

Čítanie genetickej informácie cez predčasný STOP kodón pomocou PTC124. Projektový katalyzátor, ktorý slúži na nájdenie ešte väčšieho množstva liekov na Duchenneovu muskulárnu dystrofiu (DMD).

Interview s Ellen Welchovou, PhD., Diane Goetzovou a Neilom Almsteadom, PhD.

Tento rozhovor bol zaznamenaný v spoločnosti PTC Therapeutics v South Plainfield, v New Jersey (asi 20 míľ západne od New Yorku) mnou, **Günterom Scheuerbrandtom, PhD.**, dňa 21.7.2008 po skončení výročného stretnutia americkej organizácie Parent Project Muscular Dystrophy (PPMD) vo Filadelfii. Nasledujúci text je upravenou a skrátenou verziou pôvodného rozhovoru. Firmou PTC bol poskytnutý ako informačný materiál pre pacientov, ich rodičov a poskytovateľov starostlivosti. Moje otázky sú tu zvýraznené tučnou kurzívou a normálnym písmom sú uvedené odpovede **Ellen Welchovej**, (Zástupkyňa riaditeľ'a, špecialistka na genetické ochorenia), **Diane Goetzovej** (riaditeľ'ka, profesionálna obhajkyňa a obhajkyňa práv pacientov) a **Neila Almsteada** (senior viceprezident, chemik). Na konci tohto textu sa dajú visieť kapitoly o PTC124 a Projektovom katalyzátore v takej forme, v akej boli uverejnené v mojej poslednej správe s názvom „**Research approaches for a therapy of Duchenne muscular dystrophy**“ a mali by sa prečítať ako akýsi úvod k tomuto rozhovoru.

Tento rozhovor budú čítať hlavne pacienti s DMD a ich rodiny. Nepotrebujeme tu opakovať to, čo som už vysvetlil v mojej poslednej správe o PTC124 a Projektovom katalyzátore, ale radšej hovorme o budúcnosti, o ďalšom vývoji vo vašej práci pri hľadaní liečby pre DMD. To by malo poskytnúť nádej pre rodiny, že v nie príliš vzdialenej budúcnosti bude existovať efektívna liečba.

Začiatky PTC Therapeutics. *Moja prvá otázka je, kedy sa začalo s PTC? Prečo ste sa rozhodli zvoliť si DMD a cystickú fibrózu ako prvé ciele vášho výskumu?*

Práve v apríli sme mali naše desiate výročie od založenia. Naša spoločnosť, PTC Therapeutics, založili **Dr. Stuart Peltz** a **Dr. Allan Jacobson** a založili ju na technológii, ktorú použili aj vo svojich vlastných laboratóriách. Študovali spôsob, akým RNA tvorí v tele proteíny a boli

presvedčení o tom, že by bolo možné použiť látky s malými molekulami na opravu chýb v mRNA, ktoré spôsobovali dedičné ochorenia.

Dôvodom, prečo sme sa dali aj na cystickú fibrózu bol ten, že sme spolupracovali s **Dr. Davidom Bedwellom** z Alabamskej univerzity (University of Alabama), ktorý na cystickej fibróze pracoval s klinickou skupinou. Čo je dôležitejšie, vyvinul laboratórnu myš, ktorá obsahovala ľudské gény cystickej fibrózy s mutáciou typu „nonsense“, ktoré vyrábali predčasný STOP kodón. Uvedomil si, že tento STOP kodón sa dá prekonať pomocou antibiotika gentamicínu tak, že genetická informácia bude prečítaná aj napriek prítomnosti predčasného STOP kodónu. Tvorba proteínu CFTR, ktorý chýba pacientom s cystickou fibrózou, tak bude obnovená.

A ako sme sa dostali k DMD? To bolo preto, že profesor **Lee Sweeney**

z Pensylvánskej univerzity (University of Pennsylvania) spolu s **Beth Bartonovou** v roku 1999, práve v čase založenia spoločnosti PTC Therapeutics, ukázali, že gentamicín by mohol prečítať predčasný STOP kodón aj v exóne 23 v dystrofických mdx myšiach. Tieto myši by potom opäť produkovať proteín dystrofin v jeho úplnej dĺžke a redukovali by sa tak symptómy muskulárnej dystrofie.

