

**Centrála:**

1012 North University Blvd.  
Middletown, Ohio 45042  
Tel.: 513-424-0696  
Fax: 513-425-9907  
www.parentprojectmd.org

**Kancelária pre výskum:**

158 Linwood Plaza, Suite 220  
Fort Lee, New Jersey 07024  
Tel.: 201-944-9985  
Fax: 201-944-9987

Výročná konferencia o muskulárnej dystrofii, 13. - 16. júla 2006

**BLÍŽIACA SA LIEČBA CHLAPCOV S DUCHENNEOVOU MUSKULÁRNOU  
DYSTROFIOU**

**Čeliť tomu! Prežiť to! Zmeniť to!** To bol názov výročnej konferencie Parent Project Muscular Dystrophy (PPMD), ktorá sa konala od 13. do 16. júla 2006 v Cincinnati v Ohio. 36 vedcov a klinických expertov na svalové ochorenia prezentovalo prehľad o celkovom poznaní o Duchenovej muskulárnej dystrofii a o rôznych prístupoch pri terapii (**Čeliť tomu!**), ďalej odporúčania pre riadenie zdravotnej starostlivosti o našich chorých chlapcov (**Prežiť to!**) a napokon výsledky svojich vlastných výskumov, ktoré stále viac a viac smerujú k účinnej liečbe (**Zmeniť to!**). Ja, **Günter Scheuerbrandt**, biochemik z Nemecka, som bol **Patriciou Furlongovou**, zakladateľkou a prezidentkou PPMD, požiadaný o napísanie tejto správy pre vás, chlapcov a ich rodiny, ktorí si prajete vedieť o každom úspešnom kroku na ceste k účinnej a efektívnej liečbe Duchenovej muskulárnej dystrofie.

Správa obsahuje iba zhrnutie vedeckej časti, pretože ja nie som klinický špecialista. Nie je to vedecká publikácia, je písaná v jazyku, ktorému, dúfajme, porozumiete. Dôležité vedecké pojmy sú vysvetlené hneď na začiatku alebo na nasledujúcich stranách, kde sú po prvýkrát použité.

Všetci vedci, ktorých prezentácie tvoria časť tejto správy, mali možnosť vidieť môj návrh a v prípade nutnosti ho korigovať a všetci z nich tak urobili. Teda malo by sa tu vyskytovať minimum chýb.

Použil som mená vedcov bez ich titulov. Väčšina z nich sú profesori a všetci majú tituly PhD. alebo MD<sup>1</sup>, alebo oboje. A väčšinou všetci sú vedúcimi laboratórií, tzn., že majú kolegov, postgraduálnych študentov a študentov, ktorí pracujú ako tím na tu opísanom projekte, avšak je nemožné uvádzať tu všetky ich mená.

Toto hrozivé ochorenie - Duchenova muskulárna dystrofia (DMD) - pomaly zmierňuje svoje zovretie, čo bolo po vypočítaní si toľkých prezentácií s množstvom nových výsledkov z výskumov celkom zrejme. Pomaly, krok za krokom, sa nad DMD víťazí, aj s pomocou zaniatených ľudí pracujúcich pre nás v mnohých krajinách. Nasledujúci text vám ukáže prečo.

### Úvod.

Správa začína mojimi odstavcami s vysvetlením zopár základných faktov pre porozumenie toho, ako gény vytvárajú proteíny, prečo je dystrofin taký dôležitý, ktoré prístupy vo výskume sú aktívne sledované a ako funguje „preskok exónu“, podľa môjho názoru v súčasnosti jeden z najviac pokročilých z týchto prístupov. Na stretnutí prezentovali **Lee Sweeney** (Univerzita v Pensylvánii v Philadelphii), **Dominic Wells** (Imperial College v Londýne) a **Steve Wilton** (Univerzita západnej Austrálie v Perth) pomerne detailný úvod do týchto štyroch tém. Použil som mnohé ich výklady (ale nie všetky sú v tomto prvom odstavci) bez toho, že by som sa samostatne pridržal každej ich prednášky. Po tejto úvodnej časti je každá vedecká prednáška sumarizovaná samostatne, v niektorých prípadoch aj so základným vysvetlením.

**Ako gény vytvárajú proteíny? Gény** sú funkčné jednotky genetického materiálu **deoxyribonukleovej kyseliny, DNA**. Jej štruktúra vyzerá ako zapletený rebrík (dvojité špirála). Každý stupienok tohto rebríka pozostáva z dvoch zo štvorice rôznych malých molekúl, tzv. **báz**:

<sup>1</sup> Na Slovensku je to titul MUDr.

**adenínu, guanínu, týmusu a cytozínu** (A, G, T, C). Stupienky môžu obsahovať - z priestorových dôvodov, iba dva druhy základných kombinácií, a síce ide o základné páry **A-T** a **G-C**. Preto je postupnosť báz jedného vlákna DNA komplementárna (doplnková) k postupnosti druhého. Táto postupnosť báz (genetických znakov) je vlastne genetická informácia potrebná pre vývoj a regeneráciu živého organizmu, ktorá je odovzdávaná z jednej generácie na druhú.

Väčšina génov nesie inštrukcie pre biosyntézu **proteínov**. V bunkovom jadre je genetická informácia o aktívnych génoch kopírovaná (transkribovaná, prepísaná) do iného genetického materiálu, tzv. **premediátorovej ribonukleovej kyseliny**, alebo **pre-mRNA**, tiež niekedy nazývanej ako **transkript** (prepis). Najviac génov pozostáva z aktívnych, alebo kódovacích oblastí - **exónov** (tieto obsahujú informácie pre proteíny) a z neaktívnych oblastí, omnoho dlhších **intrónov**, ktoré však môžu byť dôležité pre kontrolu aktivít génov. Po transkripcii sa intróny odstránia z pre-mRNA a exóny sa spolu splietajú do formy **mediátorovej RNA (mRNA)**<sup>2</sup>, ktorá sa potom presunie do **ribozómu** - do proteínu syntetizujúceho štruktúry mimo jadra bunky. Ribonukleové kyseliny (RNA) používajú bázu U (**uracil**) namiesto podobnej bázy T, používanej v DNA. Stykové miesta sú špecifické postupnosti vo vnútri exónov a na hranici medzi exónmi a intrónmi, ktoré sú potrebné pre správne odstránenie nekódovacej intrónovej sekvencie z pre-mRNA. Jeho zviazanie (splicing) je dokončené prostredníctvom **komplexu zostrihu (spliceosome)** - komplexu mnohých proteínov a malých reťazcov RNA.

V mRNA špecifikujú tri po sebe nasledujúce bázy (nazývané **kodón**, alebo triplet - trojica, alebo „genetické heslo“) - až na tri výnimky, jednu z dvadsiatich rôznych aminokyselín podľa genetického kódu. Medzi kodónmi nie je žiaden priestor. V ribozómoch sú genetické kódy mRNA načítavané a prekladané do jazyka proteínov, ktoré sú postavené z mnohých aminokyselín (často z tisícok), z ich stavebných blokov.

Tri spomínané výnimky sú trojice UAA, UAG a UGA, ktoré sú tzv. **STOP kodóny**, na ktorých sa skladanie proteínov zastaví.

**Dystrofin gén a dystrofin proteín:** Duchenova a Beckerova muskulárna dystrofia sú spôsobené **mutáciou** alebo poruchou **génu s názvom dystrofin**, ktorý je nositeľom informácie pre rôzne formy proteínu **dystrofinu**. S postupnosťou 2 220 223 báz je to zďaleka ten najdlhší známy ľudský gén. Iba 11 058 báz (0,5%) v 79 exónoch tohto génu špecifikuje postupnosť 3 685 aminokyselín „bežného“ proteínu dystrofinu v kostrových svaloch. Gén má sedem, alebo možno aj osem rôznych pôvodcov. Sú to bázové sekvencie, do ktorých sa naviažu regulačné proteíny a takto aktivujú pomocou umožnenia transkripcie jeho genetickej informácie konečnú tvorbu jeho proteínu. Kvôli množstvu pôvodcov a alternatívnym spojeniam existuje mnoho rôznych prídavných foriem dystrofinu, pričom všetky z nich sú kratšie ako bežne sa vyskytujúce dystrofíny vo svaloch. Nachádzajú sa v rôznych orgánoch, jeden z nich aj v mozgu. Má dĺžku len 32 % v porovnaní s bežným dystrofinom, taktiež však môže byť postihnutý nejakou mutáciou. Toto môže byť dôvod duševných (mentálnych) problémov niektorých chlapcov s DMD.

**Veľkosť génu a proteínu dystrofinu:** Štruktúra dvojitej špirály génu dystrofinu má dĺžku 0,75mm. Spolu s ostatnými ľudskými génmi (je ich cca 25 000) sa zmestí do bunkového jadra s priemerom 0,01mm len z toho dôvodu, že genetický materiál je pospájaný extrémne natesno. Jedna molekula dystrofinu normálnej dĺžky je oveľa kratšia ako jeho gén. Dĺžka tejto molekuly je 125nm (0,000125mm), t. j. 80 000 molekúl dystrofinu položených vedľa seba v jednom rade, dokáže pokryť dĺžku práve jeden centimeter. A v jednom grame svalu je 114 miliárd molekúl dystrofinu. Toto môže pomôcť určiť úlohu vedcov: zastaviť ochorenie, nechať svaly znova pracovať, tzn. potom ako poškodený gén nedokáže viac vytvoriť dystrofin, musí sa znova objaviť rozsiahle percento z jeho bežného množstva prítomného vo svaloch. Nové dystrofíny nemusia mať tú istú štruktúru. Môžu byť kratšie, ale musia byť schopné náležite pracovať. A to znamená miliardy a miliardy nových dystrofinov, ktoré sa musia vrátiť späť do každého gramu svalu a dieťa ich tak má napokon kilogramy!

**Úloha dystrofinu:** Dystrofin je potrebný pre mechanickú stabilitu svalových buniek. Je uložený v ich bunkovej membráne. Jeden z jeho koncov, tzv. **C-zakončenie polypeptidu**, je naviazaný na skupinu iných proteínov v membráne (na dystrofin-glykoproteínový komplex) a ostatné konce, tzv.

---

<sup>2</sup> Tento proces sa nazýva aj *splicing*

**N-zakončenia polypeptidu**, sa pripájajú k sťahovacím štruktúram vo vnútri svalových buniek. Centrálna časť dystrofinu, tzv. **tyčová oblasť**, pozostáva zo zakrúteného aminokyselinového reťazca, ktorý sa niekoľkokrát stáča. Ak sťahovací pohyb svalovej bunky núti proteín dystrofin zmeniť svoju dĺžku, jeho skladaná štruktúra umožňuje pracovať ako pružina alebo absorbér otrasov. Takto dystrofin prenáša mechanickú energiu produkovanú aktínovo-myosínovým<sup>3</sup> „sťahovacím aparátom“ do membrány svalovej bunky a do vonkajších štruktúr mimo nich - do spojovacieho tkaniva a šliach, dobre vyváženým spôsobom, ktorý ich nepreťažuje.

Dystrofin má viacero úloh. Usporiadáva zložité štruktúry dystrofin-glykoproteínového komplexu a tiež umiestnenie mnohých iných proteínov. Reguluje aj komplex procesov akým je udržiavanie správneho množstva vápnika v bunkách, a tie potom kontrolujú svalový prírastok. Viaceré detaily týchto spleťtých interakcií medzi mnohými zložkami v živej bunke sú stále neznáme.

Chlapci s DMD nemajú žiadne, alebo majú len veľmi nízke množstvo dystrofinu vo svojich svalových vláknach. Pokiaľ chýbajú jeho spomínané ochranné a organizačné účinky, sťahovanie svalov (svalové kontrakcie) spôsobuje trhliny vo svalových membránach, čo umožňuje prísun veľkého množstva vápnika do svalových vlákien. Nadbytočný vápnik aktivuje enzýmy ako „calpain“<sup>4</sup> a ostatné proteázy<sup>5</sup>, ktoré porušia svalové proteíny a naštartujú program deštrukcie bunky. Dôsledkom toho je postupnosť udalostí ako zápal a aktivácia fibroblastu<sup>6</sup>, čo vedie k **fibróze** (k zjazveniu tkaniva), ktoré spomaľuje regeneráciu svalov a spôsobuje symptómy typické pre starších pacientov s DMD.

Chlapci s pomalšie postupujúcou Beckerovou muskulárnou dystrofiou (BMD) majú väčšinou menej dystrofinu, ako je bežné a tento je tiež väčšinou kratší. Stále však môže plnohodnotne plniť svoju funkciu, ale nemôže pracovať tak efektívne, ako vo svojej bežnej verzii.

Ale, ako povedal v diskusii **Andrew Hoey**, nie vždy len kostrové svaly trpia chýbajúcim dystrofinom, ale tiež hladké a srdcové svaly. Poškodenie srdcových svalov vytvára kardiomyopatiu. Slabosť hladkých svalov má množstvo dôsledkov, medzi nimi obmedzenú schopnosť žíl a ciev uvoľniť sa pri zvýšenom prietoku krvi vedúcom respiračné a iné problémy, a taktiež je postihnutý tráviaci trakt (redukciou pohyblivosti čriev). Teda zmeny iba v jednom gène môžu postihnúť celý organizmus.

**Mutácie génu dystrofinu:** Existujú tri bežné typy mutácií, ktoré ovplyvňujú funkciu génu dystrofinu. **Vymazanie** - ak jeden alebo viac kompletných exónov génu chýba. **Duplikácia** - ak sa časti génu opakujú. **Bodová mutácia** - ak je vymenený, odstránený alebo pridaný jeden básový pár. Ostatné sú inverzie alebo mutácie v intrónoch, ktoré pozmeňujú bežné spájacie vzorce. Pretože kodóny mRNA sú v ribozómoch jeden po druhom čítané bez prerušenia (tento **čítací rámec**<sup>7</sup> teda nie je porušený), pokiaľ mutácia zmazala alebo pridala celé kodóny každej z troch báz. V tomto prípade tak zostáva čítací rámec „**in-frame**“<sup>8</sup> a dystrofin môže byť ešte stále vyrobený, avšak bude kratší alebo dlhší ako v bežnom prípade. Ak táto zmena postihne len nepodstatné štruktúry dystrofinu, tento môže byť čiastočne funkčný a tak spôsobí vznik menej závažnej BMD.

Ak však mutácia posunula čítací rámec jedného alebo dvoch básových párov, čítací rámec sa stane „**out-of-frame**“<sup>9</sup>. Potom je do proteínu, ktorý začína v mieste mutácie, začlenených niekoľko nesprávnych aminokyselín, až pokiaľ sa nedosiahol **nový predčasný STOP kodón**. Nekompletný dystrofin nemôže plniť svoju normálnu funkciu, zaniká a rozvíja sa DMD. Na konci tejto správy je na príklade preskoku exónu ukázaný vznik takéhoto predčasného STOP kodónu.

### Rozličné stratégie pri liečbe DMD.

Výskumníci sa pokúšajú vyvinúť liečbu DMD pomocou dvoch genetických prístupov alebo pomocou mnohých rôznych farmakologických zásahov.

---

<sup>3</sup> Sú to proteíny

<sup>4</sup> Proteáza závislá na vápniku

<sup>5</sup> Enzým zodpovedný za rozpad bielkovín

<sup>6</sup> Základná bunka väziva

<sup>7</sup> Postupnosť čítaných kodónov

<sup>8</sup> Vo význame „čítateľný“

<sup>9</sup> Vo význame „nečítateľný“

Prvý genetický prístup je pokusom zaviesť nové gény dystrofínu do jadra svalových buniek, ktoré by potom mohli dystrofín znova priamo produkovať. Mnohé experimenty na myšiach ukázali, že to môže byť dosiahnuté použitím modifikovaného („skroteneho“) vírusu, tzv. **združeného adenovírusu** (AAV<sup>10</sup>), ako prenášača, alebo **nosiča** aktívnych častí - kombinovaných exónov (cDNA), génu dystrofínu do svalových buniek. Ale nosič AAV nie je dostatočne dlhý, aby doručil kompletnú cDNA so všetkými 79 exónmi. Dokáže doručiť iba jednu tretinu cDNA, zatiaľ čo normálne by do seba pasovali. To znamená, že nový dystrofín bude mať len jednu tretinu svojej normálnej dĺžky. Pokiaľ tento skrátený dystrofín má jednu zo štruktúr spôsobujúcich BMD, účinok takejto liečby by nebol kompletný, ale spomaľoval by rýchly typ DMD na miernejší typ BMD s prakticky normálnymi vyhlídkami na život. Keďže novo zavedený genetický materiál neprepúšťa chromozómy bunky, zmutovaný gén dystrofín nie je zmenený a zostane tak ako bol v skrátenej vetve chromozómu X.

Druhý genetický prístup, tzv. **preskok exónu**, sa taktiež netýka poruchy génu. Iba ovplyvňuje spracovanie genetickej informácie na jej ceste z génu do proteínu. Spájanie exónov pre-mRNA na mRNA je špecificky pozmenené, a tak narušené, správa „out-of-frame“ je znova čitateľná, stáva sa „in-frame“. Výsledok je rovnaký, ako s technikou prenosu génu - DMD je spomaľovaná na BMD. Túto informáciu môže nahradiť kompletne nový typ liečenia - pomocou genetických liekov, špeciálne vyvinutých pre každého pacienta, tzv. antisense oligoribonucleotidy.

Pretože oba genetické prístupy sú nové, výskum musí pokračovať opatrne. Hoci je lákavé pretlačiť nové postupy urýchlene do klinickej praxe, je dôležité neurobiť chybu, ktorá by spochybnila bezpečnosť, a tak zbrzdíť celú oblasť genetickej liečby. Takže schvaľovacie postupy sú veľmi prísne a zaberú veľmi veľa času.

