

基于Duchenne型肌营养不良症动物模型的核酸药物与基因治疗研究进展

刘思雨¹, 赖跃昭¹, 郭文婷¹, 陈学进²

[1. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500; 2. 香港中文大学(深圳)医学院, 深圳 518172]

[摘要] Duchenne型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种严重的X连锁隐性遗传疾病, 由DMD基因突变引起, 是最常见的遗传性肌营养不良类型之一。DMD基因是已知的人类基因组中最大的基因之一, 编码抗肌萎缩蛋白(dystrophin)。目前已知的DMD基因突变类型复杂多样, 包括外显子的缺失、重复、点突变, 以及小片段插入或缺失等, 为DMD的治疗带来了巨大挑战。目前尚无根治DMD的方法, 其主要治疗手段以症状管理为主, 且无法逆转或阻止疾病的进展。近年来, 随着生物技术的进步, 核酸药物和基因治疗成为DMD治疗研究的前沿领域。此类治疗方法旨在通过修复或替代突变的基因来恢复抗肌萎缩蛋白的表达, 从而改善肌肉功能或延缓肌肉退化。在临床前动物模型研究和前期临床试验中, 这些治疗方法已显现出一定的疗效, 为DMD患者带来了新的希望。本文在简述DMD病理机制及遗传特征的基础上, 详细介绍了DMD治疗领域的最新研究进展, 特别聚焦于DMD核酸药物(包括基于外显子跳跃疗法的反义寡核苷酸药物和核糖体跳跃促进剂)以及基因治疗方法(包括基因替代疗法和基因编辑疗法)。这些治疗方法的开发和应用不仅为DMD患者提供了新的治疗选择, 也为其他遗传性疾病的治疗积累了宝贵经验。然而, DMD治疗的临床转化也面临诸多挑战, 未来研究需要进一步优化现有的治疗方法, 提高治疗的有效性和适用性, 同时探索新的治疗策略, 以期DMD患者带来更有效且可持续的治疗方案。

[关键词] Duchenne型肌营养不良症; 抗肌萎缩蛋白; 核酸药物; 反义寡核苷酸; 基因治疗; 外显子跳跃

[中图分类号] R-332; R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0613-13



Advances in Nucleic Acid Drugs and Gene Therapies based on Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy

LIU Siyu¹, LAI Yuezhao¹, GUO Wenting¹, CHEN Xuejin²

(1. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. School of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shenzhen 518172, China)

Correspondence to: GUO Wenting (ORCID: 0000-0002-1370-7764), E-mail: guowt@lpbr.cn;

CHEN Xuejin (ORCID: 0009-0001-1500-8721), E-mail: chenxuejin@cuhk.edu.cn

[ABSTRACT] Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe X-linked recessive genetic disorder caused by mutations in the DMD gene, making it one of the most common forms of hereditary muscular dystrophy. The DMD gene, which encodes dystrophin, is the largest known gene in the human genome. Mutations in the DMD gene are highly diverse, including exon deletions, duplications, point mutations, and small insertions or deletions, posing significant challenges for treatment. Currently, there is no cure for

[基金项目] 2024年度云南省高校服务重点产业科技项目“利用猴模型评价Utrophin基因激活疗法的有效性和安全性研究”(FWCY-ZD2024006)

[第一作者] 刘思雨(2001—),女,硕士研究生在读,研究方向:Duchenne型肌营养不良疾病机制。E-mail: abc2597456565@163.com;
赖跃昭(1999—),男,硕士,研究方向:遗传疾病机制。E-mail: laiyuezhao@163.com

[通信作者] 郭文婷(1987—),女,博士,助理研究员,研究方向:遗传疾病机制及治疗。E-mail: guowt@lpbr.cn。ORCID: 0000-0002-1370-7764;
陈学进(1960—),男,博士,教授,研究方向:实验动物学。E-mail: chenxuejin@cuhk.edu.cn。ORCID: 0009-0001-1500-8721

DMD, and existing treatment strategies focus primarily on symptom management, which cannot reverse or halt disease progression. Advances in biotechnology position nucleic acid drugs and gene therapies at the forefront of DMD treatment research. These treatments aim to restore dystrophin expression by repairing or replacing mutated genes, thereby improving muscle function or slowing muscle degeneration. Preclinical studies in animal models and early-phase clinical trials demonstrate promising efficacy and offer new hope for DMD patients. This review briefly outlines the pathological mechanisms and genetic characteristics of DMD before delving into recent progress in therapeutic strategies, with a particular focus on nucleic acid drugs (including antisense oligonucleotides for exon skipping therapy and translation readthrough inducers) and gene therapy approaches (including gene replacement therapy and gene editing). The development and application of these therapies not only provide new treatment options for DMD patients, but also offer valuable insights for addressing other genetic disorders. However, numerous challenges impede the clinical translation of DMD treatments. Future studies must optimize existing therapeutic strategies, improve their efficacy and applicability, and explore innovative approaches to deliver more effective and sustainable treatments for DMD patients.

[Key words] Duchenne muscular dystrophy; Dystrophin; Nucleic acid drugs; Antisense oligonucleotides; Gene therapy; Exon skipping

Duchenne 型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种 X 染色体连锁的神经肌肉疾病^[1], 主要罹患群体为男性, 以严重的肌肉萎缩、心肌病和肌酸激酶水平升高为特征。DMD 是最常见的儿童肌营养不良症之一, 在中国男婴中的发病率约为 1/3 853, 以此估算全国约有 70 000 名 DMD 男性患者^[2]。DMD 作为一种遗传性肌肉疾病, 患者常伴有学习和社交障碍及身体残疾, 生活质量降低, 且易出现心理问题。该病的医疗费用高昂, 持续治疗、康复服务和近期新开发但昂贵的基因疗法, 都会给患者家庭造成巨大的经济负担。此外, 药物不良反应和长期护理需求会进一步增加医疗成本和社会压力。DMD 临床表现通常在儿童早期出现, 包括运动发育迟滞、进行性肌无力和运动功能障碍等症状; 患者青春期后逐渐丧失行走能力, 约在 20~30 岁因心肺衰竭而死亡^[3]。

目前 DMD 患者的标准治疗方法包括皮质类固醇治疗、物理治疗和心肌病治疗等。其中, 皮质类固醇治疗主要通过抗炎、调节免疫等起效, 可一定程度上延缓病情, 但存在骨密度下降、代谢异常、肾上腺功能受损、血压升高、体重增加、发育不良等显著不良反应, 且无法从根本上治疗疾病^[4]。同时, 用药患者会产生明显的药物依赖性, 一旦停药, 病情可能会加速恶化。因此, 患者往往需要长期服药, 而这又增加了药物累积性不良反应发生的风险。物理治疗仅能改善患者的运动功能, 减缓肌肉萎缩或挛缩的进程, 但无法修复受损的基因或恢复抗肌萎缩蛋白 (dystrophin)

的功能, 无法影响疾病的病理根源。晚期 DMD 患者肌肉萎缩严重、功能受限, 物理治疗的效果大幅下降。而且物理治疗的效果多为短期, 需长期坚持才能延续疗效, 这容易给患者和家庭造成较大负担, 患者的依从性也会显著影响治疗效果。因此, DMD 治疗亟需开发更先进的治疗方法。

近年来, 核酸药物和基因治疗凭借其精准性和靶向性, 展现出治疗 DMD 的巨大潜力, 成为 DMD 治疗研究的前沿方向。本文旨在总结核酸药物和基因治疗的研究进展, 阐明其治疗 DMD 的机制和临床转化价值, 并探讨其面临的挑战和未来的发展方向。