Zavolali sme teda Leeovi a opýtali sa ho, či by mu nevadilo otestovať jednu z našich zlúčenín na jeho myšiach. Povedal: „Oh, iste, pošlite nám zlúčeninu a my ju pre vás otestujeme.“ Lee je úžasná osoba. Nie je pre neho dôležité, či vydá štúdiu alebo článok, ale dôležité je pre neho vyvinúť liek pre pacientov.

Prvé ciele: Duchenova muskulárna dystrofia a cystická fibróza. Teda na začiatku svojej práce ste začali s vývojom liekov s malými molekulami na liečbu DMD a cystickej fibrózy (CF)?

A stále to robíme. Tieto dva projekty postupujú rovnakým tempom. Tieto ochorenia sú najfrekvencovanejšími genetickými ochoreniami v detstve. Je tu obrovská potreba niečo nájsť. My sme boli šťastní, že sme mali zvieracie modely, ktoré sme mohli testovať, aby sme zistili, či sú naše zlúčeniny vlastne účinné. To je ten dôvod, prečo s týmito dvoma ochoreniami napredujeme.

Asi pred dvoma, troma rokmi sme išli do FDA (americký regulátor) a vysvetlili sme im, že máme malú molekulu, ktorá by dokázala prečítať mutáciu typu „nonsense“, a že by sme s DMD a CF radi napreovali. Povedali, že by sme mali lieky na tieto ochorenia vyvinúť oddelene, keďže by malo ísť o dlhodobú liečbu počas života pacienta, a že by sme mali najprv preukázať ich bezpečnosť. Navrhli sme teda klinické skúšky pre DMD a CF, ktoré práve teraz prebiehajú.

Pri DMD môže byť pomocou PTC124 liečených asi 13% pacientov. Aká je situácia pri CF?

CF sa vo všeobecnosti vyskytuje len u bielej populácie, pričom okolo 10% pacientov má mutáciu typu „nonsense“. V Izraeli je však toto percento na úrovni 60% kvôli tzv. zakladateľskému efektu. Genetická charakteristika CF sa odlišuje od muskulárnej dystrofie. Gén muskulárnej dystrofie sa nachádza na chromozóme X a chlapci majú len tento jeden gén dystrofin. Pri CF je gén CFTR na chromozóme 7, teda každý má dva gény a mutácie CF na dvoch génoch sa môžu líšiť. Jedna z nich môže byť frekvencovanejšia mutácia delta-F508, ktorá vedie k odstráneniu dôležitej aminokyseliny fenylalanínu v proteíne a v inom géne to môže byť mutácia typu „nonsense“. Dokonca aj ak v jednom géne existuje len jeden predčasný STOP kodón a v ďalšom géne je iná mutácia, PTC124 pravdepodobne pomôže.

Ako PTC124 pracuje? Ešte predtým, ako začneme hovoriť o Projektovom katalyzátore, mám jednu biochemickú otázku. Keď PTC124 číta genetickú informáciu cez STOP kodón, ktorý sa objaví vtedy, keď kodón aminokyseliny má kvôli mutácii zmenený jeden zo svojich troch znakov, tento kodón potom už viac nie je použitý v syntéze proteínov. Nemajú teda proteíny dystrofin a CFTR proste len o jednu aminokyselinu menej?

Oh, nie. Keď ribozóm, vyrábajúci transláciou mRNA nový proteín, narazí na predčasný koncový kód, tak sa zastaví a vyrobí tak skrátenejší proteín. Ak je prítomný PTC124, tak nespôsobí preskočenie predčasného STOP kodónu ribozómom. Ponechá ho vsunutý v inej aminokyseline, ktorá je vo všeobecnosti dobre akceptovaná, pokiaľ nezmení rozhodujúcu časť proteínu. Vo všeobecnosti to však nie je problém. STOP kodón nie je preskočený ako exón pri preskoku exónu. Vložená je len iná aminokyselina.

Je na molekulárnej úrovni známe, ako PTC124 pracuje?

Presný molekulárny mechanizmus je neznámy. Môžeme však hádať a obecné aj

rozumieme tomu, čo PTC124 robí. FDA nepožaduje, aby sme poznali presný mechanizmus pri napredovaní s PTC124.