Tretí liečebný prístup skúša bojovať proti negenetickým následkom absencie dystrofínu, akými sú deštrukcia svalu prostredníctvom proteínov ničiacich enzýmy, netesnosti membrán, fibrózy a zápalov. Existuje množstvo liekov, od ktorých sa očakáva, že budú mať pozitívne účinky na DMD. Niektoré z nich sa už vyskytujú na trhu a pôsobia aj proti iným ochoreniam. V časti o farmakologických prístupoch bola na stretnutí prediskutovaná a sumarizovaná väčšina nedávnych výsledkov výskumu.

### Preskok exónu

Technika **preskoku exónu** sa pokúša zmeniť Duchenovu mutáciu na mutáciu Beckerovu. Ak mutácia poruší čítací rámec a spôsobí tak DMD, čítací rámec môže byť obnovený umelým odstránením jedného alebo viacerých exónov z mRNA priamo pred/po zmazaní alebo duplikácii alebo odstránením exónu, ktorý obsahuje bodovú mutáciu.

Exóny môžu byť odstránené z mRNA pomocou antisense oligoribonucleotidov (AON, viď aj str. 21). Sú to krátke samostatne zviazané štruktúry pozostávajúce z dvadsiatich až tridsiatich nukleotidov, ktorých sekvencie sú konštruované takým spôsobom, že sa naviažu len na časť bázeovej postupnosti vo vnútri odstraňovaného exónu (alebo na jeho okrajoch) a nikde inde. Antisense znamená, že ich bázeová sekvencia je v opačnom poradí k cieľovej postupnosti v pre-mRNA. Tieto AONy takto rušia spájací mechanizmus, takže **cieľové exóny** viac nie sú zastúpené v mRNA, sú **preskočené**.

Samotný gén s mutáciou nie je nahradzovaný preskokom exónu, ale jeho mRNA už viac neobsahuje informáciu preskočeného (*teda vlastne odstráneného, pozn. prekl.*) exónu alebo exónov. Keďže táto mRNA je kratšia ako je bežné, proteín dystrofín je tiež kratší, obsahuje menej aminokyselín. Ak chýbajúce aminokyseliny tvoria časť nepodstatných oblastí, ako napr. centrálnej tyčovej oblasti, kratší proteín môže ešte často krát vykonať svoju stabilizujúcu úlohu membrány svalovej bunky. Výsledkom by bola zmena niektorých symptómov DMD na oveľa miernejšie symptómy BMD.

**Oligonukleotidy** sú krátke sekvencie dvoch druhov nukleových kyselín, DNA a RNA, pričom oligo znamená „zopár“. Dve vlákna **DNA**, deoxyribonukleovej kyseliny, pozostávajú každé z reťaze striedajúcich sa fosfátových a deoxyribózových jednotiek, ich chrbtového<sup>11</sup> systému. **Deoxyribóza** je cukrová molekula s piatimi atómami uhlíka, pričom k druhému atómu uhlíka nie je

<sup>10</sup> AAV - adeno-associated virus (z angl.)

<sup>11</sup> Nosného

naviazaný jeho obvyklý atóm kyslíka. Každá jednotka cukru nesie na svojom prvom atóme uhlíka jednu zo štyroch báz. **RNA**, ribonukleová kyselina, má vo svojom chrbtovom systéme bežnú ribózovú jednotku s atómom kyslíka na druhom atóme uhlíka. **Nukleotidy** sú stavebné bloky oboch typov nukleových kyselín. Každý nukleotid pozostáva z jednej ribózy, jednej bázy a jedného fosfátu<sup>12</sup>. Takže existujú štyri rôzne **ribonukleotidy** a štyri rôzne **deoxyribonukleotidy**.

Dva druhy AONov, ktoré sú väčšinou používané na preskok exónu, sú chránené oligoribonukleotidy, takže nie sú vo svalových bunkách vôbec, alebo len pomaly deštruované prostredníctvom nukleáz - enzýmov, ktoré ničia nukleové kyseliny.

Holandskí vedci použili 2'-O-metyl-fosfotioáty (2'-O-methyl-phosphothioates), tiež nazývané metyltioáty (methylthioates) alebo 2O-metyly (2O-methyls). Tieto 2O-metyly majú ku kyslíku druhého uhlíka ribózových jednotiek pripojenú metylovú skupinu (uhlík s tromi atómami vodíka) a namiesto jedného z atómov kyslíka fosfátových skupín majú atóm síry. **Morfolíny**, ktoré použili britskí a austrálski výskumníci, majú jeden z fosfátových kyslíkov nahradený skupinou dimetyl amidov (dusík nesúci dve skupiny metylov) a taktiež sú šesťčlennými morfolínovými prstencami (každý pozostáva zo štyroch atómov uhlíka, jedného atómu kyslíka a jedného atómu dusíka s atómami vodíka pripojenými k uhlíku) nahradené kompletne ribózové jednotky.

V rámci rozhovoru s **Dr. Wiltonom** v závere tejto správy je spomínaných oveľa viac detailov o preskoku exónu. A na poslednej strane je ako príklad tejto techniky ukázaný preskok exónu 46 na obnovenie čítacieho rámca po odstránení exónu 45.

**Preskok exónu: Prvé klinické pokusy na chlapcoch s DMD v Holandsku. Prosenza B. V.** je biotechnologická spoločnosť v Leidene v Holandsku, ktorá v súčasnosti vyvíja liečbu DMD s použitím techniky preskoku exónu v spolupráci s **Drs. Gertjan van Ommen** a **Judith van Deutekom** z Leidenského univerzitného klinického centra. Gerard Platenburg, prezident spoločnosti Prosenza, oznámil, že 8. mája 2006 vydali dve holandské regulačné komisie (CCMO a IRB) povolenie na „výskumnú štúdiu účinnosti, bezpečnosti a prípustnosti jednej vnútro svalovej dávky oligoribonukleotidu AON na obnovu produkcie dystrofinu“. Toto otvorilo cestu pre prvý pokus preskoku exónu v ľudskom tele, ktorý je teraz na počiatku.

Pre tento pokus bolo vybraných šesť chlapcov s DMD vo veku 8 až 16 rokov, všetci z Holandska. Majú mutáciu génu dystrofinu, ktorá spôsobuje zmenu/posun rámca, ktorý by mohol byť obnovený prostredníctvom preskoku exónu 51. Po intenzívnych klinických testoch, vrátane povrchových biopsií, boli v jednej injekcii aplikované do jedného vnútorného svalu (do predného holenného svalu) potenciálne nové lieky, tzv. 2O-metyl AON, priamo proti exónu 51. Pacienti dostanú injekciu po častiach, t. j. iba pri nulových vedľajších účinkoch pri podaní injekcie jednému chlapcovi s DMD, bude liečený ďalší. Štyri týždne po podaní injekcie sa vykoná svalová biopsia a materiál bude analyzovaný na prítomnosť skráteného proteínu dystrofinu. Hlavným cieľom tohto prvého pokusu je vyskúšať, či preskok exónu je bezpečný a pracuje podľa očakávaní aj v pacientoch s DMD - po mnohých úspešných predklinických experimentoch so svalovými kultúrami a so zvieratami. Dokonca, ak sa v jednom liečenom svale nájde nový dystrofin, chlapci nebudú mať z tejto lokálnej liečby žiaden prospech.

Holandskí výskumníci vybrali 2'-O-metyl-fosfotioátové AONy, tiež nazývané 2O-metyly, pretože majú rozsiahle skúsenosti s týmto typom AONov, podávaných nielen injekčne priamo do svalového tkaniva, ale taktiež majú skúsenosti aj s ich systematickou aplikáciou do živých zvierat. Napríklad, po opakovanom podaní injekcií 2O-metylu proti myšiemu exónu 23 do chvostovej žily **mdx** myši<sup>13</sup>, objavilo sa vo všetkých kostrových a srdcových svaloch značné terapeutické množstvo preskočených dystrofinov.

Fakt, že 2O-metyly prenikajú tiež do srdcových svalov je významný, pretože doposiaľ ešte nebolo možné dostať do srdca ostatné druhy rozsiahlo testovaných AONov (morfolínov).

Tiež sa ukázalo, že 2O-metyly sú dystrofickými svalovými bunkami prijímané ochotnejšie ako zdravými svalovými bunkami, pravdepodobne preto, že v dystrofických membránach existujú diery. V **mdx** myšiach trvá efekt systémového preskoku s 2O-metylmi zopár mesiacov. To naznačuje, že

<sup>12</sup> Fosfátový zvyšok kyseliny fosforečnej PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

<sup>13</sup> Sú to myši s Muskulárnou Dystrofiou na chromozóme X

budúca liečba preskokom exónu by pravdepodobne musela byť opakovaná každý mesiac. Avšak presná dávka a dávkovacia frekvencia zostáva zachovaná.

Na základe veľmi sľubných predklinických výsledkov, pripravujú holandskí výskumníci ďalšie klinické skúšky s chlapcami s DMD naplánovanými na rok 2007, počas ktorých sa pokúsia preskočiť exóny 51 a 46 systematickou aplikáciou primeraného 2O-metyl AONu.

Tieto krátkodobé testy budú potom pokračovať dlhodobými skúškami, trvajúcimi približne šesť mesiacov, ktoré by mali následne významne spomaliť príznaky muskulárnej dystrofie u chlapcov s DMD. V prvých dvoch skúškach boli na preskočenie vybrané dva exóny, pretože preskočenie exónu 51 by malo byť liečbou až pre 24 % všetkých chlapcov s DMD s mutáciou odstraňujúcou exóny a preskočenie exónu 46 by malo pomôcť všetkým chlapcom s odstráneným exónom 45 - najčastejšie odstráneným exónom u pacientov s DMD (8% všetkých mutácií odstraňujúcich exóny).

Okrem AONov na preskočenie exónu 51 a 46, vyvinula Prosensa veľké množstvá štyroch iných 2O-metylov a tiež ich aj vyrába. Týchto šesť AONov by malo umožniť liečbu vyše 50% všetkých pacientov s mutáciou odstraňujúcou exóny.

Ak pôjde všetko podľa plánu, bude trvať asi 4 až 5 rokov, kým budú 2O-metyl AONy pre preskok exónu 51 a 46 pripravené na predaj ako liečba pre pacientov s DMD. Kompletný vývoj ďalších AONov bude, dúfajme, rýchlejší pretože skúsenosti s prvými dvoma AONmi by mali pravdepodobne podstatne skrátiť čas pre vyskúšanie a overenie tých nasledujúcich.

**Dr. Platenburg** verí, že na budúcom stretnutí Parent Project v roku 2007 bude môcť oznámiť výsledky skúšok prvých preskokov exónu.

#### **Preskok exónu: Príprava klinických skúšok s chlapcami s DMD v Spojenom Kráľovstve.**

V Spojenom Kráľovstve (UK) bolo pre ďalší vývoj techniky preskoku exónu a pre vykonávanie klinických štúdií založené spoločenstvo MDEX, aby sa tak maximálne skrátil čas, až pokým nebude dostupná liečba pre všetkých pacientov s DMD. S prvou klinickou štúdiou sa výskumníci pokúsia preskočiť exón 51 dystrofinu mRNA u deviatich chlapcov s DMD. Členovia konzorcia sú **Francesco Muntoni, Kate Bushby, Jenny Morgan, Dominic Wells, George Dickson, Ian Graham, Matthew Wood** a **Jenny Versnel**, všetci aktívni vo výskume DMD. V spoločenstve je taktiež zapojený aj Úrad zdravia a Výbor pre medicínsky výskum UK.

**Kate Bushby** z Univerzity v Newcastli, jedna z členov MDEXu, hovorila o detailoch pripravovaných skúšok a na začiatku spomenula, že bude prebiehať aj úzka spolupráca s niektorými výskumnými skupinami mimo UK, špeciálne s holandskou skupinou v Leidene. Roky predklinického výskumu ukázali, že antisense oligoribonukleotidy, AONy, dokážu „prinútiť“ zmutovaný gén dystrofin vytvoriť kratší proteín, tzv. Beckerov dystrofin, ktorý dokáže zmierniť mnohé symptómy chlapcov s DMD. Systematické aplikovanie týchto AONov žijúcim dystrofickým myšiam prakticky „vyliečilo“ tieto zvieratá z ich choroby. A pretože boli AONy používané celé roky na boj s inými chorobami, je známe, že sú bezpečné a nie sú toxické. Tieto pozitívne výsledky presvedčili Britských vedcov a tí na konci tohto roka odštartovali paralelnú klinickú štúdiu k súčasne vykonávanej štúdiu v Leidene.

Pred prvým pokusom MDEXu bolo prijatých ešte zopár rozhodnutí. Preskakovaný exón musí byť exón 51, pretože mnoho Duchenových mutácií, akými je odstránenie 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63 (okolo 17% všetkých Duchenových vymazaní), by mohlo byť liečiteľných preskočením exónu 51. Použitý AON bude AON H51A, jeden z morfolínov vyvinutých proti ľudskému exónu 51 v laboratóriu **Steva Wiltona** v Perth v Austrálii. Pokusu sa zúčastní deväť chlapcov s DMD vo veku od 12 do 18 rokov. Použijú sa tri rôzne dávky - 0,09; 0,297 a 0,9mg AONu v 0,9ml roztoku, vstreknutých do objemu svalu 1cm<sup>3</sup> deviatimi injekciami priamo do svalového tkaniva. Cieľový sval bude jeden zo skupiny **extensor digitorum brevis** (z lat.), skrátene EDB. Sú to svaly na vonkajšej (chrbtovej) strane chodidla, ktoré umožňujú zdvihnutie prstov na nohe. Ľudia ich v skutočnosti nepotrebujú a mnohí ich dokonca ani nemajú. Takže je možné ich odstrániť bez vážnych následkov v prípade výskytu neprijateľných vedľajších účinkov. Vykonali sa rozsiahle klinické kontroly vrátane biopsií pred a päť týždňov po očkovaní každého chlapca, tak ako je tomu zvykom pri klinických skúškach určujúcich výsledky liečby.

Hlavným cieľom skúšky je overiť, či lokálne podávanie morfolínového AONu do jediného ľudského svalu je bezpečné a či je účinná obnova tvorby aspoň niektorých dystrofinov. Dúfa sa, že s rôznymi použitými dávkami by sa mal objaviť dystrofin vo viac ako 10% svalových vlákien. To by malo

umožniť získať spoľahlivé výsledky a tiež odhadnúť celkový počet AONov potrebných na liečenie všetkých svalov chlapcov pri systematickej liečbe v budúcnosti.

Chlapci zúčastňujúci sa prvých skúšok s lokálnymi morfolínovými injekciami, z toho nebudú mať žiaden liečebný prospech. Avšak všetky výsledky týchto skúšok budú potrebné pre skutočnú liečbu, pred systematickou aplikáciou potenciálnych liekov proti DMD do krvného obehu chlapca, takže môžu byť týmto liekom zasiahnuté všetky jeho svaly. Táto druhá a dôležitejšia skúška je naplánovaná na rok 2007.

**Preskok exónu funguje na myšiach a psoch, avšak ešte existuje množstvo otázok predtým, ako sa aplikuje na chlapcoch.** *Terence Partridge*, v súčasnosti pracujúci v Detskom národnom medicínskom centre vo Washingtone, vyzdvihol množstvo otázok, ktoré by mali byť zodpovedané skôr alebo neskôr pred tým, ako sa stane preskok exónu účinnou liečbou pre chlapcov s DMD. Tiež oznámil, že v Japonsku bolo dokázané, že preskok exónu účinkoval po lokálnej aplikácii injekcie AONU do dystrofických svalov psa.

Vieme, že preskok exónu pracuje dobre u **mdx** myši - pri systematickom vstrekaní **morfolínových** AONov pôsobiacich proti ich exónu 23 do ich chvostovej žily. Napríklad, po siedmich týždňoch podávania injekcií vyzerali svaly oveľa lepšie, viac sa netrhali a z toho dôvodu sa hodnoty séra CK<sup>14</sup> dostali takmer do normálu. Nevieme ale, či sú AONy rovnomerne distribuované do všetkých svalov tak, že sa stav všetkých svalov zlepši v rovnakom čase. Už ale vieme, že morfolíny bohužiaľ nepreskočia exón 23 v srdcových svaloch. Aký je dôvod tohto zlyhania?

Dokážeme podávať dávky AONov v dostatočne vysokých koncentráciách tak, že budú účinkovať a nebudú toxické pre pacienta počas celého jeho života? Môžeme vykonávať experimenty na kultúrach svalových tkanív, ale rovnaké výsledky nemôžeme vždy očakávať aj pri živých zvieratách. Časovo náročné experimenty môžu byť vykonávané na zvieratách. No a pretože psy žijú oveľa dlhšie ako myši a dystrofické GRMD<sup>15</sup> a CXMD<sup>16</sup> zlaté retrievre sú naozaj fyzicky postihnuté, experimenty s týmito psami by mali poskytnúť výsledky pravdepodobne viac podobné tomu, čo by sme neskôr mohli vidieť pri klinických štúdiách s pacientmi s DMD.

Takéto štúdie na psoch práve začali v Tokijskom zvieracom výskumnom zariadení v Japonsku pod vedením profesora *Shin'ichi Takedu*.