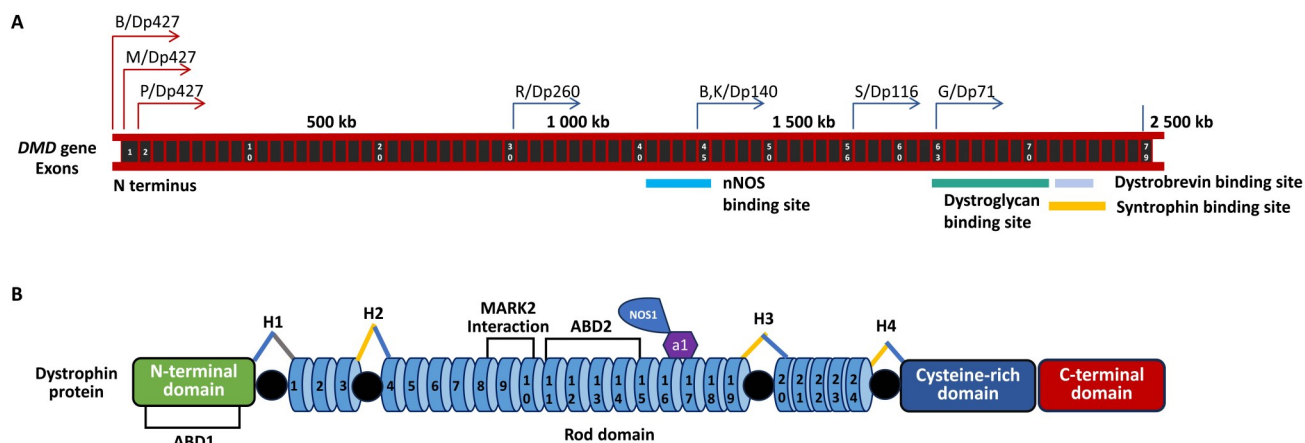
1 DMD 病理机制及遗传特征

基于动物模型的研究表明, 抗肌萎缩蛋白是肌细胞中肌动蛋白细胞骨架和细胞外基质的重要组成部分, 其缺失会导致肌纤维受损和丢失。而且作为抗肌萎缩糖蛋白复合体 (dystrophin-glycoprotein complex, DGC) 的一部分, 抗肌萎缩蛋白缺乏会破坏肌细胞膜的稳定性, 进而导致肌肉退化^[5]。编码抗肌萎缩蛋白的基因为 *DMD* 基因, 包含 79 个外显子。目前已知的 *DMD* 基因突变多达上千种。约 70% 的 DMD 患者的 *DMD* 基因突变类型为大片段缺失, 另外 30% 为片段重复、点突变、小片段插入或缺失等类型^[6]。大多数外显子缺失或重复突变聚集在外显子 6 和 7 以及外显子 43 和 53 之间的两个热点区域, 而其他突变则在 *DMD* 基因上随机发生。这些突变通常会导致开放阅读框 (open reading

frame) 的移位, 进而形成终止密码子, 使得肽链合成提前终止并产生截短的、无功能的抗肌萎缩蛋白^[7]。

抗肌萎缩蛋白的相对分子质量为 4.27×10^5 , 包含 3 685 个氨基酸, 由 4 个不同的功能域组成: N 端结构域 (N-terminal domain, NTD)、中央杆状结构域 (rod domain, RD)、富含半胱氨酸结构域 (cysteine-rich domain, CRD) 以及 C 端结构域 (C-terminal domain, CTD) (图 1)。NTD 与肌动蛋白结合, 连接肌细胞骨架, 提供机械支撑^[8]。中央的杆状结构域存在许多重复和冗余的序列。研究表明, 删除部分中央结构域的抗肌萎缩蛋白仍能正常发挥功能^[9]。在贝克尔肌营养不良症 (Becker muscular dystrophy, BMD) 患者体内, 拥有部分中央结构域的抗肌萎缩蛋白仍能在一定程度上维持肌肉功能, 这为外显子跳跃和基因编辑治疗策

略提供了有力支持^[10]。正常肌肉组织中, 完整的糖蛋白复合物 (dystrophin-associated glycoprotein complex, DAGC) 通过连接细胞骨架、肌膜和细胞外基质, 维持肌膜的完整性。然而在 DMD 患者的肌肉组织中, 由于缺乏功能性抗肌萎缩蛋白, DAGC 无法与肌动蛋白 (Actin) 和细胞外基质相互作用, 导致 DAGC 失去支撑功能。这会导致细胞膜稳定性降低, 钙离子内流增加, 以及氧化应激发生^[11], 进而诱导促炎性细胞因子的释放, 引发肌纤维出现炎症、变性坏死和纤维化, 损害肌肉细胞的再生能力, 形成恶性循环。此外, 受损的肌肉组织会被脂肪组织和纤维结缔组织取代, 导致肌肉功能丧失, 并伴随线粒体功能紊乱和血管缺血, 从而加剧代谢损伤, 最终加速疾病发展^[12]。



注: 本图根据文献 [13] 内容绘制。

Note: This figure was adapted from reference [13].

图1 *DMD* 基因及其编码蛋白结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of *DMD* gene and its encoded protein structure

2 DMD 核酸药物研究进展

核酸药物是指低分子量、化学修饰的核酸分子, 可用于调控基因表达或修复遗传缺陷。由于结合了核酸药物的特异性和小分子药物的稳定性这两方面优势, 核酸药物在治疗遗传病、癌症和病毒感染中具有重要的应用价值。目前, 应用在 DMD 治疗上的核酸药物包括反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 和核糖体跳跃促进剂 (translation readthrough inducers) 等。

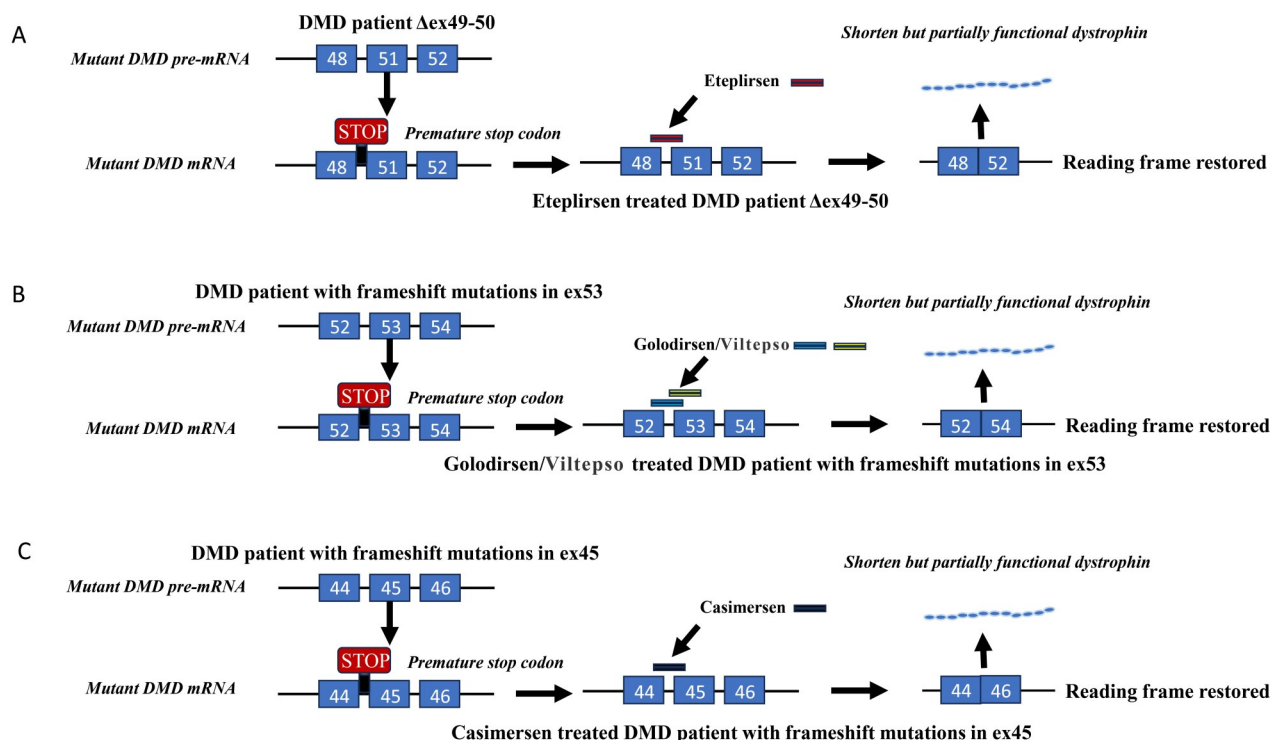
2.1 反义寡核苷酸类药物

DMD 患者的基因突变通常包括 *DMD* 基因的外显子

缺失、重复或突变, 这些突变导致开放阅读框移位, 并提前形成终止密码子, 从而产生截短且功能丧失的抗肌萎缩蛋白^[14]。反义寡核苷酸药物主要通过外显子跳跃 (exon skipping) 技术来恢复 *DMD* 基因的阅读框, 从而表达功能性抗肌萎缩蛋白。虽然跳跃后的抗肌萎缩蛋白比正常的抗肌萎缩蛋白较短, 但其仍能维持肌肉细胞膜的稳定性, 改善肌肉功能, 并减缓肌肉退化的进程^[15]。外显子跳跃疗法是目前最有前途的治疗途径之一, 可用于治疗约 60%~80% 的 DMD 患者。目前, 几种反义寡核苷酸药物已获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的批准: (1) Eteplirsen (Exondys 51) 诱导外显子 51 跳

跃, 治疗 188 周后肌肉组织中抗肌萎缩蛋白的表达水平低于正常水平约 1%^[15]; (2) Golodirsén (Vyondys 53) 诱导外显子 53 跳跃, 治疗 48 周后抗肌萎缩蛋白的表达水平低于正常水平约 1%^[16]; (3) Casimersen (Amondys 45) 诱导外显子 45 跳跃, 治疗 48 周后抗肌

萎缩蛋白的表达水平达到正常水平的 1.7%^[17-18]; (4) Viltepso 诱导外显子 53 跳跃, 治疗 25 周后抗肌萎缩蛋白的表达水平低于正常水平约 5.9% (该研究使用的抗肌萎缩蛋白表达水平检测方法与上述研究不同)^[22]。



注: A, Eteplirsén, 用于治疗缺失外显子 49 和 50 的 DMD 患者; B, Viltolarsén/Golodirsén, 用于治疗 53 号外显子发生移码突变的 DMD 患者; C, Casimersen, 用于治疗 45 号外显子中发生移码突变的 DMD 患者。本图根据文献 [7] 内容绘制。

Note: A, Eteplirsén, for DMD patients with deletion of exons 49 and 50; B, Viltolarsén/Golodirsén, for DMD patients with frameshift mutations affecting exon 53; C, Casimersen, for DMD patients with frameshift mutations affecting exon 45. This figure was adapted from reference [7].