Pravdepodobne ste testovali, či PTC124 nerobí niečo iné, ako je len čítanie cez predčasný STOP kodón. Ste si skutočne istí, že nerobí niečo iné v akomkoľvek inom z našich asi 20 000 génov? A prečo nečíta aj cez prirodzené STOP kodóny?

Nepozerali sme na ostatných 20 000 génov. Čo sme však hľadali bolo to, či by PTC124 mohol čítať aj cez prirodzený koncový kodón na konci mRNA. Takže sme skúmali množstvo génov, aby sme videli, či PTC124 spôsobí vytvorenie dlhšieho proteínu. Ale nenašli sme nič, žiadne predĺženia. Potom sme podávali PTC124 v extrémne vysokých pokusných dávkach potkanom a psom a kontrolovali sme rôzne tkanivá ako mozog, srdce a vnútornosti, aby sme videli, či PTC124 prečítal v živých zvieratách prirodzené koncové kodóny. A znova, nič sa neukázalo. Boli sme teda presvedčení, že PTC124 pôsobil dostatočne cielene len na predčasné STOP kodóny.

Prečo je to tak? mRNA nie je rovná štruktúra. V skutočnosti je to kruh, teda začiatok a koniec RNA sa vzájomne ovplyvňujú. A keď ribozóm narazí na prirodzený koncový kodón, tak je blízko začiatku RNA. Predčasný STOP kodón sa ale objaví vtedy, keď sa v kodóne aminokyseliny v oblasti, kde ribozóm vykonáva transláciu a vyrába proteín, objaví mutácia typu „nonsense“. Teda tieto dva typy koncových kodónov - prirodzený a predčasný - sa nachádzajú v rozdielnych prostrediach. A to je to, čo robí PTC124 tak špecifickým. Je veľmi, ale naozaj veľmi selekčný.

Projektový katalyzátor. Prosím, vysvetlite teraz, čo robíte v Projektovom katalyzátore.

Lee Sweeney bol vlastne jediný, kto navrhol spoluprácu PTC Therapeutics s **Pat Furlongovou**, prezidentkou PPM, na Projektovom katalyzátore. Cieľom bolo

identifikovať ďalšie lieky na DMD, resp. ciele v organizme, ktoré by mali mať buď zvýšenú alebo zníženú reguláciu.

Ako ste vysvetlili vo svojej správe, momentálne pracujeme na piatich cieľoch, ale donedávna sme pracovali na šiestich. Avšak jeden z nich, fosfolamban, ktorý povzbudzoval srdečnú činnosť, sme neboli schopní optimalizovať pomocou akejkoľvek chemickej zmeny. Upustili sme teda od neho a teraz skúsime zvýšiť reguláciu jeho spájacieho partnera SERCA2a, ktorý by mal zlepšiť sťahovaciu funkciu srdcového svalu. Keďže mnoho pacientov má problémy so srdcom, niektorí z nich dokonca vo veľmi skorom veku, mysleli sme, že ak by sme mali vyrobiť liečebný koktejl, potrebovali by sme niečo, čo má pozitívny účinok na srdce. Ostatné ciele, na ktorých pracujeme, je zvýšenie regulácie špecifického svalového rastového faktora IGF-1 a zníženie regulácie myostatínu. Okrem toho chceme spevniť svalovú membránu, teda dúfame, že sa nám podarí nahradiť dystrofin zvýšením regulácie utrofínu. A navyše, alfa-7 integrín (druh integrínu) stabilizuje membránu zvonku.

Ciele, ktoré ste si zvolili pre Projektový katalyzátor, by mohli byť aplikované pre 100% chlapcov a nie len pre 13%, ako je tomu pri PTC124?

Áno, budú pre všetkých chlapcov. A možno by sme ich mohli kombinovať s PTC124. Prečo nie?

Automatická analýza liekov. Teraz sa dostávame k automatickej analýze. Mali by sme rodinám povedať, akým spôsobom sa tento druh vedy v skutočnosti robí. Vo filmoch s vedcami sú títo bežne ukazovaní, ako niečo varia alebo prelievajú nejakú kvapalinu z jednej skúmavky do druhej. To má veľmi d'aleko k množstvu práce s počítačom a k ďalším elektronickým postupom. Môžete nám o tom niečo povedať bez toho, aby ste boli príliš technickí?