Dystrofické psy majú mutáciu v spájacom mieste exónu 7 vo svojom dystrofickom géne, ktorá spôsobuje odstránenie exónu 7 v mRNA a potom rýchlo posúva čítací rámec s predčasnou STOP značkou. Preskočenie dvoch príľahlých exónov 6 a 8 by malo čítací rámec obnoviť. Rôzne dávky koktailu troch morfolínových AONov (dvoch proti exónu 6 a jedného proti exónu 8), ktoré boli vyrobené *Dr. Toshifumim Yokotom* vo Washingtone, boli lokálne podané injekciou do predného holenného svalu mladých CXMD psov. Dva týždne po injekcii boli vykonané biopsie. Keď sa vstreklo 1,2mg každého AONU rozpusteného v 1ml slanej vody, objavil sa vo všetkých svalových vláknach okolo miesta vpichu nový dystrofin a vlákna vyzerali väčšinou normálne. Japonskí vedci, ktorí majú vo svojom inštitúte „najväčší psí dom na svete“, budú v experimentoch pokračovať systematickým podávaním injekcií AONov.

Hoci morfolínové AONy pracujú veľmi dobre u cicavcov s telesnou štruktúrou podobnou tej ľudskej, neznamená to, že tieto potenciálne lieky budú účinkovať taktiež u chlapcov s DMD, navyše počas dostatočne dlhého času. Z tohto dôvodu by sa mali prešetriť aj iné typy AONov. *Dr. Partridge* ukázal štruktúry deviatich rôznych typov AONov. Väčšina práce v uplynulých rokoch sa vykonávala s morfolínmi a 2O-metylmami, teda s tými dvoma látkami, ktoré vstúpili, alebo čoskoro vstúpia do fázy klinických skúšok na chlapcoch s DMD. V Holandsku a v UK teraz štartujú dve paralelné skúšky, ktoré sú veľmi dôležité, a ktorých vysoké náklady sú plne oprávnené, pretože budúca liečba pomocou preskoku exónu by mohla potrebovať mix oboch typov AONov. Pretože napríklad individuálne toxické účinky dvoch sú pravdepodobne navzájom nezávislé, zatiaľ čo ich účinky na preskok exónu by sa dali sčítať. A stále by sa mohli kedykoľvek objaviť neznáme problémy, ktoré by bol človek

---

<sup>14</sup> Sérum CK - sérum kreatín-kinázy; je to enzým vyjadrený rôznymi typmi tkaniva; urýchľuje konverziu kreatínu na fosfokreatín

<sup>15</sup> GRMD - Golden Retriever Muscular Dystrophy (muskulárna dystrofia u zlatých retrieverov)

<sup>16</sup> CXMD - Canine X-linked Muscular Dystrophy (psia muskulárna dystrofia prenášaná chromozómom X)

schopný riešiť iba s iným koktejlom AONov, napr. jedno z iných chemických zložení by mohlo pracovať v srdci.

Navyše, činnosť musí začať a potom pokračovať po dlhý čas, kvôli výberu najúčinnnejšej postupnosti AONov, určeníu minimálnej dávky, ktorá je ešte dostatočne aktívna bez toho, že by bola toxická alebo spôsobovala imunitné reakcie. Treba nájsť najpriateľnejšiu cestu aplikácie a napokon maximálne predĺžiť čas medzi jednotlivými dávkami.

**Bude preskok exónu schopný produkovať nové svaly u starších pacientov s DMD?** A *Dominic Wells* odpovedá: Tu spomínané svalové bunky budú stabilizované, keď je po preskoku exónu vyrobený nový dystrofín. A veci sa pravdepodobne nezhoršia. Či by to malo obnovovaciu funkciu, sa však dnes ešte nevie. Možno kombinácie preskoku exónu s farmakologickou liečbou, napr. s antimyostatínovými liekmi<sup>17</sup>, by boli trochu účinnejšie. Už boli začaté experimenty na myšiach.

### Prenos génu dystrofinu

Prenos (transportovanie) dostatočného množstva neporušeného génu dystrofinu do jadra dystrofických svalových buniek by bolo efektívnou liečbou DMD. To však za podmienky, že genetické informácie nových génov sú použité proteínmi, ktoré syntetizujú (zlučujú) ribozómy bunky na produkciu dostatočného množstva funkčného dystrofinu, ktorý potom migruje na svoje normálne miesto v bunkovej membráne a pripojí správne sa k proteínom dystrofín-glykoproteínového komplexu.

Výskumné tímy *Xiao Xiao*, toho času na Univerzite v Severnej Karolíne v Chapel Hill a *Jeffreyho Chamberlaina* z Univerzity vo Washingtone v Seattli sú tie, ktoré najaktívnejšie pracujú na poli génovej liečby pacientov s DMD. Vedci odštartovali svoju prácu použitím vírusov, akými sú vírusy bežného prechladnutia (adenovírusy), ako transportérov, tzv. **génových nosičov**. Kvôli tejto úlohe boli vírusy modifikované takým spôsobom, že sa nemohli množiť v bunkách, ktoré napadli, pretože im boli odstránené gény pre ich rozmnožovanie. Na tomto mieste vznikne potom priestor pre kódovacie sekvencie liečebného génu prenášaného spolu s určitými kontrolnými sekvenciami. Sekvencia potrebná pre produkciu proteínu dystrofinu, t.j. **cDNA**<sup>18</sup> tohto génu, je dlhá 14 000 bázových párov, obsahuje všetkých 79 exónov spojených navzájom, bez intrónov medzi týmito exónmi. Adenovírusy sú veľmi účinné v prenikaní do nedeliteľných svalových buniek. Nedoručia prenášané gény do genómu cieľových buniek ale zostanú v jadre mimo chromozómov. To znamená, že tu neexistuje riziko príchodu nových génov náhodou integrovaných do ostatných génov alebo kontrolných sekvencií, kde by pravdepodobne mohli navzájom ovplyvňovať svoju aktivitu, alebo dokonca spôsobiť rakovinu.

Avšak najúčinnnejšie vírusy na prenos dystrofinu cDNA do svalov, sú tzv. združené adenovírusy (AAV<sup>19</sup>), ktoré sú približne desaťkrát menšie ako bežné adenovírusy. Ale keďže sú také malé, tak môžu transportovať iba genetický materiál s dĺžkou maximálne 5 000 bázových párov, teda asi jednu tretinu z celého dystrofinu cDNA. Z toho dôvodu musí byť bežný dystrofín cDNA výrazne skrátený, aby pasoval do tohto malého nosiča. Pacienti s miernejšou BMD majú takto skrátený dystrofín vo svojich svaloch. Transport takéhoto minigénu cDNA by „nevyliečil“ DMD, ale miesto toho ju môže transformovať do oveľa menej progresívnej formy BMD.

Aby vedci určili, ktoré zo štyroch domén, alebo oblastí (buď dve koncové oblasti, tzv. oblasti bohaté na cysteíny<sup>20</sup>, alebo centrálné tyčové oblasti), bežného proteínu dystrofinu sú dôležité a ktoré nie, vytvorili mnoho rôznych skrátených dystrofinov cDNA a dystrofinov proteínov. Identifikovali niektoré verzie, ktoré boli veľmi efektívne a funkčné na žijúcich **mdx** myšiach. Týmto umelým minidystrofinom chýba väčšina centrálnaj časti a C-zakončenie polypeptidu bežného proteínu. Prenos týchto vybraných mini génov viedol k zlepšeniu funkčnosti svalov a všetkých ostatných

<sup>17</sup> Myostatin - proteín produkovaný v kostrových svaloch, cirkuluje v krvi a vplýva na svalové tkanivá, podľa všetkého spomaľovaním rastu svalových kmeňových buniek

<sup>18</sup> Complementary DNA - komplementárna DNA; je tvorená z úplnej dospelaj formy mRNA použitím enzýmov s názvom **reverzná traskriptáza**, ktoré sa zúčastňujú na procese reverznej transkripcie

<sup>19</sup> AAV - Adeno-Associated Viruses

<sup>20</sup> Prirodzene sa vyskytujúca aminokyselina obsahujúca síru; podieľa sa na tvorbe proteínov



dystrofických príznakov **mdx** myší. Navyše, transfer génov vykazoval lepšie výsledky pri mladších zvieratách a novo syntetizovaný dystrofin zostal vo svaloch jeden rok a dlhšie (po jedinej injekčnej dávke).

**Prvé klinické skúšky prenosu génu.** *Scott McPhee*, viceprezident klinického výskumu spoločnosti **Asklepios Biopharmaceuticals** (Askbio) v Chapel Hill NC, povedal, že pred 25 rokmi, odštartovali zakladatelia Askbio ako prví práce so združenými adenovírusmi a na základe ich rozsiahlych skúseností s týmto génovým nosičom v súčasnosti vyvinuli biologickú nanočasticu (BNP) s obchodným názvom **Biostrophin™** pre prenos minidystrofinu na liečbu DMD. Po rozsiahlych predklinických testoch, vrátane toxikológie a štúdií na zvieratách, a po získaní povolení od regulačných úradov, bola odštartovaná prvá fáza skúšok so šiestimi chlapcami s DMD. Účelom týchto skúšok je rozhodnúť, či táto technika nespôsobuje nejaké toxické alebo iné vedľajšie účinky a zistiť, či bol minidystrofin u ľudských pacientov vyrobený správne. Táto práca je podporovaná aj Asociáciou muskulárnych dystrofikov v Amerike, ktorá poskytla pre Askbio grant vo výške 1,6 miliónov amerických dolárov. Ak prvá fáza preukáže, že tento prístup je bezpečný a dobre znášaný pacientmi, bude sa hľadať dodatočné financovanie pre nasledujúce klinické štúdie.

Nosič, použitý pri týchto skúškach, je modifikovaný združený adenovírus sérotypu 2, nazývaný BNP2,5. Bude obsahovať minidystrofinovú génovú konštrukciu, ktorá nebude mať časti exónu 17, celé exóny od 18 do 59 a od 70 po 79 vrátane. To znamená, že predpokladaný Beckerov dystrofin bude asi tretinový oproti bežnému proteínu, pretože mu chýbajú tyčové oblasti R3 až R21 a C-zakončenie polypeptidu.

Táto prvá fáza skúšky (fáza Ia) je vykonávaná pod vedením *Dr. Jerry Mendella* z Detskej nemocnice Lekárskej akadémie pri Štátnej univerzite v Ohio v štáte Columbus. Odštartovala 28.3.2006, kedy prvý z chlapcov dostal injekcie Biodystrofinu na troch miestach (0,5cm od seba) do bicepsu jednej ruky, zatiaľ čo do bicepsu druhej ruky dostal iba soľ. Táto skúška je robená „dvojnásobne naslepo“. Ani pacienti, ani medicínski a klinickí výskumníci až do konca celej skúšky nevedia, do ktorého bicepsu boli vstreknuté nosiče.

Skúšky sa zúčastnilo šesť chlapcov s DMD, ktorí mali najmenej 5 rokov, a ktorých mutácie génu dystrofinu boli dôkladne známe. Pre každú skupinu troch pacientov boli použité dve rôzne dávky. Koncentrácie nosičov v lokálnych miestach vpichov sú oveľa väčšie ako tých, ktoré budú použité pri ďalších skúškach, kedy budú pokusne systematicky podávané do celých končatín. Preto bude teraz jednoduchšie porozumieť výsledkom liečby a taktiež ostatným neočakávaným vedľajším účinkom, akými sú zápaly a imunitné reakcie. Ak sa vyskytnú nejaké závažné problémy, bude možné odstrániť celé svalové tkanivo v okolí miesta vpichu a takto sa liečba predčasne a kompletne zastaví. Napokon, účinky liečby prenosom génov tohto druhu budú dlhodobé, preto každý krok skúšok musí byť robený postupne a s veľkou pozornosťou.

Jeden a tri mesiace po podaní injekcie budú pomocou svalovej biopsie odobraté z miesta vpichu vzorky svalových tkanív. Vzorky sa do konca skúšok ponechajú zmrazené a potom budú testované na prítomnosť nového, avšak skráteného dystrofinu.

Výsledky tejto fázy skúšky (Ia) budú dostupné približne na jar 2007. Pre zúčastnených chlapcov to nebude mať žiaden liečebný prínos. Ďalšie fázy, tzv. premost'ovacie, alebo fázy Ib, sú v súčasnosti pripravované na psoch a opiciach. Táto premost'ovacia štúdia bude, dúfajme, hotová okolo roku 2008 až 2009. Tentoraz budú dostávať infúzie nosičov celé končatiny pomocou dočasne blokovaného krvného obehu chirurgickým zákrokom podobným tomu, ktorý bol vyvinutý pre chemoterapeutickú liečbu. Táto skúška lokálneho doručovania môže potenciálne ponúknuť niektoré zlepšenia v kvalite života zúčastnených chlapcov.

Napokon, druhá a tretia fáza skúšky (fázy II a III) so systematickým dávkovaním do celého tela, je naplánovaná na roky 2009/2010 s väčším počtom účastníkov ako pri skorších fázach skúšok. Ak budú úspešné, môže byť u chlapcov s DMD zabránené ďalšiemu postupu ochorenia, dúfajme, že len s pomocou jednorázovej procedúry.

**Prísľub kmeňových buniek.** Vo svojej druhej prezentácii hovoril *Terence Partridge* o vlastne nenaplnenom príslube výskumu kmeňových buniek na vznik liečby DMD - až na jednu výnimku.

Kmeňové bunky sa môžu deliť počas nekonečne dlhého času a majú schopnosť pri každom delení umožniť vznik dvom bunkám podobným kmeňovej bunke, ako aj viac špecializovaným bunkovým

druhom. Môžu teda podstúpiť asymetrické bunkové delenie na udržovanie svojej viac menej konštantnej populácie a na zaistenie toho, že viac špecializované bunky môžu byť plynulo regenerované počas celého života organizmu.

Existujú viaceré druhy ľudských kmeňových buniek. Prvých osem buniek ľudského embrya sú **kmeňové bunky** nazývané **totipotent**, pretože každá z nich sa dokáže vyvinúť do akejkoľvek bunky ľudského tela. Štyri až päť dní po oplodnení sa vnútorné bunky formujú do vnútornej kopy buniek (sú to tzv. **blastocysty**), ktoré sa nazývajú **pluripotent**, alebo **embryonálne kmeňové bunky**. Tieto reagujú medzi sebou a produkujú rodovo obmedzené kmeňové bunky, nazývané aj **dospelé kmeňové bunky**. Každá z týchto buniek môže len formovať jedno alebo viacero špecializovaných tkanív tela. Dospelé kmeňové bunky pre tvorbu a regeneráciu svalových buniek sú tzv. **satelitné bunky**.

Ak je svalové tkanivo poškodené, satelitné bunky, ktoré ležia mimo svalovej bunky, sa presunú do poškodeného priestoru, delia sa a spájajú sa do **myotubes**<sup>21</sup>, ktoré sa potom ďalej vyvíjajú na dospelé bunky. Niektoré satelitné bunky v novom svalovom tkanive sa delia asymetricky, teda tiež produkujú nové satelitné bunky, ktoré potom zaujmú svoje bežné miesto mimo regenerujúcich sa buniek a sú pripravené pre prípad potreby v ďalšom kole bunkovej regenerácie, napríklad pri degradácii pri dystrofických procesoch.

Satelitné bunky môžu byť tiež vpichnuté, lokálne transplantované, do porušených svalov, kde sa správajú ako myogenické kmeňové bunky pre opravu porušeného svalového tkaniva. Tieto bunky reagujú veľmi rýchlo, za pár dní dokáže len zopár z nich vyprodukovať tisíce jadier svalových buniek, ktoré potom formujú kompletné svalové vlákna. Ak tieto externé satelitné bunky pochádzajú z normálneho svalu s neporušeným génom dystrofinom, nový sval potom obsahuje tiež dystrofin, dokonca aj keď ho okolité svalové tkanivo nemôže vyrobiť (ako sa to ukázalo pri pokusoch na **mdx** myšiach).

Ale pri liečbe DMD by nebolo lokálne podávanie veľkého množstva injekcií do všetkých svalov akceptovateľnou liečebnou procedúrou. Bola by potrebná možnosť systematického podávania pomocou zopár injekcií do krvného obehu tak, aby boli zasiahnuté všetky svaly, dokonca aj srdcové a pľúcne.

Preto je pre efektívnu liečbu DMD kmeňovými bunkami potrebný bezpečný a eticky akceptovateľný zdroj obrovského množstva dospelých kmeňových buniek, ktorý by spôsobil výhradne vznik svalových buniek a žiadnych iných, predovšetkým nie tumorov. A malo by byť možné aplikovať tieto bunky systematicky pomocou injekcií do cievného systému, ktorý by ich distribuoval do celého tela. Potom musia prejsť membránami svalových buniek a zostať tam bez tvorby akýchkoľvek lokálnych problémov. Ale okrem jednej výnimky, sa nenašiel jediný zdroj kmeňových buniek, ktorý by pri experimentoch na živých **mdx** myšiach spĺňal všetky tieto podmienky.

Spomínanou výnimkou sú bunky **mesoangioblast**<sup>22</sup>, ktoré sú dospelými kmeňovými bunkami ležiacimi na vonkajšej strane malých ciev vo vnútri svalového tkaniva. **Giulio Cossu** a jeho kolegovia vo Výskumnom inštitúte kmeňových buniek Univerzity v Pavii v Taliansku nedávno uskutočnili základný experiment, ktorého výsledky sa stanú veľmi dôležitými pre liečbu rôznych foriem muskulárnych dystrofií pomocou kmeňových buniek.