图 2 针对 Duchenne 型肌营养不良症 DMD 基因外显子跳跃疗法的作用机制

Figure 2 Mechanism of exon skipping therapy for DMD gene in Duchenne muscular dystrophy

2.1.1 Eteplirsén

Eteplirsén (商品名 Exondys 51) 由美国 Sarepta Therapeutics 公司开发, 是首个获得 FDA 批准用于治疗 DMD 的反义寡核苷酸药物。其通过磷酸二胺吗啡啉寡核苷酸 (phosphorodiamidate morpholino oligomer, PMO) 技术实现对 51 号外显子的跳跃, 从而恢复 mRNA 阅读框, 产生截短的抗肌萎缩蛋白^[19]。该药物已在食蟹猴和 mdx 小鼠上进行了临床前研究。其中一项食蟹猴研究显示, 最大剂量 (320 mg/kg, 相当于人类 100 mg/kg) 的 Eteplirsén 经皮下或静脉注射具有良好耐受性, 未观察到显著的心血管、呼吸、神经或肾脏毒性; 随着剂量的增加, 肾脏细胞中嗜碱性颗粒/肾小

管和肾小管空泡化现象增多, 但这些变化会在恢复期自发逆转, 且未影响血清生化参数或肾功能^[20]。除此之外, 小鼠骨髓细胞微核试验结果显示, 与对照组相比, 注射剂量分别为 5 000 μ g/mL 或 2 000 mg/kg 的 Eteplirsén 药物没有毒性作用^[21]。以上动物模型研究中的安全性结果为 Eteplirsén 的 I / II 期临床试验的启动铺平了道路。

初步的临床试验结果表明, Eteplirsén 可有效促进功能性抗肌萎缩蛋白的产生, 并增加 6 min 步行测试的距离^[22]。随后的随机、双盲、安慰剂对照试验进一步验证了 Eteplirsén 诱导产生的功能性抗肌萎缩蛋白的作用与能力^[23]。一项关于 Eteplirsén 长期治疗 DMD 的研

究显示,随着治疗时间的延长,抗肌萎缩蛋白阳性纤维的比例逐渐增加,从初期正常值的23%增加至更高水平;在第48周时,30 mg/kg剂量组的抗肌萎缩蛋白表达水平达到正常值的52%,而50 mg/kg剂量组达到正常值的43%^[24]。在接受Eteplirsen治疗的患者中,即使部分患者已经失去了行走能力,Eteplirsen治疗仍能维持他们的心脏和上肢功能,其他的疾病进展指标保持在相对稳定的状态^[25]。鉴于在接受Eteplirsen治疗的部分患者中观察到骨骼肌中抗肌萎缩蛋白表达量增加的积极成果,2016年9月19日,FDA批准了Eteplirsen用于DMD患者的治疗^[26]。Eteplirsen获批开创了多项“第一”,包括:第一个在美国获得批准用于治疗DMD的药物、第一个被批准用于调节剪接的寡核苷酸、第一个被批准的PMO^[27]。

Eteplirsen的成功不仅在于创新的治疗机制,还在于其通过严格的动物模型测试和临床试验验证了其安全性和有效性。这种从动物模型到人类患者的转化医学研究,体现了比较医学在药物开发和疾病治疗中的关键作用,为未来更多基于基因疗法的药物研发提供了宝贵的经验和启示。

然而,Eteplirsen的批准也伴随着争议。尽管Eteplirsen治疗在临床试验中显示出良好的恢复抗肌萎缩蛋白表达水平的能力,为DMD患者提供了一种新颖的、更有效的治疗选择^[28],但该批准主要是基于一项样本量相对较小且数据质量和数量均有限的临床研究,并且以抗肌萎缩蛋白表达水平的变化作为替代指标,而非直接验证药物的长期临床获益。这一批准引发了公众对FDA加速审批程序的担忧,特别是这种审批模式可能导致药物长期疗效和安全性评价不充分。此外,Eteplirsen的潜在不良反应(包括肾毒性和免疫反应的可能性)尚未在大规模研究中充分验证,其长期安全性和耐受性仍需进一步观察。尽管如此,Eteplirsen的获批仍然被视为DMD治疗领域中的一个重要里程碑,为未来开发更多的PMO治疗方法提供了宝贵的经验和数据。2023年一项最新的研究结果显示,通过精密化学修饰以识别更强的靶向结合位点的新一代反义寡核苷酸可以显著提高外显子51跳跃反义寡核苷酸的效率,在肌肉细胞培养和动物模型实验中显示出比早期药物更高的外显子跳跃水平和抗肌萎缩蛋白恢复水平。该研究证实,外显子跳跃治疗成功的关键因素是选择正确的反义寡核苷酸序列。该研究构建了一种系统性反义寡核苷酸筛选模型,该模型对潜在的外显子跳跃

效率和被挽救的抗肌萎缩蛋白水平进行定量分析,可以筛选出将在临床试验中测试的最佳反义寡核苷酸序列^[29]。

2.1.2 Golodirsen

Golodirsen(商品名Vyondys 53)也是一种基于PMO技术的核酸药物,同样由美国Sarepta Therapeutics公司开发。它能靶向诱导53号外显子发生跳跃,恢复DMD基因主要转录本的阅读框,产生截短但仍具部分功能的抗肌萎缩蛋白,从而减缓疾病发展^[30]。在比较医学研究中,Golodirsen的表现尤为引人注目。动物模型研究表明,与健康对照组相比,DMD患者的肌源性细胞以及mdx小鼠的肌纤维中,细胞核与细胞质之间的mRNA运输可能存在障碍,导致转录失衡,而Golodirsen治疗可以调节mRNA的转录失衡现象。在对来自25名参与者的成纤维细胞所展开的体外实验中,利用MyoD慢病毒进行诱导后,研究同样发现,Golodirsen能够显著恢复DMD发病过程中出现的mRNA转录不平衡^[31]。这些初步的体外和动物模型研究结果为Golodirsen的临床试验奠定了基础,提供了理论依据和初步的疗效证据。另一项研究结果表明,Golodirsen长期治疗对DMD患者表现出了一定的有效性和安全性。该研究包含I/II期临床试验,第一部分是为期12周的随机、双盲、安慰剂对照试验,随后又进行了9周的安全性审查;第二部分是对30 mg/kg的Golodirsen进行为期168周的安全性评估。结果显示,Golodirsen显著增加了抗肌萎缩蛋白的表达量,同时产生的不良反应通常很轻微且大多与药物无直接关系,未见患者因安全问题而中断治疗或死亡^[32]。

为期3年的随访研究发现,接受Golodirsen治疗的患者在6 min步行测试中基线距离减少了99.0 m,相比之下,对照组则减少了181.4 m($P=0.067$),并且在接受Golodirsen治疗后,依旧丧失行走能力的患者仅为9%^[32]。这表明Golodirsen具有很强的生物活性和长期安全性。另外需要说明,尽管FDA在2019年加速批准了Golodirsen用于DMD治疗,但其批准过程也很曲折,主要是由于存在治疗相关的感染风险以及在动物模型实验中发现的肾毒性^[33]。综上所述,尽管存在一些争议和挑战,但更多的研究数据显示Golodirsen可以为DMD患者提供一种潜在的治疗选择。

从比较医学的角度来看,Golodirsen的研究和开发过程凸显了动物模型在预测药物疗效和安全性方面的价值。动物模型研究中的积极结果不仅为Golodirsen的

临床应用提供了有力支持,而且临床试验的成功反过来证实了动物模型研究的预测价值。这种从实验室到临床的转化过程,不仅验证了Golodirsen的治疗潜力,也为DMD患者带来了新的治疗希望,并展示了比较医学在推动精准医疗和个性化治疗方面的重要作用。

