aber auch als Modifikationsgen in

der TDP-43-assoziierte ALS beteiligt. Nach einmaliger Verabreichung der ASOs in das ZNS von transgenen Mäusen, konnte das Überleben deutlich verlängert werden (105).

Diese Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen oder aus klinischen Studien an Patienten lassen einen erheblichen Fortschritt in der Behandlung der ALS erhoffen.

Interessenkonflikt

Heiko Graf: keine Interessenkonflikte. Diana Lehmann: keine Interessenkonflikte. Claudia Diana Wurster: Beratertätigkeit für die Firma Hoffmann-La Roche; Honorarvorträge für die Firma Biogen sowie Teilnahme an einem AdBoard Meeting der Firma Biogen. Albert Ludolph: Unterstützung für klinische Forschungsprojekte durch AB Science, Biogen Idec, Cytokines, GSK, Orion Pharam, Novartis, TauRx Therapeutics Ltd. und TEVA Pharmaceuticals. Honorare als Berater von Mitsubishi, Orion Pharma, Novartis, Teva sowie für lectures fees von Biogen und Ionis sowie als AdBoard-Mitglied von Biogen, Treeway, Hoffmann-La Roche und Novartis.

Literatur

1. Evers MM, Toonen LJA, van Roon-Mom WMC. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 87: 90–103.
2. Bennett CF, Baker BF, Pham N, Swayze E, Geary RS. Pharmacology of Antisense Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017; 57: 81–105.
3. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 280–284.
4. Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75: 285–288.
5. Dagle JM, Weeks DL, Walder JA. Pathways of degradation and mechanism of action of antisense oligonucleotides in *Xenopus laevis* embryos. *Antisense Res Dev* 1991; 1: 11–20.
6. Khorkova O, Wahlestedt C. Oligonucleotide therapies for disorders of the nervous system. *Nat Biotechnol* 2017; 35: 249–263.
7. Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 6518–6548.
8. Mansoor M, Melendez AJ. Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regul Syst Bio* 2008; 2008: 275–295.