Nepoužili totiž **mdx** myši, ale myši, ktorých gén pre proteín alfa-sarcoglykán, je to jeden z proteínov združeného dystrofinového komplexu, bol neaktívny. Tieto myši mali pletencovú muskulárnu dystrofiu končatín (LGMD), ktorá je trochu podobná DMD. Talianski vedci izolovali bunky **mesoangioblastu** zo zdravých myší, ošetrili ich pomocou rôznych vývinových faktorov a potom ich vpichli injekciami do krvného obehu myší s LGMD. Tieto „zdravé“ kmeňové bunky boli schopné migrovať do všetkých kostrových svalov živých myší a spôsobili opätovný výskyt viac ako 80% z bežného množstva alfa-sarcoglykán.

Pre možnú liečbu DMD s použitím tejto novej techniky, by musel byť do pacienta prenesený neporušený gén dystrofin - bunky **mesoangioblast** prenesené zo živých organizmov pomocou procedúr so známymi nosičmi, potom znásobené v laboratóriu a napokon opätovne vstreknuté do

<sup>21</sup> Pretiahnuté viacjadrové bunky s tromi alebo viacerými jadrami, ktoré obsahujú niektoré preiferne umiestnené myofibrily (proteínové komplexy svalového vlákna)

<sup>22</sup> Z angl.; bunky mezenchymálneho typu spájajúce sa so stenami veľkých ciev

krvného obehu pacienta. Pravdepodobne by sa táto liečba musela opakovať pravidelne, preto je dôležité, aby tieto bunky neboli považované imunitným systémom ako nevlastné, a aby ich nezamietol.

V súčasnosti je tento prístup najviac sľubným príkladom liečby DMD pomocou kmeňových buniek. Všetky ostatné kmeňové bunky skúšané na živých myšiach nedosahovali také pôsobivé výsledky. Problém môže byť skôr v samotnom svalovom tkanive než v kmeňových bunkách, takže vedci musia nájsť riešenie pre tieto ťažkosti.

**Dr. Partidge** zakončil svoju reč upozornením, že na rôzne kmeňové bunky - ako na potenciálnu liečbu DMD, existuje mnoho nárokov. Vo väčšine prípadov nie sú tieto nároky dobre podložené. Svalová biológia je plná nástrah pre neopatrných vedcov a dokonca aj skúsení vedci sa niekedy pomýlili na tom, že uverili tomu, čo vidia.

## Farmakologické prístupy

**Čítanie prostredníctvom predčasného STOP kodónu.** Proteíny sú syntetizované na **ribozómy**, komplexné štruktúry pozostávajúce z troch dlhých reťazcov RNA s enzymatickou aktivitou (tzv. **ribozým**) a z okolo 80 rôznych proteínov. Informácia potrebná na produkciu proteínov je prenesená do ribozómov ako reťazce mRNA. Vo vnútri ribozómov je potom zo svojich stavebných blokov, z dvadsiatich rôznych aminokyselín, zostavený nový proteín. Aminokyseliny sú doručené na zostavovaciu stranu pomocou iných druhov RNA, tzv. prenosov alebo tRNA, ktoré jednu po druhej rozoznávajú trojicu kodónov mRNA. Ak na miesto syntézy dorazí bežný STOP kodón, (tzn., že proteín je teraz pripravený na dokončenie), vstúpia do miesta syntézy špeciálne proteíny - **uvoľňovacie faktory**, zastavia ju a uvoľnia z ribozómu hotový nový proteín.

Asi 10 až 15% chlapcov s DMD má bodovú mutáciu génu dystrofinu, ktorý mení kodón aminokyseliny na jeden z troch STOP kodónov - TGA, TAG a TAA. V mRNA sa potom stanú UGA, UAG a UAA a spôsobia predčasné zastavenie syntézy proteínu, predtým, ako je tento nový proteín, v tomto prípade dystrofin, úplne zostavený.

Ukázalo sa, že antibiotikum **gentamicín** narušuje translačný mechanizmus mRNA v ribozómoch, a tak ignoruje takýto predčasný STOP kodón, t.j. **dokáže prečítať sekvenciu mRNA aj cez STOP kodón**. Liečenie gentamicínom na zvieratách s predčasným STOP kodónom v dystrofíne mRNA ukázalo, že gentamicín vyvoláva úplné prečítanie sekvencie a čiastočne sa obnovila produkcia funkčného proteínu dystrofinu v jeho úplnej dĺžke. Avšak gentamicín môže byť toxický a musí byť prijímaný intravenózne, teda liečba pacientov s DMD pomocou gentamicínu sa ukazuje ako dlhodobá a nepraktická.

Ak môže byť vyvinutá vylepšená technika prečítania bázevej sekvencie ako spôsob liečby DMD, môže z toho profitovať podmnožina pacientov s „nezmyselnou“ mutáciou<sup>23</sup> ako základom ich poruchy. Na základe predklinických skúšok na myšiach vieme povedať, že množstvo vyrobeného dystrofinu ochorenie nevylieči ale môže ho zmeniť na Beckerov typ dystrofie. Keďže prečítanie nenastane na úrovni génu ale počas syntézy proteínu v ribozómoch, liečba musí byť praktizovaná denne. Pred rozhodnutím, či môžu byť chlapci s DMD liečení pomocou „čítacích“ liekov, by malo byť známe, či majú bodovú mutáciu génu dystrofinu a či tento obsahuje jeden z troch rôznych predčasných STOP kodónov.

**PTC 124: Langdon Miller**, hlavný šéf pre liečbu v spoločnosti **PTC Therapeutics** v meste South Plainfield v NJ, podal správu o vývoji a klinických testoch **PTC 124**, novej chemickej zlúčenine, ktorá je pri prečítaní predčasných STOP kodónov oveľa účinnejšia ako gentamicín. Hľadanie liečby na DMD a na cystickú fibrózu, založenej na prečítaní STOP kodónu, sú dve priority spoločnosti PTC.

Automaticky bolo testovaných niekoľko tisíc chemických zlúčenín kvôli ich schopnosti prečítať predčasné STOP kodóny v mRNA dystrofinu alebo proteínu CFTR (proteín chýbajúci pri ochorení cystickou fibrózou). Štruktúry najslubnejších zlúčenín boli potom mnohými chemickými variáciami

---

<sup>23</sup> Z angl. „nonsense mutation“; je to typ bodovej mutácie v bázevej sekvencii DNA, ktorá má za následok výskyt predčasného kodónu v čítacom rámci

zmenené, až pokým sa nedosiahla jedna zlúčenina - PTC 124, ktorá je oveľa účinnejšia ako gentamicín. V projekte na liečbu DMD sa po orálnej aplikácii PTC 124 žijúcim **mdx** myšiam objavil v bunkovej kultúre dystrofin kompletnej dĺžky v takmer bežných množstvách, alebo maximálne v 25% svalových vlákien, so značnou záchranou ich funkcie a štruktúry svalového tkaniva. Bolo zaregistrované aj neprečítanie bežných STOP kodónov. Štúdium toxicity na potkanoch a psoch, ktorým boli podávané vysoké dávky lieku, vo všeobecnosti nepreukázali vážne akútne vedľajšie účinky. Potenciálnym liekom na DMD je prášok, ktorý môže byť vyhotovený vo forme tabletiiek, a ktorý môže byť podávaný ústne.

V prvých klinických testoch PTC 124 boli vykonané dve skúšky (fáza I) na dospelých zdravých dobrovoľníkoch. V týchto štúdiách sa liek javil ako bezpečný a preukázal niekoľko vedľajších účinkov. Minulý rok sa uskutočnila skúška (fáza II) PTC 124 na 15 pacientoch s cystickou fibrózou. Ukázala, že PTC 124 je schopný čiastočne obnovovať aktivitu CFTR u týchto pacientov a nepreukázala žiadne vážne škodlivé účinky.

V súčasnosti tiež pokračuje skúška účinkov PTC 124 na pacientov s DMD (fáza II) v troch klinických centrách v Spojených Štátoch. Na tejto štúdii sa zúčastňuje dvadsaťdva 5 až 12 ročných chlapcov s DMD s predčasnými STOP kodónmi v ich géne dystrofínu. Štúdia bola navrhnutá v dĺžke trvania 8 týždňov. Počas nej dostane 6 chlapcov nižšie dávky PTC 124 trikrát denne počas prvých štyroch týždňov a nasledovať bude štvortýždňový pozorovací úsek bez liečby. Pokiaľ sa u chlapcov nevyskytnú žiadne vedľajšie účinky, dostane ďalšia skupina 16 chlapcov vyššie dávky PTC 124 počas štyroch týždňov, pričom nasledovať bude opäť štvortýždňový pozorovací úsek bez podávania liečiv. Na získanie výsledku skúšky bude vykonaná svalová biopsia, a to pred a po liečbe, kvôli porovnaniu čiastočnej obnovy produkcie kompletného dystrofínu. Na kvantifikovanie miery liečebných účinkov PTC 124 u chlapcov s DMD bude vykonaný aj rad iných chemických a funkčných testov. Výsledky budú dostupné koncom roka 2006. Keď sa naplnia očakávania predklinickej vývojovej fázy a výsledky budú pozitívne, a keď sa získajú nevyhnutné povolenia od regulačných úradov v Európe a v Spojených Štátoch, je možné, že fáza III začne budúci rok alebo v roku 2008.

**Zvyšovanie regulácie utrofínu.** Utrofín je proteín so štruktúrou a funkciou veľmi podobnou dystrofínu. U ľudí je to gén umiestnený v chromozóme 6, má 75 exónov, je dlhý približne 1 milión bázových párov a je asi o 7% kratší ako dystrofin. Je prítomný v mnohých svalových tkanivách, taktiež vo svaloch, ale tu je koncentrovaný v oblastiach, kde sa spájajú motorické nervy so svalovou membránou, tzv. **neuromuskulárne spojenia**. Utrofín existuje v dvoch trocha odlišných formách A a B. Svaly obsahujú iba A formu. Pred narodením je koncentrácia utrofínu vo svaloch oveľa väčšia ako neskôr. **Mdx** myši, ktorých gén utrofín bol experimentálne **vyradený**, a nemali tak ani dystrofin a ani utrofín, mali príznaky podobné DMD a zomierali skôr v porovnaní s „bežnými“ **mdx** myšami, ktorých svalstvo vykazovalo menej závažné poruchy.

Experimenty na myšiach ukázali, že ak je utrofín prítomný vo väčších množstvách, dokáže nahradiť dystrofin. Tieto myši boli tzv. transgenické myši, ktoré vo svojej zárodočnej línii obsahovali utrofínové minigény zavedené technikou, ktorá nemôže byť použitá na ľuďoch. Pri náraste množstva utrofínu súčiniteľom tri až štyri, by sa mohlo zabrániť rozvoju symptómov DMD a mohlo by to viesť ku kompletnej funkčnej obnove svalov.

Nedávno sa zistilo, že chlapci s DMD, ktorí majú vo svojich svaloch troška viac utrofínu, strácajú schopnosť chodiť o niečo neskôr ako tí, ktorí ho majú bežné nízke množstvá. Toto indikuje, že nárast množstva utrofínu by mal fungovať podobne ako pri myšiach a mal by zabrániť, alebo spomaliť, degradáciu svalov.

Pre možnú liečbu DMD by sa malo vyskúšať zvýšiť nízke množstvo utrofínu pomocou **zvyšovania regulácie** aktivity tohto génu. Na to, aby sa to dosiahlo, je potrebná aktivačná látka, ktorá by mala byť dobre známym liečivom, alebo nejakou inou chemickou, alebo v prírode sa vyskytujúcou látkou, ktorá by reagovala s pôvodcom génu. Drobné molekuly takéhoto zloženia by pravdepodobne ľahučko prenikli svalovými bunkami a - ak sú to známe lieky, nevyžadovali by dlhodobé skúšobné procesy.

**Kay Daviesová** z Univerzity v Oxforde, ktorá sa so svojim tímom pred mnohými rokmi stala priekopníčkou výskumu nahradenia dystrofínu utrofínom, predniesla správu, že v spolupráci so spoločnosťou **VASTox plc.** v Oxforde, boli triedené tisícky chemických zlúčenín pre ich schopnosť zvyšovať reguláciu aktivity génu utrofínu u **mdx** myši. Pre vyskúšanie tejto aktivity bol v sústave

činiel použitý svetlo produkujúci enzým luciferáza (zo svätajánskych mušiek). Našlo sa zopár sľubných kandidátov, ktorí sú teraz optimalizovaní a testovaní na kultúrach svalových buniek a na živých **mdx** myšiach, aby sa ukázalo, či dokážu dostatočne zvýšiť množstvo utrofínu vo všetkých svaloch myši.

Jedna z obzvlášť sľubných aktívnych zlúčenín bola už systematicky testovaná na myšiach podávaním injekcií do brucha. Táto látka reaguje iba s pôvodcom utrofínu formy A, ktorý je prítomný vo svale. Regulácia A-utrofínu vo všetkých kostrových svaloch testovaných myši by mohla byť dvoj až trojnásobne vyššia, ale ešte nie je známe, či je takýmto spôsobom zvyšovaná regulácia utrofínu aj v srdcových svaloch. Po dvanástich týždňoch systematického týždňového podávania injekcií sa u zvierat ukázalo významné obnovenie funkcie ich svalov.

Táto aktívna zlúčenina je teraz dodatočnými chemickými modifikáciami ďalej optimalizovaná. Klinické skúšky na pacientoch s DMD sa v súčasnosti pripravujú a mohli by sa začať v roku 2008.

**Spomaľovanie proteázy.** Degradácia svalových proteínov pri DMD je spôsobená niekoľkými rozličnými proteázami (enzýmami ničiacimi proteíny), ako je napríklad enzým calpain (ktorý je aktívovaný vápnikom) alebo dlhý proteázový komplex (nazývaný **proteasome**). Keď kvôli chýbajúcemu dystrofínu začínajú membrány svalových buniek prepúšťať (**became leaky**) (tak, ako je tomu pri DMD), ióny vápnika (nabité atómy) z oblastí mimo buniek aktivujú enzým calpain a nepriamo tiež **proteasome**. Táto narastajúca aktivita enzýmov vedie k rozsiahlej deštrukcii dôležitých bunkových proteínov potrebných pre činnosť a prežitie svalových buniek. Špeciálne vyvinuté inhibítory umožňujú výskumnikom blokovat' aktivitu enzýmu calpain a iných proteáz, ktoré môžu oddialiť degradáciu svalových buniek. Modifikovaný tripeptid **leupeptin** bol prvým inhibítorom, ktorý by mohol redukovať aktivitu enzýmu calpain v **mdx** myšiach. Táto prvá generácia spomaľovačov pozostáva z troch aminokyselín, dvoch leucínov a jedného arginínu, ktorý obsahuje chemicky reaktívnu skupinu aldehydov nevyhnutnú pre spomaľovacie aktivity. Leupeptín však môže spomaliť aj iné proteázy, vrátane tých, ktoré spôsobujú zrážanlivosť krvnej plazmy, čo spôsobuje nežiadúce vedľajšie účinky. Na druhej strane by mohlo byť žiadúce spomaliť nielen enzým calpain ale taktiež aj **proteasome**.

**C101. Theresa Micheleová**, viceprezidentka klinického výskumu spoločnosti **CepTor Corporation** v Baltimore, popísala, že sa pri kombinácii leupeptínu s karnitínom získal spomaľovač nazývaný C101, ktorý ako jediný preniká do kostrových a srdcových svalových buniek. Dôvodom tejto špecifickosti je existencia proteínu (prenášača karnitínu OCTN2), ktorý viaže C101 vo svojom konci a nesie ho do zmyslového proteínu v membráne svalovej bunky, a ktorý potom transportuje inhibítor C101 naprieč membránou do buniek.

Za účelom presného merania účinku potenciálnych liekov ako je C101, bola vyvinutá nová kvantitatívna metóda, ktorá umožňovala analýzy calpainom vynúteného rozpadu proteínov svalovej bunky na žijúcich zvieratách, a taktiež snád' aj na ľuďoch. V tomto teste je meraná schopnosť enzýmu calpain rozštiepiť proteín svalovej bunky, tzv. alfa-II-spektrín. Enzým calpain používa dva unikátne kroky na rozklad proteínu spektrínu na dva menšie proteíny, SBDP150 a SBDP145, ktoré prenikajú do krvi a následne môžu byť analyzované v sére so špeciálne vyvinutými protilátkami. Tento nový test je navrhnutý na sledovanie pokroku degradácie svaly a tak sa možno stane dôležitý pre klinické skúšky s pacientmi s DMD.

Týmto novým testom bolo ukázané, že C101 dokáže spomaliť enzým calpain 50- až 100-krát efektívnejšie, ako leupeptín. Taktiež chráni konštrukciu svalov a výrazne zvyšuje priemer svalových vlákien **mdx** myši. C101, ktorý môže byť podávaný aj ústne, je tak potenciálnym efektívnym liekom pre liečbu pacientov s DMD.

**BBIC. Lee Sweeney** vo svojom prehľade rôznych liečebných prístupov spomenul **koncentrát Bowman-Birkovho inhibítora (BBIC)**, blokujúceho iné proteázy ako je calpain, ktoré taktiež participujú na deštrukcii svalových proteínov. Aktívnou zložkou v tomto základnom koncentráte je prírodný proteín zložený zo 71 aminokyselín, ktoré môžu byť izolované v čistej forme zo sójových zrn.

Dlhodobé liečenie pomocou BBIC zväčšuje svalovú hmotu a silu svalov v **mdx** myšiach. Činnosť CK<sup>24</sup>, a taktiež aj fibróza, sú výrazne redukované. Na základe iných jeho užití pacientmi s rakovinou je známe, že BBIC je veľmi bezpečným liekom, ktorý môže byť užívaný ústne.