2.1.3 Casimersen

Casimersen (商品名 Amondys 45) 同样由美国 Sarepta Therapeutics 公司开发,适用于 *DMD* 基因的第 45 号外显子跳跃,可以治疗大约 8% 的 DMD 患者。在临床前动物实验中,研究者通过每周静脉注射 1 次不同剂量 (0、100、300、900 mg/kg) 的 Casimersen 给幼年大鼠,持续 10 周,以评估其安全性。结果显示,在最高剂量下可观察到大鼠肾小管退化,但未观察到对生殖系统、发育系统和免疫功能的影响^[34]。这一发现提示在临床应用中,需要对 Casimersen 的剂量和潜在的肾脏毒性进行密切监控。2020 年开展了一项针对所有接受 Casimersen 治疗的 DMD 患者长达 144 周的随访研究。该研究提供了关于 Casimersen 在长期治疗中安全性和有效性相关的宝贵信息,对于评估其是否能作为 DMD 治疗的有效策略起到了至关重要的作用^[35]。该研究结果显示, Casimersen 在促进抗肌萎缩蛋白表达和延缓疾病发展方面具有一定的疗效。2021 年 2 月, FDA 批准 Casimersen 用于 DMD 治疗^[18],标志着 Casimersen 在临床应用中迈出了重要一步。然而,其长期治疗的有效性和广泛的适用性仍需通过进一步的研究和临床试验来确定,目前正在进行的 III 期临床试验预计于 2026 年结束。

从比较医学的角度来看, Casimersen 的研究和开发过程体现了动物模型在药物开发中的关键作用。动物模型不仅帮助研究者评估了药物的安全性,而且在预测药物对人类的潜在疗效方面发挥了重要作用。这种跨物种的比较研究,不仅可以为从实验室到临床的转化提供科学依据,同时也能够指出药物开发和临床试验中需要注意的关键问题,如剂量选择和不良反应监测。目前正在进行的 III 期临床试验预计在 2026 年结束,将进一步验证 Casimersen 在人类患者中的安全性和有效性,并为其在临床治疗中的应用提供更坚实的证据。

2.1.4 Viltepso

Viltepso (商品名 Viltolarsen) 也是一种 PMO 药物,由美国 Sarepta Therapeutics 公司开发,通过跳过 *DMD* 基因中的第 53 号外显子,促进功能性抗肌萎缩蛋白的表达。2020 年 8 月 12 日,美国 FDA 通过加速审批程序

批准了 Viltepso 用于治疗携带 53 号外显子 *DMD* 基因突变的 DMD 患者^[22],使其成为继 Golodirsen 之后第 2 个获得 FDA 批准的针对 DMD 的反义寡核苷酸疗法用药。在比较医学的视角下, Viltepso 的临床试验和动物模型研究提供了药物疗效和安全性的的重要对比数据。在 DMD 临床试验方面, Viltepso 显示出了一定的疗效。2018 年 10 月,在世界肌肉病学大会上公布的 II 期临床试验结果显示,接受 Viltepso 静脉注射治疗的 DMD 患儿在多个运动功能评估指标上取得了显著改善,包括 10 m 行走速度、6 min 行走距离、从坐姿至起立的时间等,如从仰卧位到站立位的时间和跑步/步行 10 m 所需时间明显减少,表明 Viltepso 注射液能够提高 DMD 患儿的体内抗肌萎缩蛋白水平,并增强肌肉力量^[22]。虽然临床试验过程中患者没有出现因剂量增加而发生的不良反应,但是在临床前动物模型研究中,通过对出生后第 7 天至第 70 天的幼年雄性小鼠每周静脉注射 Viltolarsen (0、15、60、240 mg/kg 或 1 200 mg/kg),发现进行最高剂量注射后的雄性小鼠最终死于肾毒性;在 240、1 200 mg/kg 剂量组的存活动物中,肾小管效应(包括变性)的发生率和严重程度均呈剂量依赖性增加;而且在测试的最高剂量下观察到小鼠体重减少和性成熟延迟的现象^[36]。这些动物模型研究的结果提示,尽管 Viltepso 在临床试验中未观察到肾毒性,但该药物可能具有潜在的肾毒性风险,尤其是在高剂量使用时。因此,在使用 Viltepso 时需要密切监测患者的肾功能,并且需要进一步的临床研究来评估该药物的安全性。而且通过这种跨物种的比较医学研究,科学家和医生们可以更好地理解药物的作用机制,并为 DMD 患者提供更安全有效的治疗方案。

2019 年 6 月 29 日,在美国奥兰多举行的 DMD 患者家长组织 (Parent Project Muscular Dystrophy, PPMD) 的年会上,日本新药研发部主管表示, Viltepso 静脉滴注液将进入 III 期临床试验研究。2019 年 9 月,日本新药株式会社正式提交了 Viltepso 静脉滴注液新药上市的申请,并于 2020 年 3 月 25 日获得加速批准上市。总之, Viltepso 作为一种基于外显子跳跃治疗原理的药物,在 DMD 治疗领域展现出了积极的前景,其在临床试验中的良好疗效和安全性证明了其作为 DMD 治疗手段的潜力。需要说明, FDA 批准 Viltepso 用于特定基因突变的 DMD 患者时,要求进行额外的研究以确认其临床益处,并监测肾功能,提示该药物存在潜在的不良反应(如肾毒性风险)仍然不可忽视。针对不同基因突变类

型的DMD患者，可能需要设计更细致的治疗方案以实现最佳的治疗效果。未来的研究将进一步探索 Vilepso 及其他类似药物在DMD治疗中的应用潜力和长期疗效。

综上，使用反义寡核苷酸进行外显子跳跃治疗是一种很有前景的DMD治疗策略。虽然反义寡核苷酸疗法的有效性已得到证实，但要将这种疗法更全面地应用于DMD患者，仍面临一些挑战，包括反义寡核苷酸因核酸酶抗性低而不稳定，以及组织吸收能力差等。最近有研究采用了一种新的治疗策略，即将反义寡核苷酸药物与反义寡核苷酸载体结合形成水凝胶微球，并通过肌肉内和动脉内注射的方式递送至经典的DMD动物模型mdx小鼠体内。该方法可恢复mdx小鼠体内抗肌萎缩蛋白的表达，并且与传统的直接注射法相比，使用水凝胶微球作为载体的方法显示出更高的治疗效率和更广泛的肌肉覆盖范围，还能够实现治疗效果的持续性，即使在停止治疗后抗肌萎缩蛋白表达和肌肉功能仍能得到维持^[37]。使用水凝胶微球作为载体的反义寡核苷酸药物结合的治疗策略在动物模型中显示出了良好的治疗效果和临床转化的潜力，其高效率、广泛的肌肉覆盖范围、持续的治疗效果以及良好的生物相容性都为其在DMD治疗中的临床应用提供了有力支持。随着进一步的研究和开发，这一策略有望为DMD患者提供一种新的、有效的治疗选择。

2.2 核糖体跳跃促进剂类药物

核糖体跳跃促进剂，如 Ataluren (Translarna™，旧称 PTC124)，是一类重要的药物，它们能够通过促进核糖体跳过无义突变来延续蛋白质的合成。这些药物通过改变核糖体对终止密码子的识别，使得核糖体能够“跳跃”过错误的终止密码子，从而部分恢复抗肌萎缩蛋白的功能。Ataluren 是一种由美国 PTC Therapeutics 公司开发的口服小分子药物，通过阻断核糖体翻译过程中过早终止密码子 (premature termination codons, PTC) 的识别 (通读方法)，部分恢复功能性抗肌萎缩蛋白的表达，适用于约 10%~15% 的 DMD 患者^[38]。在比较医学的框架下，mdx 小鼠作为 DMD 研究的标准动物模型，为评估 Ataluren 的疗效提供了重要依据。在 mdx 小鼠的肌细胞体外实验中，Ataluren 能够显著提高抗肌萎缩蛋白的表达水平，达到正常对照的 35%；经过 2~8 周的 Ataluren 药物治疗后，mdx 小鼠的肌肉切片病理显示抗肌萎缩蛋白表达水平约为野生型小鼠的 20%~25%，已基本达到公认的恢复肌肉功能所需的表达水平^[39]，并在 I 期临床试验中