9. Kurreck J. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1911–1918.
10. Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 87: 46–51.
11. DeVos SL, Miller TM. Antisense Oligonucleotides: Treating Neurodegeneration at the Level of RNA. *Neurotherapeutics* 2013; 10: 486–497.
12. Schoch KM, Miller TM. Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 2017; 94: 1056–1070.
13. Banks W, Farr S, Butt W, Kumar VB, Franko MW, Morley JE. Delivery across the blood-brain barrier of antisense directed against amyloid beta: reversal of learning and memory deficits in mice overexpressing amyloid precursor protein. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1113–1121.
14. Farr SA, Erickson MA, Niehoff ML, Banks WA, Morley JE. Central and peripheral administration of antisense oligonucleotide targeting amyloid- β protein precursor improves learning and memory and reduces neuroinflammatory cytokines in Tg2576 (A β PP_{swe}) mice. *J Alzheimer's Dis* 2014; 40: 1005–1016.
15. Lee HJ, Boado RJ, Braasch D, Corey DR, Partridge WM. Imaging gene expression in the brain in vivo in a transgenic mouse model of Huntington's disease with an antisense radiopharmaceutical and drug-targeting technology. *J Nucl Med* 2002; 43: 948–956.
16. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994; 269: 10444–10450.
17. Kozlu S, Caban S, Yerlikaya F, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Riguera R, Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Dalkara T, Couvreur P, Capan Y. An aquaporin 4 antisense oligonucleotide loaded, brain targeted nanoparticulate system design. *Pharmazie* 2014; 69: 340–345.
18. Phillips MI. Antisense inhibition and adeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 177–187.
19. Cerritelli SM, Crouch RJ, Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes. *FEBS J* 2009; 276: 1494–1505.
20. Wurster C, Ludolph AC. Therapie der spinalen Muskelatrophie mit dem Antisense-Oligonukleotid Nusinersen TT – Therapy of spinal muscular atrophy with the antisense oligonucleotide nusinersen. *Nervenheilkunde* 2018; 37: 185–190.
21. Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet* 2008; 371: 2120–2133.
22. Melki J et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990; 344: 767–768.
23. Brzustowicz LM et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2–13.3. *Nature* 1990; 344: 540–541.
24. Lefebvre S et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; 80: 155–165.
25. Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmüller H, Blick S, Baasner A, Heller R. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 2006; 119: 422–428.
26. Finkel RS et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 2016; 388: 3017–3026.
27. Passini MA et al. Antisense Oligonucleotides Delivered to the Mouse CNS Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy. *Sci Transl Med* 2011; 3: 72ra18–72ra18.
28. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, Krainer AR. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 2010; 24: 1634–1644.
29. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, Norris DA, Bennett CF, Bishop KM. Results from a phase I study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* 2016; 86: 890–897.
30. Finkel RS et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2017; 377: 1723–1732.
31. d'Ydewalle C, Ramos DM, Pyles NJ, Ng SY, Gorz M, Pilato CM, Ling K, Kong L, Ward AJ, Rubin LL, Rigo F, Bennett CF, Sumner CJ. The Antisense Transcript SMN-AS1 Regulates SMN Expression and Is a Novel Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy. *Neuron* 2017; 93: 66–79.
32. Mendell JR et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2017; 377: 1713–1722.
33. Mendell JR et al. Evidence-based path to newborn screening for duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2012; 71: 304–313.
34. Bushby K et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010; 9: 77–93.
35. Flanigan KM. Duchenne and becker muscular dystrophies. *Neurol Clin* 2014; 32: 671–688.
36. Hoffman EP, Dressman D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 465–470.
37. Nowak KJ, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 2004; 5: 872–876.
38. Braun R, Wang Z, Mack DL, Childers MK. Gene therapy for inherited muscle diseases: Where genetics meets rehabilitation medicine. *Am J Phys Med Rehabil* 2014; 93: S97–S107.
39. Sienkiewicz D, Kulak W, Okurowska-Zawada B, Paszko-Patej G, Kawnik K. Duchenne muscular dystrophy: current cell therapies. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; 8: 166–177.
40. Alter J, Lou F, Rabinowitz A, Yin H, Rosenfeld J, Wilton SD, Partridge TA, Lu QL. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006; 12: 175–177.
41. Aartsma-Rus A, Janson AAM, Kaman WE, Bremmer-Bout M, den Dunnen T, JT, Baas F, van Ommen GJB, van Deutekom JCT. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 907–914.
42. van Deutekom JCT. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1547–1554.
43. Heemskerk HA et al. In vivo comparison of 2-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J Gene Med* 2009; 11: 257–266.
44. Voit T et al. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): An exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol* 2014; 13: 987–996.
45. Kole R, Krieg AM. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 87: 104–107.
46. 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: 798–810.
47. 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: 918–928.
48. Cirak S, Feng L, Anthony K, Arechavala-Gomez V, Torelli S, Sewry C, Morgan JE, Muntoni F. Restoration of the Dystrophin-associated Glycoprotein Complex After Exon Skipping Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther* 2012; 20: 462–467.
49. Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Shao J, Kaye EM, Mercuri E. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2016; 79: 257–271.
50. Aartsma-Rus A, Janson AA, van Ommen G-JB, van Deutekom JC. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 2007; 8: 43.
51. Meola G, Cardani R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis* 2015; 1852: 594–606.
52. Brook JD et al. 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: 799–808.
53. Fu Y et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992; 255: 1256–1258.
54. Author G et al. Myotonic Dystrophy Mutation: An Unstable CTG Repeat in the 3' Untranslated Region of the. *Source Sci New Ser* 1992; 255: 1253–1255.
55. Meola G, Sansone V, Radice S, Skradski S, Ptacek L. A family with an unusual myotonic and myopathic phenotype and no CTG expansion (proximal myotonic myopathy syndrome): A challenge for future molecular studies. *Neuromuscul Disord* 1996; 6: 143–150.
56. Ricker K, Koch MC, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Otto M, Heine R, Moxley RT. Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology* 1994; 44: 1448–1452.