**SNT 198'438. Thomas Meier**, hlavný vedecký vedúci v **Santhera Pharmaceuticals** v Liestale neďaleko Bazileja vo Švajčiarsku, opísal ich predklinické štúdie pre rozvoj dvojnásobne špecifických inhibítorov, ktoré dokážu blokovať aktivitu enzýmu calpain a zároveň aj aktivitu proteázových enzýmových komplexov. Vedci zo spoločnosti Santhera syntetizovali cez 800 chemických variantov (počnúc známym inhibítorom, enzýmom calpain) a testovali tieto spomaľovače v biochemických experimentoch a v experimentoch na bunkových kultúrach, ako aj na **mdx** myšiach. Pritom bolo identifikovaných zopár zlúčenín s požadovanými vlastnosťami.

Jedna z nich, SNT 198'438, bola ďalej optimalizovaná. Môže byť podávaná podkožne, t.j. injekciami pod kožu. Koná systematicky a dosahuje (peniká) do všetkých svalov. V **mdx** myšiach, ktorými bol dobre znášaný, normalizoval tento inhibítor histologické parametre svalov a zlepšoval pohybový výkon dospelých zvierat. Tento funkčný test je vykonávaný v rozsiahlej „myšej telocvični“, kde môže až 40 myší naraz dobrovoľne zopár týždňov behať na počítačom monitorovaných bežeckých kolesách.

**SNT-MC17 (idebenone) na ochranu mitochondrií.** Spoločnosť **Santhera Pharmaceuticals** momentálne vyvíja potenciálny liek chrániaci mitochondrie, tzv. bunkové elektrárne, kde je pomocou oxidačnej fosforilácie vyrábaný univerzálny nosič energie, nazývaný adenosíntrifosfát (ATP). V druhej časti svojej prezentácie **Thomas Meier** vysvetlil, že táto zložka s názvom *idebenone*, alebo SNT-MC17, je v Spojených Štátoch momentálne v tretej fáze (fáza III) klinických skúšok pre ochorenie Friedrich-Ataxia (neuromuskulárne ochorenie najčastejšie spojené s kardiomyopatiou a s vážnymi poruchami srdcového svalu).

SNT-MC17 (idebenone) je silný antioxidant s chemickou štruktúrou odvodenou od prírodného koenzýmu Q10. Optimalizované chemické zloženie má oveľa kratší a rozdielny bočný reťazec, ktorý umožňuje molekule preniknúť do svalových buniek jednoduchšie ako koenzýmu Q10. SNT-MC17 (idebenone) sa tiež ukázal ako pomocník pri tvorbe ATP v mitochondriách. Môže byť podávaný ústne vo forme tabliet.

Absencia dystrofínu tiež negatívne vplýva na oxidačnú fosforiláciu v mitochondriách srdcového svalstva u pacientov s DMD a tiež pravdepodobne v ich kostrových svaloch. V Belgicku práve prebieha pod vedením **Dr. Gunnara Buysea** druhá fáza (fáza IIa) klinickej skúšky na kontrolu placebo efektu s SNT-MC17 (idebenone). Štúdia kompletne zaregistrovala 21 chlapcov s DMD vo veku 8 až 16 rokov. Hlavným cieľom tejto štúdie je stanoviť účinok SNT-MC17 (idebenone) na funkciu srdcového svalu. Dodatočne bude realizovaných niekoľko rozličných testov na určenie možných funkčných benefitov na silu svalov chlapcov s DMD liečených pomocou SNT-MC17 (idebenone). Chlapci prijímajú liečbu počas 12 mesiacov trikrát denne vo forme tabliet obsahujúcich buď 150mg SNT-MC17 (idebenone) alebo jeho placebo.

Táto skúška je nazývaná „Štúdia účinnosti liečby DMD vysokými dávkami SNT-MC17 (idebenone) v dlhodobom časovom horizonte“, skrátene DELPHI. Jej výsledky budú dostupné asi o rok.

Interview s Dr. Meierom môžete si môžete prečítať na Internete na [www.duchenne-research.com](http://www.duchenne-research.com).

**Poloxamer 188, „molekulárny pomocný pás“ na zacelenie dier v membránach.** Pokus zachrániť srdcové svalové bunky pri kardiomyopatii, otvoril cestu na zacelenie dier v dystrofických svalových membránach. Tento nový prístup v liečbe DMD prezentoval **Joseph Metzger** z Michiganskej univerzity v Ann Arbor. Absencia dystrofínu u **mdx** myší, ako aj u chlapcov s DMD, neovplyvňuje len kostrové svaly, ale má tiež vážne následky na správnu funkciu srdcových svalov.

Aplikácia špeciálne vyvinutého polyméru *poloxamer 188*, alebo *P 188*, ukázala jeho pozitívny vplyv na činnosť srdca **mdx** myší. Pre presné meranie tohto ochranného účinku v izolovaných svalových bunkách srdca s **mdx**, boli jednotlivé bunky spojené svojimi koncami do dvoch veľmi tenkých pohyblivých uhlíkových vlákien. Keďže tieto srdcové svaly sú asi tisíckrát kratšie ako bunky kostrových svalov myší, vzdialenosť medzi dvoma mikro uhlíkovými vláknami sa mohla pohybovať iba v rozmedzí 1,8 až 2,2µm, teda tisícinu milimetra. Týmto spôsobom mohlo byť ukázané, že zatiaľ

---

<sup>24</sup> CK - kreatín kináza - enzým vyjadrený v rôznych typoch tkanív. Katalyzuje prechod kreatínu na fosfokreatín, pričom spotrebúva adenosíntrifosfát (ATP) a vytvára adenosín difosfát (ADP)

čo normálne bunky mohli byť napínané a regenerované počas niekoľkých hodín, vlákna s **mdx** mali redukovanú bunkovú pružnosť - sú oveľa viac odolné voči natáhovaniu, dostávajú sa do hyperkontrakcie, odtrhnú sa od uhlíkového vlákna a napokon zomierajú. Pomocou tejto *novej mikroskopickej skúšobnej metódy* mohlo byť ukázané, že P 188 dokáže regenerovať pružnosť buniek srdcového svalu z **mdx** myši (aj psov s GRMD dystrofiou). Aplikácia P 188 živým **mdx** myšiam blokovala ich akútne srdcové zlyhanie, ktoré mohlo byť namerané mini katetrami v srdciach živých myši, tlčúcich frekvenciou asi 600x za minútu.

P 188 je umelý pomocný polymér pozostávajúci z jadra zloženého z 35 malých hydrofóbných (vodu odpudivých) jednotiek a z dvoch krídel so 75 hydrofilnými (vodu priťahujúcimi) jednotkami. Dr. Metzger to nazval molekulárny albatros, ktorého centrálna, vodou nerozpustná štruktúra, zapcháva diery v membráne, ktorej vnútro je tiež hydrofóbné, zatiaľ čo dve hydrofilné krídla pôsobia ako lepkavé konce pomocného pásu spojením s hydrofilným povrchom neporušenej membrány v okolí dier. Tento molekulárny pomocný pás teda aspoň dočasne zapečatí diery, takže nemôžu prejsť žiadne ióny vápnika, ktoré by aktivovali enzým calpain a iné enzýmy degradujúce proteíny.

Je jasné, že tento ochranný účinok P 188 na srdcové svaly by mohol byť dôležitý aj pre obnovu dystrofických kostrových svalových buniek. Toto bolo taktiež skúšané, ale prvé výsledky neboli také dobré, ako sa očakávalo. Výskum tohto liečebného prístupu momentálne prebieha a mohol by viesť k iným možnostiam liečby DMD.

**Spomaľovanie myostatínu.** Myostatín je produkovaný vo svalových bunkách ako neaktívny proteín pozostávajúci z 375 aminokyselín. Po niekoľkých krokoch molekulárneho preusporiadania sa stane biologicky aktívnym a potom iniciuje sériu chemických reakcií vo vnútri bunky, ktoré vedú k zníženiu regulácie enzýmov potrebných pre biosyntézu nových svalových proteínov. Preto by deaktiváciou myostatínu mohla byť možno stimulovaná regenerácia svalových vlákien chlapcov s DMD tak, že by tieto vlákna neboli tak rýchlo zničené alebo by dokonca mohli narásť do dĺžky.

Myši bez dystrofie, ktorých gén pre myostatín bol pomocou genetických metód vyradený, majú až trikrát dlhšie kostrové svaly s výrazne viac vláknami väčšieho priemeru, ako je bežné. Existuje dobytok (Belgické modré plemeno), ktorý je mimoriadne svalnatý, pretože jeho gén myostatín bol pred storočiami v dôsledku mutácie deaktivovaný. A v Berlíne sa našiel dnes sedemročný chlapec, ktorého kostrové svaly sú asi dvakrát väčšie ako u ostatných detí. Fyzicky je veľmi silný. Jeho matka bola Olympijská bežkyňa a niekoľkí ďalší príbuzní boli tiež veľmi silní. Pretože mutácia v tejto rodine zmenila bežné spájanie troch exónov myostatínu, chlapec (a možno aj jeho dotknutí príbuzní), má vo svojich svaloch veľmi nízku hladinu myostatínu. Toto je výrazná indikácia toho, že znížovanie regulácie myostatínu by viedlo k nárastu svalovej hmoty aj u chlapcov s DMD.

**Myo 029.** *Kathryn Wagnerová* z Wellstoneského centra muskulárnej dystrofie pri Univerzite Johna Hopkinsa v Baltimore oznámila, že jej výskumný tím vchoval myši, ktoré okrem toho, že nemali dystrofin, nemohli vytvárať ani myostatín. Dospelé myši z týchto bezmyostatínových zvierat mali oveľa „normálnejšie“ svaly, mali menej fibróz (zjazvených tkanív) a dokázali regenerovať svoje svalstvo rýchlejšie ako „bežné“ **mdx** myši. Spolu s **Dr. Leom Sweeneyom** sa podobné pokusy uskutočnili aj na psoch s dystrofiou.

Teraz bolo otázkou, či by absencia myostatínu mala podobné účinky aj na srdce. To by paralyzovalo kardiomyopatiu, ale hypertrofické (zväčšené) srdce by mohlo byť pri chlapcoch s DMD problematické. Avšak nedávne výskumy na **mdx** myšiach ukázali, že blokáda myostatínu nemala na srdce žiaden vplyv. To znamená, že aktivita myostatínu sa ukazuje byť obmedzená len na samotné kostrové svaly.

V spolupráci so spoločnosťou **Wyeth Pharmaceuticals** bola odštartovaná ďalšia fáza klinických skúšok (fáza I/II) s tromi rôznymi dávkami potenciálneho liečiva Myo 029, podávanými 36 pacientom s DMD, vrátane niektorých pacientov s BMD. Myo 029 je špeciálna protilátka, ktorá sa viaže na myostatín a blokuje jeho aktivitu. Imunitný systém ju neodmieta, pretože jej proteín má ľudskú štruktúru, je „poľudštená“. Môže byť vstreknutá do krvného obehu alebo pod kožu.

Ak by skúšky poskytli povzbudivé výsledky, spoločnosť **Wyeth Pharmaceuticals** zintenzívni svoju snahu o zavedenie Myo 029 do klinickej praxe. Medzitým by však rodičia nemali kupovať žiadne tzv. myostatínové spomaľovače, ponúkané na Internete. Tieto zlúčeniny neprešli klinickými testmi, a preto sú pravdepodobne neúčinné, alebo dokonca nebezpečné.

**Zvyšovanie regulácie rastového faktora IGF-I, podobajúceho sa na inzulín.** IGF-I je proteín s asi 70 aminokyselinami v jednom reťazci s tromi stabilizačnými väzbami, teda má podobnú formu ako inzulín. U ľudí môže byť produkovaných šesť rôznych foriem s nepatrne rozdielnou štruktúrou, ale vo výsledku je to ten istý proteín IGF-I. IGF-I je veľmi výhodný pre svaly, pretože pomáha podporovať ich prírastok a silu, avšak jeho účinky nie sú limitované iba na svaly. Satelitné bunky, ktoré sa aktivujú pri zranení alebo degradácii, produkujú vo svojich membránach špeciálny zmyslový proteín, ku ktorému sa IGF-I naviaže. Dôsledkom je premnoženie satelitných buniek a ich ďalší rozvoj na **myotubes** a svalové vlákna. Keďže by mohla byť táto stimulácia regenerácie svalových vlákien dôležitá pre zachovanie dystrofických svalových tkanív, je IGF-I zaujímavý pre možné použitie v liečbe detí s DMD. Avšak taktiež aj iné tkanivá môžu reagovať na IGF-I a ak sú ho v krvi vysoké hladiny, narastá riziko vzniku rakoviny. Preto, aby sa ujal IGF-I ako prostriedok liečby svalových ochorení, musí byť vyvinutá stratégia pre potlačenie potenciálnych nežiadúcich vedľajších účinkov na iné tkanivá.

Výskumný tím **Elisabeth Bartonovej** z Pensylvánskej Univerzity z Filadelfie pracuje s myšami, ktoré získali krížením **mdx** myši s transgenickými myšami, t.j. geneticky „skonštruovanými“ (produkujú vysoké hladiny IGF-I vo svojich svaloch počas celého života). Tieto **mdx-IGF-plus myši** vykázali nárast pomerne zdravo vyzerajúcich svalov a oveľa menej fibróz, ako bežné **mdx** myši. Táto práca demonštruje, aké výhody môže mať IGF-I pre deti s DMD.

Keďže ale tento rastový faktor narušuje mnohé signálne cestičky v bunkách, nemôžu byť potenciálne vylúčené ani vážne vedľajšie účinky pri podávaní vyšších dávok, potrebných na optimalizáciu účinku IGF-I na svaly. Z tohto dôvodu bola vyvinutá metóda na „zamaskovanie“ IGF-I pomocou jeho spojenia do akéhosi komplexu s proteínom-3 viažucim na seba IGF. Proteín-3 je prirodzene cirkulujúcim proteínom v krvnom obehu. Toto spojenie uvoľní IGF-I iba tam a vtedy, kde je to potrebné, a kde to napomáha stabilizovať proteín IGF-I v obehu, takže je potrebných menej injekcií. Komerčná verzia tohto komplexu, nazývaná IPLEX<sup>TM</sup>, je práve FDA<sup>25</sup> schválená na liečbu rastových porúch u detí spôsobených nedostatkom IGF-I. Prvá klinická skúška IPLEXu teraz prebieha na Univerzite v Rochestere s podporou NIH<sup>26</sup> a MDA<sup>27</sup> na 15 dospelých pacientoch s myotonickou dystrofiou. Skúška na optimalizáciu dávky bude nasledovať v roku 2007. Táto stratégia by mala byť efektívna pri prenikaní IGF-I do svalu bez spôsobenia vedľajších účinkov v iných tkanivách.

Inou cestou na vytvorenie vyššej hladiny IGF-I vo svalovom tkanive by bol transport jeho génu do svalov pomocou nosiča, akým je napr. združený adenovírus (AAV), ktorý by potom „inštruoval“ svaly na tvorbu väčšieho množstva IGF-I. Prvé experimenty v tomto smere boli robené v laboratóriu **Dr. Bartonovej**. Tieto pokusy ukázali, že iba jedna z dvoch podobných foriem IGF-I, konkrétne IGF-IA, je na myšiach s **mdx** účinná pri podpore hypertrofie, t.j. pri zväčšení svalových vlákien. Práve prebiehajúce práce s touto technikou boli úspešné v náraste hladiny IGF-I 30 až 40 násobne, po podaní vnútro svalovej injekcie nosičov AAV nesúcich ten správny gén IGF-I. Novo syntetizovaný IGF-I zostal vo svalovom tkanive, neunikol mimo krvný obeh, teda môže tak byť zabránené vedľajším účinkom spôsobeným aktivovaním nesvalových tkanív. Liečba vírusovými génmi potrvá niekoľko rokov, pokiaľ bude môcť byť skúšaná na chlapcoch s DMD. Avšak tento výskum pomôže identifikovať, ktorá forma IGF-I pracuje pri muskulárnej dystrofii najlepšie.

**Projektový katalyzátor (project catalyst): automatické vyhľadávanie nových liekov.** **Ellen Welchová**, vedúca výskumnej skupiny v **PTC Therapeutics** v South Plainfield NJ predstavila **Projektový katalyzátor**, ktorý bol odštartovaný pred dvoma rokmi, a ktorý je podporovaný našim Parent Projectom. Toto je príklad toho, ako dokážu malé zaniietené spoločnosti použitím najmodernejších automatizovaných technológií nájsť medzi asi 200 000 zlúčeninami s nízkou molekulovou hmotnosťou iba zopár takých, ktoré by mohli byť schopné kandidovať na lieky, ktoré by robili všetko to, čo bolo prejednané v predchádzajúcich troch odstavcoch: zvyšovanie regulácie utrofínu, znižovanie regulácie myostatínu, zvyšovanie regulácie špeciálnej izoformy IGF-I a okrem toho aj zvyšovanie regulácie alfa-7-integrínu.

<sup>25</sup> Food and Drug Administration - americká agentúra zodpovedná za reguláciu liekov, potravín, biologického materiálu a pod.

<sup>26</sup> National Institutes of Health - agentúra vlády USA zodpovedná hlavne za biomedicínsky výskum

<sup>27</sup> Muscular Dystrophy Association - organizácia muskulárnych dystrofikov v USA



Skúsenosti počas vývoja PTC124, určeného na čítanie/zosnímanie STOP kodónu, pomohli pri optimalizovaní automatických filtrovacích metód na prispôsobovanie aktivity všetkých štyroch liečivových cieľových molekúl. Postup skúšky na meranie týchto aktivít je založený na zapisovateľovi proteínového systému (**is based on a reporter protein system**): rôzne regulačné sekvencie, zistené na koncoch cieľových mRNA (známych ako neprenosné oblasti - UTRs) pre každý zo štyroch cieľov, boli kombinované s génom pre enzým luciferáza, ktorý normálne tvorí svetlo vo svätajánskych muškách. Táto konštrukcia bola zavedená do obličkových buniek takým spôsobom, že by sa v prítomnosti aktívnej zlúčeniny svetelná intenzita zapisovača luciferázy (**luciferase reporter**) buď zvyšovala, alebo znižovala. Veľká väčšina neaktívnych zložiek by významne nezmenila svetelnú intenzitu. Presné a automatické meranie svetelných intenzít vo veľmi malom objeme skúšobného prípravku je oveľa jednoduchšie, ako analyzovanie biologických účinkov cieľov utrofínu, myostatínu, IGF-I a alfa-7-integrínu.