显示出良好的安全性。然而，在一项 48 周的 II b 期临床研究中，Ataluren 未能显示出显著疗效。在试验中，患者被随机分配接受口服 Ataluren (每天分 3 次服用) 或对照药剂。口服 Ataluren 的患者分为低剂量组和高剂量组，低剂量组 3 次给药剂量分别为 4、4、8 mg/kg，高剂量组 3 次给药剂量分别为 20、20、40 mg/kg。低剂量组患者在某些指标上显示出较慢的疾病进展，例如 6 min 步行测试中低剂量组的 DMD 患者步行距离增加了 29 m；但高剂量组的表现与对照组相似，甚至在某些情况下劣于对照组。因此，可以得出初步结论：Ataluren 在低剂量下可能对某些患者有一定的积极影响，但在高剂量下其疗效并不显著。这些研究结果提示 Ataluren 在临床试验中具有复杂表现，其疗效可能受多种因素影响，包括剂量、患者群体的选择等，从而导致 Ataluren 疗效仍存在争议^[40]。最近的一项 meta 分析表明，在卧床过渡阶段 (300 m≤6 min 步行距离<400 m) 的患者中，Ataluren 治疗组与对照组之间 6 min 步行距离从基线到第 48 周的变化具有显著的统计学差异^[41]。这一实验结果虽然展现出该药有效性的积极一面，但并未完全消除有关药物疗效的争议。基于上述争议，FDA 拒绝了 Ataluren 用于 DMD 治疗的申请。不过，该药已获得欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 批准用于 DMD 患者，并将其作为一种新的 DMD 治疗方法。比较医学研究强调了在药物开发过程中，动物模型和临床试验之间的差异和一致性。虽然动物模型为药物筛选和机制研究提供了重要信息，但它们不能完全预测药物在人类中的疗效和安全性。因此，临床试验仍然是评估药物有效性和安全性的金标准，而比较医学则为我们理解药物作用机制和跨物种差异提供了宝贵视角。

目前，一个名为 STRIDE (Strategic Targeting of Registries and International Database of Excellence) 的多中心药物注册项目正在对接受 Ataluren 治疗的非传统型 DMD 患者进行进一步评估。该项目旨在探讨 Ataluren 与标准治疗 (standard of care, SoC) 联合使用时的疗效，现有结果已经提示这种联合治疗确实能够延缓 DMD 患者的疾病发展^[42-43]。尽管 Ataluren 作为治疗 DMD 的一种潜在药物已获得部分批准，但要将其广泛应用于临床治疗，仍需通过更大规模的研究来评估其长期疗效和安全性。

上述 5 种代表性核酸药物的优缺点及特点总结见表 1，它们的研发历程见图 3。

表1 用于Duchenne型肌营养不良症治疗的代表性核酸药物总结

Table 1 Summary of representative nucleic acid drugs for treatment of Duchenne muscular dystrophy

药物名称 Drug name	适用DMD基因突变类型 Targeted DMD gene mutation type	优点 Advantage	缺点 Drawback
Eteplirsen	51号外显子缺失	首款获批的DMD治疗用反义寡核苷酸药物,安全性良好,肌肉功能改善具有长期稳定性	仅适用于51号外显子缺失突变,疗效提升有限 ^[44]
Golodirsen	53号外显子缺失	有效提高抗肌萎缩蛋白水平,每周静脉注射1次,给药方式方便且易于管理 ^[45]	适用范围有限,仅适用于53号外显子缺失突变,缺乏功能性结果报告 ^[7]
Viltolarsen	53号外显子缺失	与Golodirsen相比可更高效地提高抗肌萎缩蛋白水平,作用迅速;全球认可度高,获日本和美国批准	治疗周期长,与Golodirsen治疗范围重叠,患者覆盖面未扩大 ^[46]
Casimersen	45号外显子缺失	有效延缓疾病进展,安全性较高,风险低,可为患者提供新选择	尚无长期有效的数据,仅适用于45号外显子缺失突变 ^[47]

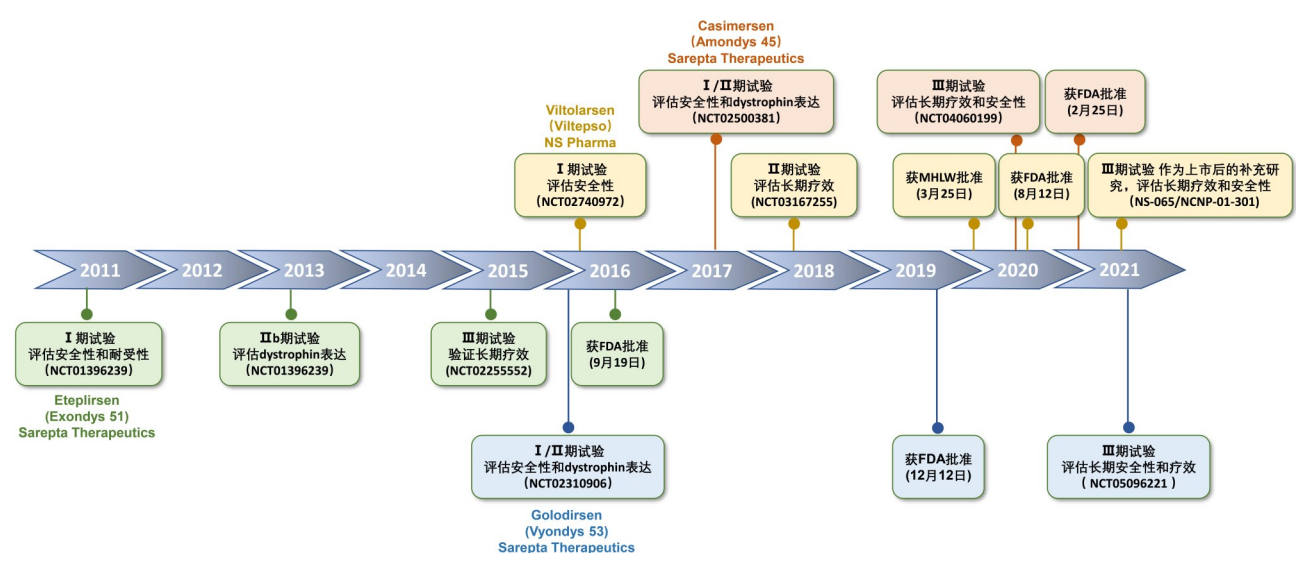


图3 针对Duchenne型肌营养不良症的核酸药物发展历史线

Figure 3 Development timeline of nucleic acid drugs for Duchenne muscular dystrophy

2.3 传统小分子药物和核酸药物的优点和局限性

小分子药物在治疗DMD疾病中展现出了广泛的应用潜力。其相对分子质量通常低于900 Da,具有良好的细胞膜通透性,可与细胞内多种靶点(如酶、受体和核酸)相互作用,且靶点选择灵活,可作用于细胞内外多种通路。此外,小分子药物通常通过化学合成制备,生产和储存过程简单,稳定性较高,研发成本和周期相对较低,周期较短。与大分子药物相比,其给药途径具有非侵入性,可口服或注射,递送方便。然而,小分子药物的局限性也较为明显,其疗效往往局限于缓解病理症状,无法从根本上修复遗传缺陷。此外,长期用药可能引发不良反应,如骨密度下降、代谢异常等,还可能产生耐药性。

核酸药物能够精准地靶向DMD的分子病因,特别

是基因突变。这使得核酸药物具有高度的特异性,能够选择性地修复特定的外显子跳跃或无义突变,恢复功能性抗肌萎缩蛋白的表达,从而减缓或延缓疾病发展。相较于传统药物,核酸药物能够更直接地针对基因缺陷进行治疗,降低不可控的全身性不良反应的发生风险。尽管核酸药物在治疗DMD等遗传性疾病中展现出潜力,但也面临一系列挑战。首先,核酸药物的稳定性较差,易受核酸酶降解,导致药效减弱;此外,药物的组织渗透能力低,特别是在肌肉等目标组织中的传递效率有限,需要借助载体系统来提高传递效率;核酸药物的给药方式通常需要频繁注射,这可能影响患者的依从性,并且治疗过程中可能出现局部不良反应,如注射部位的疼痛或炎症。药物的高成本和复杂的生产工艺也是实际应用中的障碍。此外,虽然某些

药物能够部分恢复抗肌萎缩蛋白的表达,但效果往往有限,特别是在疾病晚期,难以完全逆转已发生的肌肉损伤,且长期疗效和安全性尚不完全明确。免疫反应和个体差异性也可能导致部分患者的治疗效果不尽如人意。因此,虽然核酸药物在DMD治疗中具有巨大前景,但其全面应用仍需解决以上技术和临床问题。

3 DMD基因治疗研究进展

基因治疗的目标是从根本上修复或替代缺陷的DMD基因,恢复抗肌萎缩蛋白的表达,理论上能够长期甚至永久改善病情。目前,基因治疗在基因替代和基因编辑领域取得了重要进展,并且各有侧重。基于微型基因递送和双载体系统的基因替代疗法适用性更广;基于成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白9(CRISPR-associated protein 9, Cas9)的基因编辑法则具有更高的精准性,适用于小范围内的DMD基因外显子跳跃或修复。