57. Thornton CA, Griggs RC, Moxley RT. Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Ann Neurol* 1994; 35: 269–272.
58. Udd B, Krahe R, Wallgren-Pettersson C, Falck B, Kalimo H. Proximal myotonic dystrophy – A family with autosomal dominant muscular dystrophy, cataracts, hearing loss and hypogonadism: Heterogeneity of proximal myotonic syndromes? *Neuromuscul Disord* 1997; 7: 217–228.
59. Ranum LP, Rasmussen PF, Benzow K a, Koob MD, Day JW. Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet* 1998; 19: 196–198.
60. Liquori CL. Myotonic Dystrophy Type 2 Caused by a CCTG Expansion in Intron 1 of ZNF9. *Science* 2001; 293: 864–867.
61. Day JW et al. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 2003; 60: 657–664.
62. Mulders SM et al. Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 13915–13920.
63. Wheeler TM, Leger AJ, Pandey SK, MacLeod AR, Nakamori M, Cheng SH, Wentworth BM, Bennett CF, Thornton CA. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* 2012; 488: 111–115.
64. Pandey SK et al. Identification and characterization of modified antisense oligonucleotides targeting DMPK in mice and nonhuman primates for the treatment of myotonic dystrophy type 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 355: 329–340.
65. Thornton C et al. Study Design of a Phase 1/2a Trial with ISIS-DMPKRx for the Treatment of Myotonic Dystrophy Type 1 (P3.167). *Neurology* 2016; 86.
66. Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 2000; 26: 300–306.
67. Bates GP et al. Huntington disease. *Nat Rev Dis Prim* 2015; 1: 15005.
68. Rubinsztein DC. Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet* 2002; 18: 202–209.
69. Deyts C, Galan-Rodriguez B, Martin E, Bouveyron N, Roze E, Charvin D, Caboche J, Bétuing S. Dopamine D2 receptor stimulation potentiates polyQ Huntingtin-induced mouse striatal neuron dysfunctions via Rho/ROCK-II activation. *PLoS One* 2009; 4.
70. Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz E V, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS, Hung G, Bennett CF, Cleveland DW. Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* 2012; 74: 1031–1044.
71. Østergaard ME et al. Rational design of antisense oligonucleotides targeting single nucleotide polymorphisms for potent and allele selective suppression of mutant Huntingtin in the CNS. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 9634–9650.
72. Rowland L, Shneider N. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1688–1700.
73. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano P, Pagani W, Lodin D, Orozco G, China A. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int* 2015; 6: 171.
74. Brettschneider J et al. TDP-43 pathology and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Acta Neuropathol* 2014; 128: 423–437.
75. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 385–390.
76. Rosenbohm A et al. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Southern Germany. *J Neurol* 2017; 264: 749–757.
77. Neumann M et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130–133.
78. Brettschneider J et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2013; 74: 20–38.
79. Lee EB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2011.
80. Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowski JQ, Tredici K Del. Amyotrophic lateral sclerosis – a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 708–714.
81. Majoor-Krakauer D, Willems PJ, Hofman A. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Genet* 2003; 63: 83–101.
82. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 2014; 17: 17–23.
83. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59–62.
84. Chen L, Watson C, Morsch M, Cole NJ, Chung RS, Saunders DN, Yerbury JJ, Vine KL. Improving the Delivery of SOD1 Antisense Oligonucleotides to Motor Neurons Using Calcium Phosphate-Lipid Nanoparticles. *Front Neurosci* 2017; 11: 476.
85. Ajroud-Driss S, Siddique T. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis* 2015; 1852: 679–684.
86. Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: What do we really know? *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 603–615.
87. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta – Proteins Proteomics* 2010; 1804: 245–262.
88. Bosco DA et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* 2010; 13: 1396–1403.
89. Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RKA, Fisher EMC, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain* 2013; 136: 2342–2358.
90. Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 65.
91. Smith RA et al. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 2290–2296.
92. Miller TM et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: A phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol* 2013; 12: 435–442.
93. DeJesus-Hernandez M et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245–256.
94. Renton AE et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257–268.
95. van Blitterswijk M, DeJesus-Hernandez M, Rademakers R. How do C9ORF72 repeat expansions cause amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: can we learn from other non-coding repeat expansion disorders? *Curr Opin Neurol* 2012; 25: 689–700.
96. Nassif M, Woehlbier U, Manque PA. The enigmatic role of C9ORF72 in autophagy. *Front Neurosci* 2017; 11.
97. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 2013; 19: 983–997.
98. Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, Kabashi E. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2013; 74: 180–187.
99. Therrien M, Rouleau GA, Dion PA, Parker JA. Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS One* 2013; 8.
100. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 2013; 79: 416–438.
101. Mizielińska S, Isaacs AM. C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Curr Opin Neurol* 2014; 27: 515–523.
102. Donnelly CJ et al. RNA Toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 Expansion Is Mitigated by Antisense Intervention. *Neuron* 2013; 80: 415–428.
103. O'Rourke JG et al. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science* 2016; 351: 1324–1329.
104. Jiang J et al. Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 2016; 90: 535–550.
105. Becker LA et al. Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature* 2017; 544: 367–371.
106. Wurster CD, Ludolph AC. Antisense oligonucleotides in neurological disorders. *Ther Adv Neurol Disord* 2018; 11: 1–19.