Pre každý z týchto štyroch cieľov boli realizované vysoko priepustné filtrácie. Spomedzi 200 000 testovaných zlúčenín by mohlo byť identifikovaných zopár takých, ktoré buď zvyšujú reguláciu utrofínu, IGF-I alebo alfa-7-integrínu, alebo znižujú reguláciu myostatínu. Všetky tieto „zásahy“ (zlúčeniny s minimálne niektorými požadovanými vlastnosťami) sú teraz optimalizované pomocou prispôsobovania ich štruktúry. To zamestná mnoho chemikov na niekoľko rokov. Napríklad na optimalizáciu lieku PTC 124 (na čítanie/snímanie STOP kodónu) bolo počas dvoch rokov laboratórnej práce vykonaných asi 4 000 chemických úprav pôvodne identifikovanej aktívnej štruktúry.

Ďalšie kroky v predklinickom vývoji nových potenciálnych liekov na DMD zaberú taktiež zopár rokov. Okrem zmien ich štruktúry budú prebiehať detailné vyšetrenia biologických vlastností väčšiny aktívnych molekúl, vrátane vykonania skúšok na bunkových kultúrach a na živých myšiach, zameraných na možnú toxicitu, metabolizmus a farmakokinetické správanie, t.j. biochemické zmeny vo vnútri živého organizmu, ktoré by mohli produkovať nežiadúce vedľajšie účinky. Avšak dúfajme, že nebudú.

Potom bude nasledovať klinické testovanie najslubnejších látok na pacientoch s DMD, ktoré bude vyžadovať o málo viac rokov.

**Spomaľovanie TGF-beta.** *Andrew Hoey* z Univerzity Južného Queenslandu v Austrálii vysvetlil v prvej časti tejto prezentácie úlohu fibrózy, a taktiež objasnil, čo by bolo možné urobiť na jej prevenciu, prípadne na jej obmedzenie.

Fibróza, alebo zjazvené tkanivo, je spôsobená neúmernou produkciou spojovacieho tkaniva a jeho uložením medzi kostrové a srdcové svalové vlákna, a to nahradením degradovaných a stratených vlákien. Za normálnych podmienok drží spojovacie tkanivo svalové vlákna pokope, ale jeho zvýšená hladina vedie k tuhnutiu svalov a k ich kontrakciám. Spojovacie tkanivo pozostáva hlavne z proteínu kolagénu, čo je v podstate neelastická molekula generovaná bunkami nazývanými fibroblasty. Tieto sa objavujú počas degeneračného a regeneračného procesu pri DMD pod vplyvom rastových faktorov, medzi nimi **transformačného rastového faktora beta** (TGF-beta).

TGF-beta podporuje syntézu a zlučovanie rôznych kolagénových molekúl tvoriacich vysoko nepružné spojovacie tkanivo. Preto spomaľovanie aktivity TGF-beta môže teoreticky byť mechanizmom na obmedzenie fibrózy. Jeden liek, ktorý by mohol pôsobiť podobne, je **pirfenidon**, ktorý je schváleným liečivom pre liečbu fibrózy v pľúcach. Osemmesačným **mdx** myšiam bol podávaný tento liek a po siedmich mesiacoch liečby sa ukázala znížená hladina TGF-beta a obnovila sa funkcia srdca v podstate do normálu, avšak fibróza nebola redukovaná. Účinnosť tohto lieku, čo sa týka jeho väčšej efektivity na mladších myšiach, bude skúšaná v budúcich experimentoch.

**L-arginín a nNOS.** V druhej časti tejto prezentácie hovoril *Andrew Hoey* o inom dôsledku chýbajúceho dystrofínu, a síce o redukovanom množstve určitých komponentov dystrofin-glykoproteínového komplexu, tzv. enzýmu **neurónovej dusično kyslíkovej syntézy**, skrátene nNOS. Tento enzým tvorí z aminokyseliny L-arginínu kysličník dusičnatý (**nitric oxide**) (NO). Hoci je NO plyn, účinkuje ako hormón a, okrem iného, reguluje rozširovanie krvných ciev, ktoré sú dôležité pre normálnu dodávku krvi a tak aj energie do svalov. Ak chýba nNOS, rozvíja sa kardiatická fibróza a to môže byť dôvodom zvýšenej fibrózy v srdciach **mdx** myší a taktiež aj pacientov s DMD.

Denné podávanie L-arginínu počas šiestich mesiacov so začiatkom dávkovania v šiestich mesiacoch veku **mdx** myší, znížilo fibrózu v ich srdciach, zvýšilo koronárny krvný prietok a zlepšilo činnosť ich

srdca. Pri nadchádzajúcich experimentoch sa ešte predtým, ako sa budú vykonávať ďalšie práce ukazujúce, či môže byť L-arginín liekom na DMD, pripravuje vyšetovanie mechanizmu tohto účinku L-arginínu na srdce.

**Blokovanie zápalových nosičov.** Degradácia a smrť svalových buniek spôsobuje zápalové procesy, ktoré odstraňujú zvyšky mŕtvych buniek. Steroidy sú schopné potlačiť zápal a to je pravdepodobne jeden z dôvodov, prečo dokáže liek s názvom **prednizón** (jeho aktívna forma je **prednizolón**) a príbuzný **deflazakort** zvýšiť svalovú hmotu a pevnosť a redukovať imunitné reakcie, avšak často s niektorými nepraktickými vedľajšími účinkami. Tieto lieky bývajú široko využívané pri liečbe chlapcov s DMD na udržovanie ich svalovej činnosti minimálne na zopár rokov. Avšak presný spôsob ich fungovania nie je stále dobre známy.

**Sylvia Lopez**, doktorandka v laboratóriu **Dr. Melissy Spencerovej** z Univerzity v Los Angeles, hovorila o nových experimentoch pôsobiacich proti zápalom a imunitným reakciám, a teda o hľadaní nových ciest, ako by sa dali eventuálne nahradiť steroidy inými liekmi, ktoré zasahujú špecifické poškodenia spôsobené imunitným systémom.

Štúdie ukázali, že narastajúca hladina buniek imunitného systému CD4 a CD8 T urýchľuje postup ochorenia, a že ich spomaľovanie redukuje skôr miernejšie dystrofické symptómy **mdx** myši a veľmi významne redukuje oveľa vážnejšie symptómy skutočne chorých **utr**<sup>28</sup> a **mdx** myši, ktoré okrem chýbajúceho dystrofinu nemajú ani utrofin. To tiež predlžuje priemernú dĺžku života týchto **mdx** myši bez utrofinu.

Navyše, vo svaloch postihnutých **mdx** alebo DMD narastá množstvo cytokínov<sup>29</sup>, teda molekúl, ktoré podporujú zápal a rozvoj fibrózy. Preto spomalenie alebo odstránenie buniek CD4 a CD8 T, a taktiež prispôbenie aktívnych cytokínov, by možno mohlo spomaliť degradáciu dystrofických svalov. Už existuje množstvo schválených alebo potenciálnych protizápalových liekov. Ak by sa ukázali ako pozitívne vplyvajúce na DMD, významne by sa skrátil čas dodatočného schvaľovania liečby tohto ochorenia.

V súčasnosti sú v laboratóriu Dr. Spencera testované tri z liekov, aby sa ukázalo, či by boli výhodné pre pacientov s DMD. Skúšané sú v klinických testoch pre liečbu iných ochorení: **CTLA-4Ig** proti reumatickej artritíde, **Galectin-1** bol vylobovaný a pretlačený do klinických skúšok proti artritíde a ukázal sa ako zlepšovateľ svalovej regenerácie, alebo protilátka **Anti-asialo GM1**, ktorá bola použitá pri Parkinsonovej chorobe.

Nasledovať bude testovanie štyroch iných liekov: **Raptiva®** (na psoriázu), **Tisabri®** (na sklerózu multiplex a Crohnovu chorobu), **Remicade®** a **Enbrel®** (oba na reumatickú artritídu a iné ochorenia).

Pre rozhodnutie, či by sa tieto lieky mohli stať liečivom pre DMD, a teda či by boli schopné zlepšiť kvalitu života pacientov s DMD, budú nevyhnutné dlhodobé štúdie.

**Biglykán**<sup>30</sup>. Na záver konferencie opísal **Justin Fallon** z Brownovej univerzity v Providence RI ako prelomovú správu neočakávaný objav, ktorý by mohol viesť k liečbe DMD. Jeho laboratórium pracovalo posledných osem rokov na extracelulárnom proteíne s názvom biglykán, BGN. Tento doteraz takmer neznámy proteín spája dva konce proteínov alfa a gama sarkoglykán<sup>31</sup> komplexu na vonkajšej strane membrán kostrových svalov. Na experimentoch s myšami, ktorých gén BGN bol potlačený, sa zistilo, že bolo redukované množstvo mnohých proteínov dystrofinového komplexu. Liečba týchto myši pomocou lokálnych a komplexných injekčných dávok BGN viedla k opätovnému výskytu betasyntrofinu, ktorý bol indikáciou toho, že sa obnovil dystrofinový komplex. Biglykán sa zdá byť značne dôležitý u mladých myši v čase, keď svaly nepotrebujú dystrofin, ale skôr sa spoliehajú na utrofin.

Práca z veľmi nedávnej minulosti, prezentovaná na stretnutí, ukázala, že biglykán môže byť tiež podávaný **mdx** myšiam, u ktorých mal veľmi pozitívne účinky na zvrátenie dystrofickej patológie svalu. Odkedy je BGN v malých koncentráciách v myšiach bežne prítomný, nevyskytli sa žiadne

<sup>28</sup> utr mouse - utr myš; myš so špecifickou oblasťou v mRNA

<sup>29</sup> skupina proteínov a peptidov, slúžiaca v organizmoch ako signalizačná zlúčenina; chemické signály sa podobajú na hormóny a neurotransmitery a umožňujú jednej bunke komunikovať s inou

<sup>30</sup> malý, na leucín bohatý opakujúci sa glykoproteín

<sup>31</sup> rodina piatich transmembránových proteínov ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\chi$ ,  $\delta$  alebo  $\epsilon$ ) obsiahnutá v proteínovom komplexe

imunologické reakcie a u ľudí sa tiež žiadne nepredpokladajú. Alfa a gama sarkoglykány sú prítomné iba v kostrových a srdcových svaloch. A pretože sa BGN viaže na tieto dva proteíny, mohol by byť aktívny predovšetkým u týchto dvoch typov svalov a mohol by tak mať minimálne vedľajšie účinky.

Budú pokračovať experimenty na zvieratách, s cieľom optimalizovať podmienky liečby. Za dva roky by potom mohla byť započatá prvá fáza klinických skúšok (fáza I) s týmto novým neočakávaným potenciálnym liekom na DMD: **biglykánom**.

### Prečo nie sú mdx myši skutočne choré?

**GAMT.** Otázka bola položená *Brianom Tsengom* a jeho výskumným tímom z Coloradskej univerzity v Denveri. **Mdx** myš nemá proteín dystrofin, a to kvôli predčasnému STOP kodónu v exóne 23 jej génu dystrofinu, neprejavuje však klinické príznaky ochromenia tak, ako je tomu pri chlapcoch s DMD. Je pozoruhodne zdravá! Napríklad každú noc nabehá päť až šesť kilometrov v špeciálnom „dobrovoľnom bežeckom zariadení“ pre myši. Žije skoro dva roky, podobne ako bežná myš. Pri jej pozorovaní bok po boku s normálnou myšou sa nedajú navzájom rozlíšiť. **Mdx** myš vykazuje niektoré laboratórne vlastnosti DMD, t.j. vysoké hladiny séra CK, centrálné umiestnené bunkové jadro, postupne narastajúca fibróza a trocha vážnejšie postihnutá diafragmu<sup>32</sup>, hoci nie je pozorovaná respiračná porucha.

Mohli by nás **mdx** myši naučiť, ako vyvinúť liečebné stratégie pre miernejšie formy muskulárnych dystrofií s deficitom dystrofinu? Dr. Tseng verí, že existujú **modifikujúce gény (modifier gene)**, ktoré sú viac regulované v **mdx** myšiach, ale menej regulované u chlapcov s DMD. Zvyšovanie regulácie utrofinu (satelitných buniek, vracajúcich sa/spätých vlákien (**revertant fibres**)) a znižovanie regulácie myostatínu, sú spôsobené modifikujúcimi génmi, ktoré sa prejavujú paralelne aj v **mdx** myšiach aj u chlapcov s DMD. Dr. Tseng sa zaujíma predovšetkým o štúdium génov prejavujúcich sa opačnými smermi v myšiach a u chlapcov. Pretože je možné, že existujú aj iné modifikujúce gény spôsobujúce rôzne chorobné príznaky, Dr. Tseng a jeho kolegovia sa pozreli pomocou vysoko automatickej filtrovacej/skenovacej metódy na mRNA hladiny 30 000 génov kostrového svalu dospelej **mdx** myši a porovnali ho s bežnou zdravou myšou.

U myši našli 45 génov so zvýšenou reguláciou, ktoré boli u chlapcov s DMD regulované menej. Dva z nich vyzerali veľmi sľubne. Gény pre enzýmy **arginín-glycín amidotransferázu (AGAT<sup>33</sup>)** a **guanidín-octanovú metyltransferázu (GAMT<sup>34</sup>)**, ktoré sú nevyhnutné pre biosyntézu kreatínu, čo je nízkomolekulárna zlúčenina hrajúca dôležitú úlohu pri dodávke chemickej energie pre svalovú kontrakciu a zdravie bunky. V **mdx** myšiach sú oba enzýmy viac regulované, takže tieto myši dokážu vyrobiť vo svojich svaloch kreatín. Dr. Tseng verí, že absencia dystrofinu u chlapcov s DMD a u **mdx** myši spôsobuje problémy s iným proteínom, s transportérom kreatínu do bunkových membrán, takže ústne podávaný kreatín nepracuje dobre. Zdá sa, že zvyšovanie regulácie génov AGAT a GAMT a nesprávna lokalizácia proteínu transportujúceho kreatín, sú sekundárnymi dôsledkami absencie dystrofinu u **mdx** myši. Preto bola stvorená **mdx** myš, ktorej gén GAMT bol deaktivovaný. Táto „**dvojito vynulovaná**“ myš nemôže poriadne chodiť, zomiera skôr a jej svalová štruktúra vyzerá podobne ako svaly odobraté pomocou svalovej biopsie od chlapcov s DMD.

Ďalej, chlapci s DMD majú iba 20% bežného množstva kreatínu vo svaloch, zatiaľ čo **mdx** myši ho majú 80%-90%. Toto môže byť jedným z dôvodov pre vznik oveľa závažnejších dystrofických symptómov chlapcov v porovnaní s myšami. Ďalšie vyšetrenie týchto a iných odlišností môže pomôcť vysvetliť, prečo **mdx** myš nie je reálne chorá, a toto môže odhaliť nové spôsoby liečby DMD. Jedným sledovaným smerom je vysoko priepustné filtrovanie/skenovanie, možno v Projektovom katalyzátore (**Project Catalyst**) pre tieto modifikujúce gény (**modifier genes**)! **Bezpečné** zapnutie „dobre modifikujúcich“ (**good modifier**) génov, môže byť primeraným cieľom na dosiahnutie oveľa miernejšej muskulárnej dystrofie pre chlapcov s DMD.

### Pokiaľ ešte stále neexistuje liek, prečo potrebujeme vedieť presnú mutáciu?

<sup>32</sup> Bránica

<sup>33</sup> z angl. „arginine-glycine amidotransferase“

<sup>34</sup> z angl. „guanidino-acetate methyltransferase“

**Kevin Flanigan** z Univerzity v Utahu v Salt Lake City dal odpoveď. Presná mutácia chlapca, u ktorého je podozrenie na DMD, by mala byť známa kvôli potvrdeniu, že skutočne má DMD a nie nejaký iný typ svalového ochorenia, napr. jednu z mnohých pletencových dystrofií, ktoré môžu vykazovať podobné symptómy. Hoci typ mutácie vždy nepredpovedá rozdiel medzi DMD a BMD, ak mutácia ukáže, že čítací/snímací rámec dystrofinu je posunutý, je oveľa pravdepodobnejšie, že ide o DMD. Navyše, vo väčšine prípadov môže byť zabránené vykonaniu svalovej biopsie. Rovnako dôležité je, že poznanie presnej mutácie umožní spoľahlivú odbornú pomoc v oblasti genetiky chlapcovej rodine a jeho príbuzných z matkinej strany, medzi ktorými môže byť identifikovaný nosič DMD. Napokon, nové liečebné metódy, ako napr. metóda preskoku exónu a lieky na prečítanie/zosnímanie STOP kodónu, vyžadujú znalosť špecifických mutácií vo vnútri pacientovho génu dystrofinu.