Náš prístup k objavovaniu liekov, tak, ako vo väčších spoločnostiach, je hľadať ihlu v kope sena. Máme „knižnicu“, malú zbierku asi tak 200 000 rôznych látok. Dajú sa kúpiť od spoločností, ktoré sa špecializujú na ich zber alebo výrobu. Vyberáme si z ich katalógov také, ktoré majú konkrétne liečivé vlastnosti. Vo všeobecnosti ich vyžadujeme vo forme prášku, mali by byť rozpustné vo vode a veľkosť ich molekúl by mala byť menej ako 500Da (atómová hmotnostná jednotka), t.j., jedna molekula by mala vážiť menej ako 500 atómov vodíka. No a sú samozrejme aj iné vlastnosti, ktoré hľadáme.

Tieto prášky dostaneme vo forme kapsúl, ale skladujeme ich schladené v plátoch s jamkami. Sú to priesvitné pravouhlé plastové zásobníky, s rozmermi asi 6x10cm, s 96 jamkami, čo sú vlastne vrúbky podobné drobným skúmavkám. Vysoko priepustné automatické analyzačné zariadenie potom presunie niektoré z naplní z každého štvrtého takéhoto 96 jamkového plátu do väčších plátov s 384 jamkami a použije ich na analýzu.

Jamky sú označené čiarovým kódom s cieľom označiť ich obsah. Stroj číta tieto čiarové kódy a takto sleduje stopu zlúčenín počas testovacej procedúry. To je dôležité, lebo po dosiahnutí výsledkov musí byť možné identifikovať tie jamky, ktoré obsahujú „zásahy do čierneho“, teda látky, ktoré vykázali žiadanú aktivitu. Potom môžeme získať viac tohto materiálu za účelom vykonania ďalších chemických procedúr.

Teraz vysvetlíme, aké druhy chemických procedúr používa analyzačné zariadenie na nájdenie tých správnych látok, ktoré po neskoršej optimalizácii môžu byť schopné modifikovať našich päť vyššie spomínaných zvolených cieľov. Keďže nie je praktické merať biologickú aktivitu cieľov samotných, napríklad zvýšenie reguláciu utrofinu alebo zníženie reguláciu myostatínu, používame jeden biochemický marker, indikátor, ktorý môže byť miesto

toho použitý na určenie aktivity všetkých piatich cieľov, a ktorý nám tiež pomohol nájsť PTC124. Tento marker je enzým luciferáza, ktorý za normálnych okolností produkuje svetlo vo svätojánskych muškách. Pre naše testy kombinujeme gén nášho cieľa s génom luciferázy takým spôsobom, že zvýšenie alebo zníženie regulácie cieľových molekúl v izolovanej svalovej bunke niektorou z tisícky testovaných zlúčenín tiež spôsobí zodpovedajúce zvýšenie alebo zníženie regulácie luciferázy. Je oveľa jednoduchšie zmerať intenzitu svetla produkovaného enzýmom vo svätojánskych muškách, ako merať výsledky komplikovaných biologických reakcií.

Pri momentálne vykonávaných analýzach vloží človek svalové bunky do vysoko priepustného analyzačného prístroja. Potom naukladá kompletne série 384 jamkových plátov, ktoré už v jamkách obsahujú testované látky, na vstup zariadenia. Stroj potom berie jeden plát za druhým v niekoľko sekundových intervaloch, naplní každú jamku vzorkou svalových buniek a nechá nejaký čas pri určitej teplote testované látky pôsobiť s bunkami - látka a bunka spolu inkubujú. Na konci reakcie urobí pomerne veľký fotoaparát snímku každej jamky z plátu, na ktorej je vidno svätojánske svetlo, pošle tieto údaje o svetelnej intenzite do počítača na výpočty konečných výsledkov a zaznamená ich.

Optimalizovanie aktívnej zlúčeniny.
A teraz, ako prídete nato, že daná látka je ten „zásah do čierneho“ a ako s touto látkou pracujete ďalej?