3.1 基因替代疗法

基因替代疗法是DMD治疗中的重要策略,其核心功能是递送功能性DMD基因来弥补患者体内的基因缺陷。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)因高感染效率、低免疫原性和多组织靶向性成为递送基因的首选载体。目前,AAV载体已被广泛用于递送人工设计的基因片段,尤其是在针对骨骼肌、膈肌和心肌等靶组织的基因替代治疗中显示出巨大的发展潜力。然而,由于DMD基因过大(超过11 kb),远超AAV载体的封装容量限制(约5 kb),因此用AAV载体直接递送完整的DMD基因面临技术限制。为克服这一问题,研究人员提出了两种主要策略:微型基因递送和双载体系统。

3.1.1 微型DMD基因递送

微型DMD(mini-/micro-dystrophin)基因通过保留抗肌萎缩蛋白的关键功能结构域,将基因片段缩小至AAV载体容量范围内,从而实现递送。该策略在动物模型中已展现出良好的疗效。例如,2023年的一项研究利用AAV9载体递送微型DMD基因,在金毛犬肌营养不良(golden retriever muscular dystrophy, GRMD)模型中开展了临床前试验。结果显示, μ Dys5蛋白在骨骼肌和心脏中成功表达,显著改善了犬的肢体运动和呼吸功能,同时减少了组织病理损伤。尽管该治疗未能完全恢复金毛犬的正常表型,但实验组表现出良

好的药物耐受性,无显著不良反应。为降低免疫反应,该研究还优化了基因启动子的设计,使用肌肉特异性启动子代替了常用的人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子,使微型DMD基因仅在肌肉组织中表达^[48]。这一改进不仅减少了非靶器官的免疫反应,还确保了在无免疫抑制剂干预的情况下,能够实现患者体内稳定的基因表达。这些成果表明,微型DMD基因递送是一种安全且有效的策略,为DMD患者带来了显著的治疗效果。然而,由于微型DMD基因不具备完整功能,在患者的肌肉功能恢复和病理改善方面疗效仍较为有限。这一发现提示我们,在将动物模型的研究成果转化为人类临床应用时,需要考虑基因治疗的局限性,并对治疗方案进行相应的调整和优化。比较医学研究强调了跨物种治疗策略的有效性和局限性,同时也指出了在动物模型中观察到的疗效可能不会完全适用于人类。因此,这些研究成果虽然为DMD患者带来了新的治疗希望,但在进入临床试验和最终应用于临床治疗之前,仍需进行深入的研究和评估。

3.1.2 双AAV载体递送方法

为克服微型DMD基因功能的局限性,另一种策略是采用双AAV载体系统,即用两个AAV载体分别携带DMD基因的不同片段,在体内通过同源重组实现完整或接近完整的抗肌萎缩蛋白表达。这一策略在早期研究中曾面临诸多技术挑战,如转基因重组效率低、启动子表达不均等问题,但2023年的一项最新研究在这些问题上取得了突破性进展。研究人员开发了一种改进的双AAV载体系统,不仅实现了高效的抗肌萎缩蛋白表达,还通过微滴式数字PCR(Droplet digital PCR, ddPCR)技术精确评估了体内转基因重组效率。结果表明,在mdx小鼠中全身递送双AAV载体后,显著恢复了肌肉中的抗肌萎缩蛋白表达,并极大改善了肌肉组织的病理特征^[49]。与单AAV载体方法相比,双AAV载体递送方法在重组效率和治疗效果上展现出显著优势,为DMD患者的基因替代治疗提供了新的可能性。

3.2 基因编辑疗法

3.2.1 CRISPR/Cas9技术在DMD小动物模型中的应用

CRISPR/Cas9基因编辑技术作为一种新型的基因组编辑工具,近年来在基因治疗和疾病修复领域获得了广泛关注。尤其是在DMD等遗传性疾病中,应用CRISPR/Cas9基因编辑技术可为修复DMD基因缺陷提

供有潜力的治疗方法。研究表明, CRISPR/Cas9 在多种 DMD 动物模型中已显示出积极的治疗效果。Long 等^[50] 通过 CRISPR/Cas9 技术对出生后的 DMD 小鼠进行基因修复, 部分恢复了抗肌萎缩蛋白的表达, 尽管该研究未能完全恢复抗肌萎缩蛋白表达至正常水平, 但所展现出的肌肉病理改善和功能恢复效果仍表明 CRISPR/Cas9 技术在 DMD 治疗方面具有较大的应用价值。该研究为临床上实施基因编辑治疗进行了有效的初步尝试, 尤其体现在出生后的基因治疗应用方面。Tabebordbar 等^[51] 则在 DMD 小鼠肌肉组织和肌肉干细胞中应用 CRISPR/Cas9 技术, 成功恢复了抗肌萎缩蛋白的表达。这一研究表明, CRISPR/Cas9 不仅能够直接编辑体内肌肉细胞中的 *DMD* 基因, 还能够通过修复肌肉干细胞来实现长效治疗, 并展现了恢复肌肉功能和改善组织病理的潜力。Nelson 等^[52] 应用 CRISPR/Cas9 技术修复 DMD 小鼠中的 *DMD* 基因突变, 有效提高了抗肌萎缩蛋白的表达水平, 并显著改善肌肉功能, 特别是在疾病早期阶段。最近的一项研究采用静脉注射法递送 CRISPR/Cas9 基因编辑载体至新生 mdx 小鼠, 针对 55 号外显子采用了 3 种不同的基因编辑策略: 双个单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)、单个 sgRNA 和高剂量 sgRNA; 结果表明, 优化后的高剂量 sgRNA 策略能够有效恢复 mdx 小鼠体内抗肌萎缩蛋白的表达, 并且显著预防了早发性心脏衰竭^[53]。

3.2.2 CRISPR/Cas9 技术在 DMD 大动物模型及患者中的应用

与小鼠模型相比, 人的体型要大得多, 这意味着 CRISPR 基因编辑载体的递送量需要增加几个数量级。此外, 人体复杂的生物环境也可能导致脱靶效应增加、编辑效率降低以及免疫排斥反应增强。因此, 在进行人体临床试验前, 使用大型动物模型进行研究显得尤为重要。在这方面, Amoasii 等^[54] 将 Cas9 与 sgRNA 结合, 并利用 AAV 递送系统, 将 CRISPR/Cas9 技术成功应用于实验犬的心肌中, 成功恢复了动物心肌中抗肌萎缩蛋白的表达, 其水平可达到正常水平的 90%。这一研究证明 CRISPR/Cas9 基因编辑疗法在大型动物模型中的有效性, 但其临床转化潜力仍需要进一步验证。然而, 该研究尚无法明确治疗的长期安全性, 需进行长期的跟踪观察和评估, 以进一步了解治疗效果的持续性与安全性。Moretti 等^[55] 采用 CRISPR/Cas9 介导的外显子剪切方法, 恢复了 DMD 猪模型中的阅读框, 成功表达了截短的功能性抗肌萎缩蛋白, 并改善了猪的

骨骼和心肌功能。这一研究结果进一步提示 CRISPR/Cas9 技术在大型动物模型中应用的巨大潜力, 尤其是在基因编辑修复突变并恢复蛋白表达方面, 为治疗 DMD 带来了新的希望。

同时, 多个研究团队和制药公司也在积极探索 CRISPR/Cas9 在 DMD 临床治疗中的应用^[22]。例如, 美国 Sarepta Therapeutics 公司正在开展“SRP-9001”临床试验, 结合 AAV 载体和 CRISPR/Cas9 技术, 向 DMD 患者体内递送微型 *DMD* 基因, 初步数据显示其具有良好的疗效和安全性; 2020 年, 该公司还启动了针对外显子 51 的基因编辑疗法的 I 期临床试验, 受试者为 4 岁以上的 DMD 患者, 旨在评估该疗法的安全性、耐受性及其初步的疗效。预计在接下来的数年内, 将会有更多的临床试验验证其长期效果。此外, 美国 Editas Medicine 公司与 Allergan 公司也在开展针对 DMD 的基因编辑疗法项目, 名为“EDIT-101”, 旨在通过 CRISPR/Cas9 技术修复 *DMD* 基因中的外显子缺失, 初步结果已表明 CRISPR/Cas9 能有效恢复抗肌萎缩蛋白的表达; 2021 年, 美国 Editas Medicine 公司宣布将在美国和欧洲启动 EDIT-101 的 I 期临床试验, 评估其对 DMD 患者的安全性及初步疗效。预计该疗法将在 2024 年开始招募患者, 并持续监测。此外, 瑞士 CRISPR Therapeutics 公司与美国 Vertex Pharmaceuticals 公司的合作项目则聚焦于通过 CRISPR/Cas9 修复 *DMD* 基因中的外显子缺失, 以改善肌肉功能; 2023 年, 该项目已在其临床前动物模型中展示了基因编辑的治疗潜力, 并计划在未来几年启动临床试验。