Aby sa dala detekovať mutácia vymazania a duplikácie, je v súčasnosti široko používaná **metóda vyšetovania viacnásobným zosilnením závislým na zviazaní** (MLPA), ktorú vyvinul pred pár rokmi **Dr. Jan Shouten** zo spoločnosti **MRC-Holland** v Amsterdame. Nasleduje veľmi stručný popis tejto procedúry:

Použitých je 158 oligodesoxynukleotidov so špeciálne navrhnutými sekvenciami pre naviazanie na dve strany každého zo 79 exónov dystrofinu. Ak je exón prítomný, dva nukleotidy, navrhnuté pre konkrétnu sekvenciu exónu, sa naviažu na jeho dve strany, t.j. sú potom so sebou navzájom spojené (zviazané). Zviazané nukleotidy slúžia ako šablóna pre PCR zosilnenie (viď nižšie), pre jednu z multiplikačných metód. Zosilnený produkt môže byť vidno po elektroforéznej separácii ako vrchol grafu. Keď nie je prítomný konkrétny exón, pretože je vymazaný, dva nukleotidy pre tento exón nemôžu byť naviazané na postupnosť exónov a preto sa nemôžu navzájom spojiť, takže chýba zodpovedajúci vrchol na grafe.

Táto technika zachytáva vymazanie a duplikáciu všetkých 79 exónov génu dystrofinu u pacientov s DMD, ale nerozoznáva bodovú mutáciu. Ale keďže je to kvantitatívna metóda, môžu byť vymazanie a duplikácia taktiež spoľahlivo rozoznané iba v jedinom z dvoch génov dystrofinov ženy, ktorá je nositeľkou DMD, aj keď u dotknutého pacienta nie je mutácia odstránenia alebo duplikácie známa. Toto je jedna z najdôležitejších výhod rozšíreného používania tejto metódy.

Avšak môžu sa vyskytnúť falošné pozitívne výsledky, ktoré indikujú vymazanie jediného exónu, pričom ku žiadnemu nedošlo, a to v ojedinelých prípadoch polymorfie na strane, kde sa **MLPA probes** viažu na génovú postupnosť. Polymorfia je zmena jednoduchej bázy v DNA, ktorá nespôsobuje žiadne ochorenie. Preto, ak MLPA metóda nájde vymazanie jediného exónu, požaduje sa jeho potvrdenie inou metódou.

Ak pomocou MLPA testu nie je nájdená žiadna mutácia<sup>35</sup>, pacient má pravdepodobne bodovú mutáciu. Pomocou triediacej techniky **jednoduchého podmieneného zosilnenia/vnútornej rozbušky (SCAIP) (single condition amplification/internal primer)**, vyvinutou v laboratóriu Dr. Flanigana, je možné spoľahlivo nájsť a detailne charakterizovať všetky bodové mutácie, ako aj mutácie spojovacích miest. V dvoch krokoch tejto metódy môže byť stanovená kompletná postupnosť báz všetkých exónov génu dystrofinu, ako aj všetkých hraničných oblastí medzi intrónmi a exónmi so spojovacími signálmi, a taktiež všetkých pôvodcov (podporovateľov) mutácie (ochorenia). Všetky tieto samostatné génové oblasti sú najprv zosilnené v jednej tzv. **polymerázovej reťazovej reakcii (PCR)** a potom sú priamo zoradované použitím štandardnej automatickej metódy triedenia génov na rozpoznanie bodových a iných mutácií.

Skúsenosti s týmito dvoma metódami (MLPA a SCAIP) ukázali, že 93%-95% všetkých mutácií môže byť rozpoznávaných použitím krvnej vzorky. Avšak nie zostávajúcich 5%-7%. Pokiaľ pacient vykazuje definitívne symptómy DMD a BMD, ale z krvnej vzorky nebol identifikovaný typ mutácie, potom sa stáva nevyhnutnou svalová biopsia, takže môže byť rozoznaná prítomnosť, alebo absencia, samotného proteínu dystrofinu vo svalových vláknach pomocou jednej z dvoch metód na detekciu proteínu - metóda „západnej škvryny“<sup>36</sup> alebo metóda imunofluorescencie. „Západná škvryna“ má výhodu v tom, že udáva indikáciu množstva a veľkosti proteínu dystrofinu, ale imunofluorescencia je široko

<sup>35</sup> Ani vymazanie ani duplikácia

<sup>36</sup> Z angl. „Western blot“; názov metódy vznikol ako slovná hračka podľa názvu metódy na detekciu DNA „Southern blot“ od Edwina Southerna

dostupná. Svalové vlákno môže byť tiež použité na extrahovanie mRNA, ktorá môže byť použitá na nájdenie vzácných mutácií, spôsobujúcich začlenenie intrónových fragmentov medzi exóny v komplexnom géne DMD.

Pretože sa presné údaje o mutáciách génu dystrofinu a ich exaktných klinických symptómoch u pacientov s DMD a BMD stávajú čoraz dôležitejšie nielen pre pacientov samotných, ale aj pre liečebných výskumníkov a pre návrh klinických skúšok, laboratórium Dr. Flanigana zhromažďuje tieto údaje pre obecnú diagnostickú databanku v kooperácii s klinickými centrami na šiestich iných univerzitách v Spojených Štátoch. Ale taktiež aj klinické centrá a samostatní špecialisti na neuromuskulárne ochorenia z ostatných častí USA a dokonca aj z iných krajín, sú vítaní pri zasielaní údajov o svojich pacientoch do tejto databanky. V budúcnosti sa bude vykonávať stále viac a viac klinických skúšok, ktoré budú potrebovať účastníkov (pacientov) s definovanými mutáciami a klinickými symptómami. Na základe informácií z tejto databanky môže potom Centrum odporučiť zahrnutie niektorých pacientov do týchto skúšok. Informácie o zapojení pacientových údajov do tejto databanky, o možnostiach skúšok a cenách, môžete nájsť na Internete na [www.genome.utah.edu/dmd](http://www.genome.utah.edu/dmd).

### Rozhovor so Stephenom D. Wiltonom.

Profesor Wilton je vedúci Výskumnej skupiny molekulárnej medicíny v Centre neuromuskulárnych a neurologických ochorení na Univerzite Západnej Austrálie v meste Nedland neďaleko Perthu. Po konferencii, 16. júla 2006, odpovedal **Steve Wilton** na moje otázky o preskoku exónu a o celkovom stave výskumu pre liečbu DMD (otázky sú zvýraznené kurzívou). Celé meno potenciálneho lieku pre preskok exónu, „**antisense**<sup>37</sup> **oligoribonucleotid**“, je tu skrátene na **AON**, alebo **oligo**.

*Začiatok klinických skúšok techniky preskoku exónu. Mohol by si prosím v úvode vysvetliť rodinám chlapcov s DMD, čo budú znamenať veľmi sľubné výsledky výskumu preskoku exónu pre tých, ktorí zúfalo čakajú na liečbu tohto hrozného ochorenia (DMD)?*

Ja by som nepoužil slovo liečba, preskok exónu by nikdy nevyliečil DMD. Prinajlepšom by sme mohli redukovať ťažkosti, ktoré DMD spôsobuje. A v niektorých prípadoch ich budeme schopní redukovať veľmi výrazne.

Radšej by som bol „opatrný optimista“ a poviem, že ak ideme prikladať preskoku exónu nejaký význam, malo by tomu tak byť iba mierne. A keď potom bude preskok exónu pracovať lepšie, ako sme si mysleli, potom to bude perfektné. Je veľmi dôležité nemať príliš veľké očakávania.

*Pomerne často diskutujem na tému preskoku exónu s rodičmi. Vysvetľujem im to tak dobre, ako to dokážem a vždy dodám, že táto technika je testovaná zatiaľ len na zvieratách a nikto nevie v súčasnosti povedať, či bude tak dobre fungovať aj u chlapcov. Potom im vysvetľujem, že len teraz prebiehajú klinické skúšky s chlapcami s DMD, ktoré nám ukážu, či preskok exónu u detí funguje alebo nie.*

To je to, prečo som na tomto konkrétnom stretnutí povedal, že naše laboratórium dokáže vyvolať preskok každého exónu v dystrofinovom reťazci, okrem exónov 1 a 79. Všetky exóny od 2 do 78 dokážeme preskočiť. Mnoho z nich ľahko a mnohé sú viac „tvrdohlavé“, ale vyvinuli sme metódy, ako preskočiť aj tieto komplikované exóny.

Naše klinické skúšky sa robia pomaly, ustálené a krok za krokom a akonáhle je podniknutý jeden krok, sme pripravený vykonať ďalší. Neočakávajú sa veľké bezpečnostné problémy, pretože je liečený jediný sval a tento je potom neskôr odstránený kvôli jeho analyzovaniu. Bolo by väčším rizikom, keby skúšky pokračovali liečbou celého tela, keďže by boli podávané väčšie množstvá AONu a existovala by tak teda šanca výskytu nejakých neočakávaných vedľajších účinkov.

---

<sup>37</sup> „Antisense“ - opak „sense“; v liečbe genetických chorôb to znamená, že ak je známa genetická sekvencia určitého génu spôsobujúceho nejaké genetické ochorenie, je možné syntetizovať reťazec nukleovej kyseliny (DNA, RNA alebo ich chemickej analógie), ktorý sa naviaže na mRNA produkovanú týmto génom a deaktivuje ju - efektívne tento gén vypne. Táto syntetizovaná nukleotidová kyselina sa nazýva „antisense oligonukleotid“, pretože jej základná sekvencia je komplementárna ku génovej mRNA, ktorá sa nazýva „sense“.

Ale nikdy sa nevie, ako dlho po dvoj- alebo štvortýždňovej počiatočnej liečbe dystrofin vydrží. V plánovanej Britskej skúške bude jeden až štyri týždne po liečbe odstránený celý sval a bude molekulárnymi testmi posudzovaný na prítomnosť dystrofinu. To bude dôkaz zásadne ukazujúci na to, že preskok exónu je schopný pracovať aj u ľudí.

Myslím si, že v súčasnosti by nemal nikto experimentovať s rôznymi dávkami alebo s ich periodicitou, pretože skutočným dôkazom bude až liečba celého tela. Teda systematické liečenie na demonštráciu toho, že preskok exónu skutočne v ľudských svaloch pracuje. A to sa zdá byť veľmi, veľmi komplikované, pretože nevieme, koľko potrebujeme AONu a ako často ho musíme podávať.

Čo sa týka preskoku exónu, musíme sa pozrieť na rôzne zlúčeniny pre rôznych pacientov, ktoré pôsobia na rôzne mutácie. Každý pacient bude reagovať rozdielne. Chystá sa veľmi, veľmi komplikovaný výskum. Ale tu môžem byť teraz prehnane pesimistický.

*Holandskí vedci v Leidene teraz skúšajú preskočiť/vynechať exóny 51 a 46 a britskí budú taktiež preskakovať exón 51. Toto bude potom rozšírené na ostatné exóny. Bude sa musieť vždy prejsť cez tie celé zdĺhavé schvaľovacie procesy?*

Bude musieť byť nové schvaľovanie, pretože technicky je každý AON novým liečivom. Ale v čo veríme je to, pretože AONy pre prvé skúšky sú vybrané vzorky, že pre nasledujúce AONy by mohli byť povoloňacie procesy skrátené, pokiaľ sa budú všetky AONy správať podobne a nevyvolajú žiadne vedľajšie účinky.

My, myslím tým britskú spoločnosť MDEX, pracujeme s modifikovanými oligami, chemicky nazývanými morfolíny. Tento typ zlúčeniny bol už systematicky podávaný ľuďom ako potenciálne antibiotikum. Ukázali sa byť bezpečné, pretože sa v tele nerozložili, zdajú sa byť aj perfektne stabilné. Už s nimi boli robené rozsiahle skúšky a teda nevyžadujú také rozsiahle klinické testy, ako napríklad trochu inak modifikovaný AON, ktorý použili holandskí vedci, tzv. **2O-methyl-thioate-protected**, ktorý ešte ľuďom nebol podávaný.

Na druhej strane, morfolíny majú kompletne odlišný hlavný reťazec a pretože sú také zvláštne, neexistuje spôsob, ako by mohli byť integrované do genómu. Takže to čo robíme, nie je v skutočnosti génová terapia, ale skôr modifikácia génového vzorca.

Ak by sa prvé morfolíny ukázali ako bezpečný liek na muskulárnu dystrofiu, verím tomu, že ľudia zodpovední za reguláciu liečiv zmiernia smernice o tom, čo musí byť urobené pre nové oligá pred ich uvedením do klinických skúšok. Pokiaľ by sme robili rozsiahle testovanie pre každý AON, mohli by sme rovno teraz prestať, bolo by to kompletne neudržateľné a neboli by sme schopní liečiť mnohé odlišné mutácie spôsobujúce DMD.

Jedným z najdôležitejších aspektov, ktoré treba zvážiť je ten, že oligá nie sú jednoduché bežné lieky, ale že by sme mohli ponúknuť osobné liečenie (molekulárnu terapiu) upravené podľa potreby chlapcov s DMD.

Spoločnosť **AVI Biopharma** v Portlande v Oregone vyvíja morfolínové oligá ako antivírusové nosiče, ktoré by sa mohli potenciálne dostať k stovkám tisíc ľuďom. A preto - s niektorými smerujúcimi na použitie v rámci bežnej populácie - musíš mať rozsiahle bezpečnostné testovanie, aby si sa uistil, že 0,1% ľudí nebude mať akékoľvek neočakávané odmietavé reakcie. Na rozdiel od tohto, naše oligá na liečbu DMD by boli podávané iba vo veľmi špecifických prípadoch DMD. Takže, pokiaľ existuje nejaká odmietavá reakcia, dotýkala by sa jedného alebo dvoch chlapcov (a my dúfame, že sa žiadna nevyskytne), a pretože títo pacienti budú počas liečby veľmi pozorne sledovaní, akékoľvek vedľajšie účinky by mali byť rýchlo odhalené a mali by byť okamžite prijaté adekvátne kroky.

Stále by však mohli existovať účinky závislé na rôznych nukleotidových sekvenciách oligov. A my si musíme byť vedomí tohto rizika. Ale toto by bol prípad vyvažovania rizika na úkor výhod. Dokonca ak sa vyskytovali nejaké odmietavé vedľajšie reakcie s týmito morfolínmi aplikovanými na konkrétne mutácie DMD, výhody regenerácie dystrofinového vzorca by mohli vyvážiť riziká. Steroidy majú množstvo vedľajších účinkov, ale tieto sú momentálne tolerované ako najlepšia voľba liečenia.

**Dominic Wells** na tomto stretnutí ukázal, že keď vstrekol AON priamo do svalov myší, po štrnástich týždňoch dostal veľmi dobrý efekt preskoku exónu na úrovni RNA. Teda tieto morfolíny vyvolávajú po štrnástich týždňoch preskok exónu. A proteín sa stáva viac stabilným ako RNA. Takže po štrnástich týždňoch, by si mal mať množstvo dystrofinu a to môže vydržať snáď aj 26 týždňov, čo je

vlastne šesť mesiacov! Ja som si nikdy nemyslel, že by to mohlo trvať tak dlho. Pracuje to lepšie, ako sa očakávalo. A keď by sa u chlapcov vyskytli nejaké odmietavé vedľajšie reakcie po podaní morfolínu, možno sú aj spôsoby, ako to kontrolovať. Navyše, chlapci by možno mali nepohodlný týždeň, no potom majú šesť mesiacov pred ďalšou liečbou. Ešte raz, musíme vyriešiť, či je možná liečba dvakrát ročne. Toto by sme mali porovnať s chemoterapiou a rádioterapiou pri liečbe rakoviny. Tie majú otrasné vedľajšie účinky. Tie sú tam však tolerované, pretože iná liečba neexistuje.

**Dva druhy antisense-oligonukleotidov.** *Holandskí vedci skúšajú ich oligami - 2O-methyl-phosphothioates, preksočiť najprv exón 51 a vy a britskí vedci budete testovať morfolíny. Ale pracujete spoločne, nie?*

Holandčania pozerajú na rozmanitosť rôznych exónov a Angličania urobili porovnanie a zistili, že zlúčeniny, ktoré sme vyvinuli, a to predovšetkým morfolíny, pracovali veľmi dobre a rozhodli sa ich použiť pri ich klinických skúškach, ktoré sú ešte stále v štádiu plánovania. Tiež budú skúšať preskočiť exón 51, bude to vlastne paralelná štúdia k tej holandskej skúške. Takže, budeme schopní porovnať rôzne chemické látky, rôzne postupy, a porovnať účinnosť týchto rôznych spôsobov liečby. Toto by nemohlo byť v skutočnosti vykonané, keby sme my a oni skúšali preskočiť iný exón. Teda, ak sa oba typy AONov ukážu ako bezpečné, práce na oboch budú sledované. Dúfajme, že obe poskytnú podobné výsledky.

Jeden v skutočnosti nikdy nevie, čo sa stane, keď je sval dlho vystavený účinkom hociktorého z týchto oligov. Je dokonca možné, že nejaká liečba bude vyžadovať kombináciu oligov. Myšlienkou je, že konkurencia je zdravá, a že nenecháme všetky vajíčka v jednom koši **(zrejme akési príslovie)**. Ak budú sľubné oba systémy, tak oba budú ďalej sledované.

A opäť, ak sa niečo stane po troch rokoch liečby morfolínom, potom sa môžeme vrátiť k liečbe 2O-metylom. Ale pokiaľ nemáme v danom momente nič iné ako morfolín, mohli by sme mať problémy. Ale okrem morfolínov a 2O-metylov existujú aj iné typy AONov, ktoré sú dosiahnuteľné pomocou iných chemických postupov, a ktoré sme schopní vykonať.