Na konci testu máme mnoho plátov, ktoré obsahujú nejaké aktívne zlúčeniny, „zásahy do čierneho“, alebo „hity“. Aby sme sa k nim dostali, používame tzv. cherry pickers (sú to akési mechanické ramená na manipuláciu s rôznym druhom materiálov), pomocou ktorých prístroj vyzdvihne malé množstvo „hity“ z danej jamky a presunie ho do jamky na novom pláte. Tento nový plát bude obsahovať iba

„hity“ a my potom vykonáme základnú analýzu iba týchto „hitov“ s cieľom potvrdiť ich aktivitu. Ak sa ich aktivita preukáže, vygenerujeme tzv. krivku koncentrácie pomocou testovania rôznych množstiev látky, z ktorej bol skúmaný „hit“ pri pôvodných testoch. Ak vidíme dobrú dávkovú odozvu, t.j. väčšiu aktivitu pri väčšom množstve látky, sme presvedčení o tom, že tento „hit“ je vlastne tak trocha látkou s liečivými vlastnosťami, ako sme to spomínali na začiatku.

Koľko „hitov“ získate?

Zvyčajne vyberieme okolo 1 000 až 2 000 vyhovujúcich zlúčenín z 200 000 testovaných látok. A obyčajne okolo 50% z nich nám dáva reprodukovateľnú odozvu na dávku.

Teraz vykonávame sekundárne skúšky. Využívame pri nich skutočné biologické reakcie cieľov, nie testy s luciferázou, aby sme videli, či takýto reprodukovateľný „hit“ nie je aktívny len pri analýze, ale skutočne reguluje aktivitu cieľového proteínu. Len asi 20% až 50% zostávajúcich zlúčenín bude týmto spôsobom potvrdených. Chceme sa len uistiť, že skutočne robia to, čo chceme.

A potom budú optimalizované?

Áno, pretože teraz sa do toho zamotávajú chemici. Prvým krokom je zistiť, či tieto zlúčeniny majú alebo nemajú vlastnosti, ktoré im umožnia byť konvertovanými na lieky. Skúšame ich toxicitu na bunkových kultúrach a uisťujeme sa, že ich bude možné jednoduchým spôsobom syntetizovať. Ak ide o prírodné produkty, tieto by mohli byť veľmi zložité. Skúšame, či sú vo vode dostatočne dobre rozpustné tak, aby boli dobre rozpustné a absorbovateľné, keď sa dostanú do žalúdka. Vo všeobecnosti sledujeme známe smernice, kde sú definované vlastnosti potenciálnych zlúčenín na výrobu liekov. Chemici potom idú späť do našej knižnice a hľadajú zlúčeniny s podobnou molekulárnou štruktúrou ako mal aktívny „hit“ a odznova ich testujú. Potom začínajú

resyntetizáciu molekúl, overujú ich aktivitu a napokon modifikujú ich štruktúru, ktorá môže, ale nemusí, zlepšiť ich aktivitu. Na konci tejto práce, ktorá môže trvať aj niekoľko rokov, sme prešli celú cestu od 100 zlúčenín až k 5 či 10, a to skutočne sľubným látkam pre jednotlivé cieľové proteíny. A to je naozaj veľmi strmý zráz na cestu nadol.

Koľko teraz máte optimalizovaných potenciálnych liekov, alebo tých v procese optimalizácie, pre každý z piatich cieľov Projektového katalyzátora? A ako dlho bude ešte trvať, kým sa začnú prvé klinické skúšky s pacientmi s DMD?

Momentálne máme pre každý cieľový proteín identifikovaných niekoľko molekúl. Sme v procese testovania týchto molekúl na zvieracích modeloch tohto ochorenia. Je potrebné pokračovať v optimalizácii týchto molekúl, až dokým nebudeme spokojní s ich bezpečnosťou a s ich aktivitou. Medzi dneškom a klinickými skúškami existuje mnoho krokov, teda je v tomto čase komplikované predpovedať, kedy by sme ich mohli spustiť. Bude to však minimálne niekoľko rokov.

Medzinárodná skúška PTC 124. Vráťme sa teraz späť k PTC124. V mojej poslednej správe boli popísané detaily o vašej dlhodobej medzinárodnej skúške s PTC124 (viď príloha tohto rozhovoru). Skráteno, 165 pacientov v troch skupinách bude liečených 48 týždňov pomocou dvoch dávok PTC124 a placebo. Začala už táto skúška?