通过观察不同动物模型对 CRISPR/Cas9 治疗的反应, 能够发现可能存在的物种特有差异, 这对于完善治疗方案和评估人类治疗的安全性极为关键。此外, 这些研究还能够使人们深入了解基因编辑技术在不同器官中的分布、持久性以及可能产生的不良反应, 为临床上的精确治疗提供了宝贵的数据。综上所述, 比较医学的研究不仅可以推动 CRISPR/Cas9 技术从实验室研究向临床应用的转化, 而且为 DMD 患者带来了更加精确和个性化的治疗新希望。

3.3 基因治疗的优势与局限性

基因治疗的最大优势在于能够从根本上修复或替代缺陷 *DMD* 基因, 从而恢复抗肌萎缩蛋白的功能, 具有潜在的长期或永久疗效。因此, 基因治疗在 DMD 治疗中展现出了显著优势。通过外显子跳跃疗法、基因替代和基因编辑等技术, 基因治疗可针对患者特定的

突变类型实现个性化治疗。然而,基因治疗也面临诸多挑战,其中递送效率是关键瓶颈,目前AAV载体的肌肉组织靶向能力有待进一步提高。基因治疗的长期疗效与安全性同样需要关注。在人体中,基因治疗的可持续性及其潜在不良反应尚未得到充分验证。此外,脱靶效应、载体免疫原性以及治疗费用高昂等问题也限制了其应用范围。尽管如此,基因治疗为DMD提供了革命性的希望,后续若能在递送效率、安全性和成本控制等方面取得突破,将会实现更广泛的临床转化。

4 展望

虽然DMD核酸药物与基因治疗在临床转化和未来发展展现出巨大的潜力,但同时也面临诸多的挑战。特别是在临床试验中,个体死亡等重大事件的发生不容忽视。截至目前,一共报道过2例DMD患者死亡病例,且都与基因治疗相关。其中一例是通过medRxiv预出版平台报告的:2021年12月,辉瑞公司在其1b期临床试验中发现,一名16岁的DMD患者在接受高剂量基因疗法-PF-06939926治疗后,因心源性休克死亡^[56]。这一事件引发了人们对基因治疗安全性的关注,尤其是在高剂量给药时潜在的免疫反应方面尚有潜在风险。因此,对基因治疗的风险与收益进行综合评估显得尤为重要。

联合疗法是DMD治疗的一个重要方向。联合使用核酸药物和小分子药物可以通过不同机制进行双重干预。例如,核酸药物可以修复突变引起的翻译缺陷,而小分子药物则可以提升蛋白的稳定性或促进功能性的抗肌萎缩蛋白的合成,从而在多方面改善患者的肌肉功能,延缓病程。核酸药物通常有较强的靶向性,而小分子药物则可以降低免疫反应的风险,帮助减少基因治疗可能带来的免疫排斥反应。此外,小分子药物可通过减轻炎症和抑制纤维化,改善肌肉微环境,为基因治疗提供更佳的递送环境和肌肉功能恢复条件。基因编辑与抗炎药物联合在动物实验中已显示出协同效果。然而,联合治疗仍需优化药物剂量、递送时间窗及联合模式,同时也需要充分关注临床试验中联合用药的安全性和药物相互作用。DMD的临床转化还面临着个体化治疗的需求。突变类型多样性要求开发针对性治疗策略,而高昂的治疗费用及审批监管标准也限制了其广泛应用。

在未来,技术的发展将为DMD治疗带来更多希望,例如低免疫反应的非病毒载体、更高效的基因编辑工具的开发与应用,以及人工智能在加速药物设计

和基因疗法开发中的作用。而动物模型在从基础研究到临床应用的协同推进过程中同样具有重要的支撑作用,尤其是非人灵长类DMD模型在验证治疗效果方面具有不可或缺的作用。非人灵长类动物在DMD基因序列和表达调控上与人类高度相似。本课题组以往的研究结果表明,非人灵长类DMD模型在肌肉病理、纤维化、炎症反应和运动功能等方面表现出与人类DMD患者类似的病理特征,因此是评估上述DMD治疗方法有效性和安全性的最佳模型^[57]。同时还应加强基础与临床研究团队间的合作,共同推动研究成果的快速转化,最终制定更安全、高效和经济可行的治疗方案。

[作者贡献 Author Contribution]

刘思雨负责初稿写作并进行图表绘制;

赖跃昭负责初稿写作;

郭文婷、陈学进对文章内容进行指导与修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] BOCCANEGR A B, CAPPELLARI O, MANTUANO P, et al. Growth hormone secretagogues modulate inflammation and fibrosis in *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. Front Immunol, 2023, 14:1119888. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1119888.
- [2] JAXYBAYEVA A, CHUNKAYEVA D, MYRZALIYEVA B, et al. Duchenne muscular dystrophy in Kazakhstan: a journey from diagnosis to the treatment, the biases and achievements[J]. J Neuromuscul Dis, 2023, 10(2): 263-269. DOI: 10.3233/JND-221559.
- [3] RICCI G, BELLO L, TORRI F, et al. Therapeutic opportunities and clinical outcome measures in Duchenne muscular dystrophy[J]. Neurol Sci, 2022, 43(Suppl 2): 625-633. DOI: 10.1007/s10072-022-06085-w.
- [4] FISCHER R, PORTER K, DONOVAN J M, et al. A mixed-method study exploring patient-experienced and caregiver-reported benefits and side effects of corticosteroid use in Duchenne muscular dystrophy[J]. J Neuromuscul Dis, 2023, 10(4):593-613. DOI: 10.3233/JND-221617.
- [5] DEN HARTOG L, ASAKURA A. Implications of Notch signaling in Duchenne muscular dystrophy[J]. Front Physiol, 2022, 13:984373. DOI: 10.3389/fphys.2022.984373.
- [6] KODIPPILI K, RUDNICKI M A. Satellite cell contribution to disease pathology in Duchenne muscular dystrophy[J]. Front Physiol, 2023, 14:1180980. DOI: 10.3389/fphys.2023.1180980.
- [7] SAIFULLAH, MOTOHASHI N, TSUKAHARA T, et al. Development of therapeutic RNA manipulation for muscular dystrophy[J]. Front Genome Ed, 2022, 4:863651. DOI: 10.3389/fgeed.2022.863651.
- [8] MIN Y L, BASSEL-DUBY R, OLSON E N. CRISPR correction of Duchenne muscular dystrophy[J]. Annu Rev Med, 2019, 70:

- 239-255. DOI: 10.1146/annurev-med-081117-010451.
- [9] OLSON E N. Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(22): e2004840117. DOI: 10.1073/pnas.2004840117.
- [10] AARTSMA-RUS A, DE WAELE L, HOUWEN-OPSTAL S, et al. The dilemma of choice for Duchenne patients eligible for exon 51 skipping the European experience[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2023, 10(3):315-325. DOI: 10.3233/JND-221648.
- [11] MAMSA H, STARK R L, SHIN K M, et al. Sarcospan increases laminin-binding capacity of α -dystroglycan to ameliorate DMD independent of Galgt2[J]. *Hum Mol Genet*, 2022, 31(5): 718-732. DOI: 10.1093/hmg/ddab276.
- [12] REID A L, ALEXANDER M S. The interplay of mitophagy and inflammation in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(7):648. DOI: 10.3390/life11070648.
- [13] KAMDAR F, GARRY D J. Dystrophin-deficient cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(21): 2533-2546. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.02.081.
- [14] MANINI A, ABATI E, NUREDINI A, et al. Adeno-associated virus (AAV)-mediated gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: the issue of transgene persistence[J]. *Front Neurol*, 2021, 12:814174. DOI: 10.3389/fneur.2021.814174.
- [15] NOVAK J S, SPATHIS R, DANG U J, et al. Interrogation of dystrophin and dystroglycan complex protein turnover after exon skipping therapy[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2021, 8(s2): S383-S402. DOI: 10.3233/JND-210696.
- [16] FRANK D E, SCHNELL F J, AKANA C, et al. Increased dystrophin production with golodirsén in patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Neurology*, 2020, 94(21): e2270-e2282. DOI: 10.1212/WNL.00000000000009233.
- [17] SHIRLEY M. Casimersen: first approval[J]. *Drugs*, 2021, 81(7): 875-879. DOI: 10.1007/s40265-021-01512-2.
- [18] WILTON-CLARK H, YOKOTA T. Casimersen for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Drugs Today*, 2021, 57(12):707-717. DOI: 10.1358/dot.2021.57.12.3352740.
- [19] HU G, CHEN C. Promising treatments for Duchenne muscular dystrophy: restoring dystrophin protein expression using nucleic acid therapeutics[J]. *Int J Drug Discov Pharmacol*, 2023: n.pag. DOI: 10.53941/ijddp.0201002.
- [20] SAZANI P, WELLER D L, SHREWSBURY S B. Safety pharmacology and genotoxicity evaluation of AVI-4658[J]. *Int J Toxicol*, 2010, 29(2):143-156. DOI: 10.1177/1091581809359206.
- [21] SAZANI P, NESS K P, WELLER D L, et al. Chemical and mechanistic toxicology evaluation of exon skipping phosphorodiamidate morpholino oligomers in mdx mice[J]. *Int J Toxicol*, 2011, 30(3): 322-333. DOI: 10.1177/1091581811403504.
- [22] HAPPI MBAKAM C, LAMOTHE G, TREMBLAY J P. Therapeutic strategies for dystrophin replacement in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Front Med*, 2022, 9:859930. DOI: 10.3389/fmed.2022.859930.
- [23] STIMPSON G, RAQUQ S, CHESSHIRE M, et al. Growth pattern trajectories in boys with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2022, 17(1):20. DOI: 10.1186/s13023-021-02158-9.
- [24] MENDELL J R, RODINO-KLAPAC L R, SAHENK Z, et al. Eteplirsén for the treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2013, 74(5): 637-647. DOI: 10.1002/ana.23982.
- [25] ALFANO L N, CHARLESTON J S, CONNOLLY A M, et al. Long-term treatment with eteplirsén in nonambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Medicine*, 2019, 98(26): e15858. DOI: 10.1097/MD.00000000000015858.
- [26] TRAYNOR K. Eteplirsén approved for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2016, 73(21):1719. DOI: 10.2146/news160063.
- [27] AARTSMA-RUS A, KRIEG A M. FDA approves eteplirsén for Duchenne muscular dystrophy: the next chapter in the eteplirsén Saga[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27(1): 1-3. DOI: 10.1089/nat.2016.0657.
- [28] MCDONALD C M, SHIEH P B, ABDEL-HAMID H Z, et al. Open-label evaluation of eteplirsén in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 51 skipping: PROMOTRIAL[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2021, 8(6):989-1001. DOI: 10.3233/JND-210643.
- [29] ECHIGOYA Y, LIM K R Q, TRIEU N, et al. Quantitative antisense screening and optimization for exon 51 skipping in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(11):2561-2572. DOI: 10.1016/j.jymthe.2017.07.014.
- [30] ANWAR S, YOKOTA T. Golodirsén for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Drugs Today*, 2020, 56(8):491-504. DOI: 10.1358/dot.2020.56.8.3159186.
- [31] Anon. Abstracts of the 12th UK neuromuscular translational research conference, 4th and 5th April 2019[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2019, 6(s1): S1-S109. DOI: 10.3233/JND-190000.
- [32] SERVAIS L, MERCURI E, STRAUB V, et al. Long-term safety and efficacy data of golodirsén in ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 53 skipping: a first-in-human, multicenter, two-part, open-label, phase 1/2 trial[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2022, 32(1): 29-39. DOI: 10.1089/nat.2021.0043.
- [33] AARTSMA-RUS A, COREY D R. The 10th oligonucleotide therapy approved: golodirsén for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2020, 30(2): 67-70. DOI: 10.1089/nat.2020.0845.
- [34] ASSEFA M, GEPFERT A, ZAHEER M, et al. Casimersen (AMONDYS 45™): an antisense oligonucleotide for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Biomedicines*, 2024, 12(4): 912. DOI: 10.3390/biomedicines12040912.
- [35] VASTERLING M E, MAITSKI R J, DAVIS B A, et al. AMONDYS 45 (casimersen), a novel antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer: clinical considerations for treatment in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Cureus*, 2023, 15(12): e51237. DOI: 10.7759/cureus.51237.
- [36] CLEMENS P R, RAO V K, CONNOLLY A M, et al. Long-term functional efficacy and safety of viltolarsén in patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2022, 9

- (4):493-501. DOI: 10.3233/JND-220811.
- [37] COHEN S A, BAR-AM O, FUOCO C, et al. *In vivo* restoration of dystrophin expression in mdx mice using intra-muscular and intra-arterial injections of hydrogel microsphere carriers of exon skipping antisense oligonucleotides[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9):779. DOI: 10.1038/s41419-022-05166-0.
- [38] POLITANO L. Read-through approach for stop mutations in Duchenne muscular dystrophy. An update[J]. *Acta Myol*, 2021, 40(1):43-50. DOI: 10.36185/2532-1900-041.
- [39] 刘延波, 徐乃军, 贾飞勇. Duchenne肌营养不良(DMD)发病机制及治疗研究进展[J]. *生命科学*, 2012, 24(4):354-361.
- LIU Y B, XU N J, JIA F Y. The research progresses of Duchenne muscular dystrophy (DMD) in it's pathogenesis and therapy[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2012, 24(4):354-361.
- [40] MICHOROWSKA S. Ataluren-promising therapeutic premature termination *Codon* readthrough frontrunner[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8):785. DOI: 10.3390/ph14080785.
- [41] CAMPBELL C, BAROHN R J, BERTINI E, et al. Meta-analyses of ataluren randomized controlled trials in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Comp Eff Res*, 2020, 9(14):973-984. DOI: 10.2217/ce-2020-0095.
- [42] MUNTONI F, DESGUERRE I, GUGLIERI M, et al. Ataluren use in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy: patient demographics and characteristics from the STRIDE registry[J]. *J Comp Eff Res*, 2019, 8(14):1187-1200. DOI: 10.2217/ce-2019-0086.
- [43] MERCURI E, MUNTONI F, OSORIO A N, et al. Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE registry and CINRG DMD natural history study[J]. *J Comp Eff Res*, 2020, 9(5):341-360. DOI: 10.2217/ce-2019-0171.
- [44] FONTELONGA T M, JORDAN B, NUNES A M, et al. Sunitinib promotes myogenic regeneration and mitigates disease progression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(13): 2120-2132. DOI: 10.1093/hmg/ddz044.
- [45] SIRBU C A, IVAN R, AUTHIER F J, et al. Orphan drugs in neurology-a narrative review[J]. *J Pers Med*, 2023, 13(3):420. DOI: 10.3390/jpm13030420.
- [46] SHEIKH O, YOKOTA T. Advances in genetic characterization and genotype-phenotype correlation of Duchenne and Becker muscular dystrophy in the personalized medicine era [J]. *J Pers Med*, 2020, 10(3):111. DOI: 10.3390/jpm10030111.
- [47] COLLOTTA D, BERTOCCHI I, CHIAPELLO E, et al. Antisense oligonucleotides: a novel Frontier in pharmacological strategy[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1304342. DOI: 10.3389/fphar.2023.1304342.
- [48] BIRCH S M, LAWLOR M W, CONLON T J, et al. Assessment of systemic AAV-microdystrophin gene therapy in the GRMD model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(677): eabo1815. DOI: 10.1126/scitranslmed.abo1815.
- [49] ALBINI S, PALMIERI L, DUBOIS A, et al. Assessment of therapeutic potential of a dual AAV approach for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14):11421. DOI: 10.3390/ijms241411421.
- [50] LONG C Z, AMOASII L, MIREAULT A A, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271):400-403. DOI: 10.1126/science.aad5725.
- [51] TABEBORDBAR M, ZHU K X, CHENG J K W, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 407-411. DOI: 10.1126/science.aad5177.
- [52] NELSON C E, HAKIM C H, OUSTEROUT D G, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 403-407. DOI: 10.1126/science.aad5143.
- [53] KUPATT C, WINDISCH A, MORETTI A, et al. Genome editing for Duchenne muscular dystrophy: a glimpse of the future? [J]. *Gene Ther*, 2021, 28(9): 542-548. DOI: 10.1038/s41434-021-00222-4.
- [54] AMOASII L, HILDYARD JCW, LI H, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2018, 362(6410): 86-91. DOI: 10.1126/science.aau1549.
- [55] MORETTI A, FONTEYNE L, GIESERT F, et al. Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nat Med*, 2020, 26(2): 207-214. DOI: 10.1038/s41591-019-0738-2.
- [56] LEK A, WONG B, KEELER A, et al. Unexpected death of a Duchenne muscular dystrophy patient in an N-of-1 trial of rAAV9-delivered CRISPR-transactivator[*R/OL*]. *medRxiv* (Preprint), 2023. (2023-05-30) [2024-12-01]. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2023.05.16.23289881v2>. DOI: 10.1101/2023.05.16.23289881.
- [57] REN S W, FU X, GUO W T, et al. Profound cellular defects attribute to muscular pathogenesis in the *Rhesus* monkey model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Cell*, 2024, 187(23): 6669-6686.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2024.08.041.

(收稿日期: 2024-11-13 修回日期: 2024-12-04)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 李文杰)

[引用本文]

刘思雨, 赖跃昭, 郭文婷, 等. 基于 Duchenne 型肌营养不良症动物模型的核酸药物与基因治疗研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 613-625. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.168.

LIU S Y, LAI Y H, GUO W T, et al. Advances in nucleic acid drugs and gene therapies based on animal models of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 613-625. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.168.