**Prvé experimenty s preskokom exónu.** *Kto vlastne prišiel prvý s myšlienkou preskoku exónu?*

Myslím, že táto technika bola vyvinutá súčasne na viacerých rôznych miestach. Ja som robil práce s dystrofinom na vratných (**revertant fibres**) vláknach, ktoré sa samovoľne vyskytujú vo svaloch postihnutých DMD a skúšal som vyriešiť, čo to bol za mechanizmus. A zdalo sa mi logické, že to bol mechanizmus preskoku exónu. To bolo okolo roku 1994 a našli sme nejaké génové prepisy, nejaké funkčné mRNA pre skrátený dystrofin. A potom koncom roku 1996 na stretnutí v Lake Tahoe, som stretol **Ryszarda Kolea** z Univerzity zo Severnej Karolíny. Rozprával o potlačovaní netypického spájania v géne betaglobín ako o liečbe stredomorskej anémie. Pokiaľ viem, bol prvou osobou, ktorá upravila vzorec génu pomocou zmeny spájania. Neskôr sme Ryszard a ja nejaký čas rozprávali a potom nastal jeden z tých momentov, kedy do teba niečo vrazí, doslova ako letiaca tehla! Bola to jednoducho taká obyčajná cesta, po ktorej sa muselo ísť. Pokiaľ si mohol použiť AONy na potlačenie netypického spájania, prečo nepoužiť rovnaký prístup tiež pre bežné spájanie? Po pár týždňoch, keď som sa vrátil naspäť do Perthu, obdržal som od Ryszarda nejaké oligá. Mali sme nejaké kultúry svalových vlákien, ktoré neboli veľmi dobré, ale urobili sme v podstate hneď nejaké experimenty a s jedným z Ryszardových oligov sme dosiahli náš prvý preskok exónu vlastne pri jednom z prvých experimentov.

**Kedy bude existovať liečba pomocou preskoku exónu?** *Gén bol objavený pred 20 rokmi. Každý bol veľmi vzrušený, že by sme už ďalší rok mohli mať liečbu. Čo má ale vlastne človek povedať rodičom, ktorí cítia, že čas ich chlapcov uteká preč? Pred dvoma rokmi mi poskytol Gertjan van Ommen z Univerzity v Leidene rozhovor, v ktorom povedal, že bude trvať asi 10 rokov, kým bude preskok exónu účinkovať aj na chlapcoch. Dva roky už uplynuli, takže ostalo osem. Pýtal som sa našich rodín, či to chcú naozaj vedieť a ich odpoveď bola: „Áno, chceme to vedieť a rozumieme tomu, že podobný odhad nemôže byť presný, a že to nemôže znamenať, že presne v januári 2014 bude existovať nejaký liek pre nášho syna.“ Aká je situácia teraz? Ako dlho si myslíš, že to bude trvať?*

Áno, viem, sú to hrozné veci. Toto je šiesty rok, čo som prišiel na stretnutie Parent Projectu. Bohužiaľ, každý rok stretávam nových ľudí a každý rok tu zasa iní ľudia nie sú. Ale musíme pokračovať pomaly a opatrne a jeden krok za druhým zabraňovať chybám, ktoré by mohli čas čakania dokonca viac predĺžiť.

Avšak som optimista, pretože ak sa prvé klinické skúšky budú robiť opatrne a bezpečne, potom plánujeme veľmi rýchlo pokračovať s novými skúškami. A nové skúšky by zahŕňali nové ciele, ktoré by mohli viesť k preskoku exónov vplyvajúcich na rôzne iné mutácie. Takže odpadne dlhoročné čakanie, aby sme mohli vidieť čo sa stane a analyzovali výsledky. Ak dostaneme pozitívne výsledky jednej skúšky, môžeme čo najskôr začať s ďalším stupňom.

A jednou cestou, ako by sme mohli urýchliť prácu je, že miesto skúšania preskočiť iba jeden exón v danom čase, mohli by sme sa zamerať na dva exóny, alebo dokonca aj viac súčasne, teda urobiť akési multipreskočenie exónu. Prečo nevyužiť „kokteil“ oligov na preskok viacerých exónov naraz? Aktuálne sme to skúšali na bunkovej kultúre s mixom oligov na súčasné odstránenie exónov 50, 51, 52 a 53, pričom to pracovalo primerane dobre. Tiež sme pracovali s iným mixom, ktorý pôsobí na exóny 6, 7 a 8, čo sú exóny u dystrofických psov, ktoré je potrebné preskočiť. Takže by sme to vyskúšali najprv na psovi a potom až na ľuďoch. Jedným z týchto kokteílův by mohlo byť ovplyvnených mnoho rôznych mutácií. Výhodou použitia kokteílův je, že by si mohol urobiť bezpečné testovanie troch alebo viacerých oligov v jednom čase. A dokonca by sme mohli kombinovať rozdielne oligá. To by mohlo významne urýchliť výskumný proces.

Takže vyzerá to tak, že Gertjanov odhad bol naozaj reálny, možno bude ten čas kratší - odtiaľ možno takých 5 až 6 rokov, kým budeme schopní liečiť prvých chlapcov s DMD.

*Keď rozprávam s rodinami, veľmi často ich počujem hovoriť: „Prečo DMD postihla práve nás? Čo ju spôsobilo?“ Ja im odpovedám? „Dôvodom sú mutácie a tie sa vyskytujú náhodne, nedajú sa predvídať.“ Avšak mutácie sú iba hračkou evolúcie. Keby neexistovali mutácie, ani my by sme tu neboli, na Zemi by neexistoval žiadny život, možno iba sliz. Ale evolúcia tiež vytvorila vedcov ako si ty, ktorí to skúšajú napraviť, opraviť gén, vyriešiť ten problém pomocou nájdania liečby.*

To je zaujímavý spôsob, ako sa dá na to pozrieť. Je to pravda, bez evolúcie by sme sa nikdy nevyvinuli. Každý je na pohľad iný, každý má pravdepodobne nepatrne odlišné gény dystrofinu. V niektorých prípadoch existujú jednoduché bázové zmeny v proteínoch kódujúcich exóny, ale tieto zmenia len jednu aminokyselinu a vo všeobecnosti nie sú až tak dôležité, iba ak by to bola jedna veľmi dôležitá aminokyselina. Každý gén dystrofin je jemne rozdielny a genetická zmena sa rozšíri na iné gény a na gény kontrolujúce génový vzorec. Sme veľmi komplikovaný genetický balíček a to je pravdepodobne príčinou rôznych klinických symptómov nájdených u pacientov s DMD.

**Výroba oligov. Kto vlastne robí oligá? Pravdepodobne sa robia automaticky, nie?**

Oligá 20-metylov, ktoré sme použili pri našich začiatkoch, som vyrobil ja osobne s prístrojmi, ktoré máme v laboratóriu. Stlačil som tlačidlá na začlenenie do AONových postupností, naplnil som roztoky a nechal som ich zakryté **(I pressed buttons to key in the AON sequences, I filled the reagents in and kept them topped up)** a stratil som veľa spánku, keď som sledoval syntézu. Chemikálie boli veľmi drahé a ja neznášam plytvanie, takže syntetizér bežal 24 hodín denne. Teraz existuje mnoho spoločností, ktoré robia oligá, ale ja preferujem aspoň nejakú kontrolu tohto procesu. Akonáhle sme optimalizovali náš 20-metyl v kultivovaných bunkách, dostali sme sa do kontaktu s AVI Biopharma v Oregone, so spoločnosťou, ktorá dnes robí naše morfolíny, dokonca pre skúšky klinického stupňa.

*Budú tieto oligá drahé aj vtedy, keď už bude všetko pripravené pre chlapcov?*

Budú drahé, ale nie až tak drahé, ako produkcia vírusov pre génovú výmenu. Preskok exónu bude mnohonásobne lacnejší. Náklady na tvorbu oligov sú značné a my stále potrebujeme mnoho morfolínu s rôznymi sekvenciami. Ale pokiaľ dokážeme vytvoriť oligá, ktoré dokážu efektívne pracovať v malých množstvách, ktoré môžeš podávať v nízkych dávkach a pritom sú stále liečivé, potom tieto lieky nemôžu byť také drahé.

**Dôležitá bude včasná predklinická diagnóza. Pokiaľ funguje preskok exónu alebo iná technika, nemala by byť aplikovaná ešte pred tým, ako sa svaly začnú postupne strácať?**

Včasná rozpoznávanie ochorenia bude dôležité. A možno, ak by preskok exónu fungoval a ukázal sa ako bezpečný, potom (po včasnej diagnóze) môžeš začať liečbu predtým, ako sa vôbec vyskytnú nejaké príznaky. A to by mohol byť veľký rozdiel. Myslím si teda, že včasná diagnóza je dobrý nápad a najnovšie diagnostikovanie svalovej dystrofie by malo byť dostupné kdekoľvek.

**Existuje potom nejaká nádej? Na záver tohto rozhovoru, povedal by si prosím niečo rodičom na udržanie ich nádeje po takomto dôležitom stretnutí, akým bolo toto v Cincinnati?**



Najprv mi dovoľ, aby som ťa prekvapil: pokrok s morfolínom, ktorý bol urobený v poslednom roku, bol ohromujúci, dosiahli sme výsledky ďaleko za našimi očakávaniami. Sme optimisti a očakávame, že bude pracovať ďaleko, ďaleko lepšie, ako sme predpokladali. Na začiatku našej práce sme zistili, že v bunkovej kultúre pracujú veľmi biedne. A keď sme začali práce s myšami podávaním injekcií do živých organizmov, robili sme všetky také tie „fantastické triky“ na to, aby sme ich dostali do svalov. V princípe to fungovalo, ale aj tak sme vyskúšali určitú spätnú kontrolu - morfolín vo fyziologickom roztoku (iba v 0,9% bežnom soľnom roztoku). A pracovalo to nádherne, aj bez akýchkoľvek nosičov na zlepšenie doručenia. Čistý morfolín vo fyziologickom roztoku, najjednoduchšia možná cesta na jeho podávanie, pracoval veľmi, veľmi účinne!

A potom k morfolínom ľudia z AVI Biopharma pripojili nejakú malú skupinu peptidov na ešte väčšie zlepšenie doručenia a tieto veci fungovali na myšiach veľmi, veľmi pekne. Teraz to musíme vyskúšať na ľuďoch. Ľudia z AVI vyvíjajú teraz nové chemické zloženia, robia nové modifikácie, je s nimi nádherná spolupráca.

Ale na záver chcem povedať, že tieto stretnutia Parent Projectu sú veľmi pozitívne. V súčasnosti existuje toľko rôznych výskumných prístupov pre muskulárnu dystrofiu. Sú dosť dobré skúšky nahradenia génu, na prečítanie/snímanie STOP kodónu, sú dva experimenty na preskok exónu, existuje myostatínový program, mnoho rôznych prebiehajúcich vecí a tiež sú detailne skúmané steroidy. Existuje teda dôvod na veľa nádeje.

Ale nikdy to nejde dosť rýchlo. Želal by som si, aby sme mali liečbu už včera. Ale keby sme hneď mohli spraviť akési porovnanie, bude to pomocou preskoku exónu. Zaberie to nejaký čas, kým príde niečo lepšie, alebo viac trvalé. Nie je to perfektná liečba, ale je to to najlepšie, čo dokážeme urobiť v tomto momente s množstvom oligov a s nekompletnou novou technológiou.

*Ďakujem ti veľmi pekne, možno aj za chlapcov, ich rodičov, príbuzných, doktorov a ostatných, ktorí sa o nich starajú, výskumníkov DMD a snáď dokonca aj v mene vplyvných ľudí, ktorí by mohli zmeniť veci takým spôsobom, že ty a tvoji kolegovia dostanete zdroje a príležitosť na skoré dosiahnutie vášho cieľa - liečby Duchenovej muskulárnej dystrofie.*

#### **Záverečné slová Patricie Furlongovej.**

Moji dvaja chlapci, Christopher a Patrick, boli diagnostikovaní viac ako pred 22 rokmi. V tom čase bola táto oblasť prázdna, neexistovala žiadna nádej ani pomoc. Gén dystrofin unikal. V roku 1986 sa zdalo, že sa svet zmenil. S veľkými fanfarami bol identifikovaný gén dystrofin a zdalo sa, že liečba je na obzore. Čoskoro po objavení génu dystrofinu sme zistili, že tá cesta nebola taká jasná, ako sa to zdalo na začiatku. Mali sme sa toho ešte veľa učiť. V posledných piatich rokoch sa dramaticky zmenil svet DMD a my, rodičia a členovia rodín, sme boli týmto zmenám nápomocní. Oblasť DMD je teraz plná možností a v nasledujúcich pár rokoch uvidíme množstvo sľubných klinických experimentov, ktoré dúfajme povedú k vývoju liečby DMD a DMD bude odstránená z listiny smrteľných ochorení. Neočakávam, že DMD zázračne zmizne zo sveta, ale skôr verím, že DMD sa stane chronickým stavom vyžadujúcim opatrné klinické vedenie. Ale bude to zvládnuté a tieto perspektívne liečebné postupy zachovajú a ochránia funkciu svalov. Komunita okolo DMD a jej pokrok sa stane modelom pre ostatných s vážnymi stavmi a naši synovia prežijú, bude sa im dariť a splnia sa im ich sny.

---

Táto správa, napísaná v Cadaqués v Španielsku, v auguste a v septembri v roku 2006, je dostupná aj v španielčine a v nemčine. Všetky moje predchádzajúce správy v angličtine, nemčine a španielčine, sú dostupné na Internete na [www.duchenne-research.com](http://www.duchenne-research.com). Tí, ktorí majú záujem o zasielanie mojich ďalších správ prostredníctvom e-mailu, akonáhle budú hotové, mali by mi prosím poslať svoju e-mailovú adresu.

Günter Scheuerbrandt, PhD., v Talgrunde 2, D-79874 Breitenau, Nemecko  
E-mail: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de)

### Príklad preskoku exónu.

Na tomto príklade sú vysvetlené molekulárne detaily preskoku exónu, pričom sa tak zmení DMD (spôsobená mutáciou, ktorou je odstránený exón 45) na BMD.

Nižšie je zobrazená časť bázevej sekvencie exónov 45 a 46 reťazca mRNA génu dystrofínu, ako aj koniec exónu 44 a začiatok exónu 47. V exóne 45 nie je zobrazených 50 trojíc a v exóne 46 ich nie je zobrazených 30. Pod každou trojicou (kodónom) je zobrazený skrátený názov aminokyseliny podľa genetického kódu. Trojice nasledujú jedna za druhou bez medzier, pomlčky tu len znázorňujú čítací/snímací rámec a vertikálne čiarky znamenajú hranice medzi exónmi. „Liečebný“ oligoribonukleotid, spôsobujúci preskok exónu, sa sám napojí na podčiarknutých 19 báz v exóne 46 z reťazca pre-mRNA. Tri bázy skrytého STOP kodónu sú taktiež podčiarknuté. Exón 45 končí po druhej báze poslednej trojice, ktorá je potom doplnená do trojice AGG pomocou prvej bázy exónu 46 (-AGG-AG | G-CUA-).

```
      Koniec exónu 44 | Začiatok exónu 45                Koniec exónu 45 | Začiatok exónu 46
-UGG-UAU-CUU-AAG | GAA-CUC-CAG-GAU---AGA-AAA-AAG-AG | G-CUA-GAA-GAA-
  trp tyr leu lys | glu leu gln asp   arg lys lys arg|   leu glu glu
```

```
Skrytý STOP kód                antisense oligoribonukleotid
                                GUC-GUU-GAU-UUU-UUU-UUC-G                Koniec exónu 46 |
--AAU-GAA-UUU---AAA-GAG-CAG-CAA-CUA-AAA-GAA-AAG-CUU-GAG-CAA-GUC-AAG |
  asn glu phe   lys glu gln gln leu lys glu lys leu glu gln val lys |

| Začiatok exónu 47
| UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
| leu leu val glu glu leu
```

Pokiaľ chýba v mRNA iba exón 45, potom je posunutý čítací/snímací rámec v exóne 46 o jeden nukleotid doľava a exón 46 potom začína

```
namiesto | G-CUA-GAA-GAA-C          sekvenciou | GCU-AGA-AGA-ACA
          |   leu glu glu          |   ala arg arg thr
```

s tým dôsledkom, že do dystrofínu je pridružených 16 nesprávnych aminokyselín, dokým sa neobjaví predčasný STOP signál UGA, ktorý bol predtým skrytý (-AAU-GAA-UUU- je zmenené na -AAA-UGA-AUU-, predtým skrytý UGA je podčiarknutý). Proteínová syntéza je predčasne prerušená, dystrofín zostáva nekompletný a vzniká DMD. Po odstránení exónu 45 nasleduje po exóne 44 priamo exón 46:

```
      Koniec exónu 44 | Začiatok exónu 46
-UGG-UAU-CUU-AAG | GCU-AGA-AGA-ACA---AGA-UUU-AAA-UGA-AUU-UGU-UUU-AUG-
  trp tyr leu lys | ala arg arg thr   arg phe lys STOP!
```

Ak okrem exónu 45 chýba aj exón 46, čítací/snímací rámec nie je prerušený, neexistuje tam predčasný STOP kodón, ale 108 aminokyselín v centrálnej časti dystrofínu chýba, avšak dystrofín je stále čiastočne funkčný. Toto zmení závažnú DMD na menej vážnu BMD.

```
      Koniec exónu 44 | Začiatok exónu 47
---UAC-AAA-UGG-UAU-CUU-AAG | UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
  tyr lys trp tyr leu lys | leu leu val glu glu leu
```

### Pre potreby Organizácie muskulárnych dystrofikov v SR

Preložil: Filip Zeman, r. 2007

Preklad neprešiel odbornou korektúrou.