Začala sa na 38 miestach a asi 20 ich momentálne vyberá pacientov. Máme zriadený riadiaci kontrolný výbor na dohľad nad skúškou a na vyhodnotenie výsledkov. V Európe je to **Dr. Kate Bushbyová** v Newcastli a **Dr. Thomas Voit** v Paríži a v USA je to **Dr. Valerie Cwiková** z MDA (Muscular Dystrophy Association) a **Giovanna Spinellová** z PPMD. Každý pacient bude liečený takmer jeden rok. Po uplynutí tejto doby budú všetci chlapci, aj tí na placebe,

pripravení prijímať liek počas rozšírenia štúdie, pravdepodobne s vyššími dávkami. Pôjde o dávku celkovo 80mg/kg/deň v troch častiach 20, 20 a 40mg/kg/deň.

Konečné výsledky budú pravdepodobne dostupné v zime alebo na jar 2010. Potom budeme schopní registrovať prihlášku na nový spôsob podávania lieku (NDA) na FDA, približne dva roky od dnešného dňa. Keď budeme mať zrýchlený schvaľovací proces, mali by sme očakávať – aj napriek neexistencii akejkoľvek garancie, že dostaneme povolenie za ďalších šesť mesiacov. Samozrejme sa môže stať mnoho vecí, ktoré to môžu pokaziť a zabrániť udeleniu povolenia.

Teda povolenie môžeme očakávať koncom roka 2010?

Áno, na konci roka 2010. Taktiež budeme predkladať žiadosť na EMEA, čo je Európska agentúra pre lieky. V mnohých iných krajinách sa budeme musieť zapojiť do ich regulačných procesov. Mnoho z nich však bude realizovaných s pomocou nášho nového partnera, spoločnosťou Genzyme. Je to oveľa väčšia spoločnosť ako PTC Therapeutics a má pobočky v mnohých krajinách sveta.

Bude PTC 124 drahý?

V tomto bode by bolo predčasné špekulovať. Momentálne sa sústreďujeme na samotné skúšky. Ak budeme vedieť, že liek pracuje a je bezpečný, potom o tom môžeme hovoriť.

Čo je to PTC124? Posledná otázka. Čo znamená PTC124?

PTC je skratka (z angl.) „*post transcriptional control*“ a číslo 124 je odvodené z jeho chemického mena. Je to 1,2,4-oxidiazol, ktorý pozostáva z päťčlenného prstenca s dvoma atómami uhlíka, jedným atómom kyslíka a dvoma atómami dusíka a spojenými s dvoma prstencami benzénu, ktoré nesú dva malé bočné reťazce. Táto štruktúra je detailnejšie spomenutá vo vydaní časopisu

Nature z roku 2007 a, samozrejme, je patentovaný.

Slová na záver. Myslím si, že na záver tohto rozhovoru je čas na nejaké povzbudivé slová pre rodiny.

Samozrejme, sme veľmi vzrušený z pokroku, ktorý sme dosiahli s PTC124. Skúšame sa posúvať dopredu tak rýchlo, ako to len ide, aby sme ho mohli poskytnúť všetkým chlapcom s DMD, ktorí ho potrebujú. Taktiež sme vzrušení z vyhladok Projektového katalyzátora. Pre chlapcov bez mutácie typu “nonsense” je dôležité priniesť im tieto ostatné lieky z Projektového katalyzátora, a to pre 100% z nich. Samozrejme pracujeme tak rýchlo, ako dokážeme aj na týchto liekoch. Ich vývoj bude rýchlejší, ako pri PTC124, pretože ich “klinická cesta” sa veľmi nelíši a preto máme teraz už viac skúseností. Ale bude to tiež závisieť aj na výsledkoch prebiehajúcej medzinárodnej skúšky s PTC124.

Viac sme sa zamerali na našu snahu na identifikovanie a vývoj zlúčenín, ktoré by liečili rôzne svalové ochorenia, špeciálne DMD, avšak spinálnu muskulárnu atrofiu a myotonickú dystrofiu nevynímajúc. Pokračovať v práci budeme aj pri CF. Toto nás odlišuje od veľkých farmaceutických spoločností, ktoré zameriavajú svoje úsilie oveľa viac na komerčné lieky. Avšak my v PTC Therapeutics robíme všetko pre to, aby sme pre asi nie príliš časté ochorenia, ktoré sú však skutočne vážne a komplikované aj z hľadiska ich liečenia. To je, a stále ostáva dôležitý bod pre nás všetkých.

Keď píšem alebo hovorím k rodinám, v ktorých sa vyskytuje DMD, tak si uvedomujem, čo sú to skutočné problémy. Keď ich porovnam s tými mojimi každodennými, chápem, že problémy, ktoré ja dokážem vyriešiť, aj keď je to komplikované, sú ničím oproti problémom, ktoré má chlapec s DMD, o ktorého je potrebné sa starať počas mnohých rokov.

Myslíme si, že toto je jednou z motivácií pre našich výskumníkov, aby pracovali na ochoreniach, akým je toto. To robí našu prácu zmysluplnou a pravdepodobne aj súčasťou histórie.

Ďakujem veľmi pekne, taktiež v mene mnohých rodín a každého, kto bude čítať to, čo ste nám všetkým vysvetlili.

Ako úvod k rozhovoru sú tu zreprodukované dve kapitoly o PTC124 a o Projektovom katalyzátore, ktoré boli súčasťou mojej poslednej správy s názvom “**Research approaches for a therapy of Duchenne muscular dystrophy**“, publikovanej v máji v roku 2008. Celú správu, spolu s tromi predchádzajúcimi si môžete v angličtine, nemčine a španielčine pozrieť na www.duchenne-information.eu. V týchto správach sú tiež vysvetlené základné biochemické a genetické údaje o DMD. Tých, ktorí si želajú dostávať moje ďalšie správy a rozhovory, ako náhle budú pripravené, by mi mali poslať ich e-mailovú adresu na gscheuerbrandt@t-online.de.

Čítanie cez predčasný STOP kodón pomocou PTC 124. V asi 13% až 15% zo všetkých pacientov s DMD je príčinou vzniku ochorenia mutácia typu „nonsense“ génu dystrofínu. Tento typ mutácie je vlastne zmena jedného bodu, ktorá má za následok začlenenie predčasného STOP kodónu do reťazca mRNA dystrofínu. Takýto predčasný STOP kodón potom spôsobuje predčasné ukončenie syntézy proteínu ešte predtým, ako je vytvorený kompletný dystrofín. Nekompletný dystrofín je príliš krátky na to, aby plnohodnotne plnil svoju funkciu, je zničený a vyvíja sa DMD.

PTC Therapeutics, Inc., spoločnosť zo South Plainfieldu v New Jersey, vyvinula pod vedením *Dr. Langdona Millera* liek PTC124, ktorý umožňuje systému tvorby proteínov *prečítanie* tohto predčasného STOP kodónu v mRNA tak, že môže byť vytvorený proteín vo svojej kompletnej dĺžke. Takáto liečba sa líši od génovej terapie alebo preskoku exónu. Pre rozhodnutie, či bude chlapec s DMD profitovať z užívania PTC124, musí byť genetickými testmi preukázaná prítomnosť predčasného STOP kodónu (TGA, TAG alebo TAA) v jednom z exónov génu dystrofínu tohto chlapca.

Detaily o tomto novom lieku, vrátane jeho molekulárnej štruktúry, boli spolu s komentárom publikované v máji v roku 2007 v časopise Nature. PTC124 je biely

kryštalický prášok, ktorý môže byť užívaný ústne po jeho rozmiešaní vo vode alebo mlieku. Bol objavený použitím automatizovaného analyzačného programu, v ktorom bolo testovaných okolo 800 000 zlúčenín s nízkou molekulárnou hmotnosťou, s cieľom zistiť ich schopnosť čítať genetickú informáciu aj cez predčasný STOP kodón. Jedna z týchto účinných aktívnych zlúčenín, PTC124, bola chemicky optimalizovaná a potom zoširoka testovaná v laboratóriu. V predklinických experimentoch na svalových kultúrach sa dosiahla produkcia dystrofínu. V mdx myšiach, ktoré majú predčasný STOP kodón v exóne 23 v ich géne dystrofínu, sa ukázalo, že PTC124 vyvoláva tvorbu dystrofínu v jeho kompletnej dĺžke, čo má za následok zredukovanie poškodenia svalu počas jeho kontrakcie a zníženie aktivity kreatín kinázy (CK) v krvi. PTC124 teda môže pomôcť svalovým bunkám prekonať jednu z genetických príčin vzniku DMD.

PTC124 nečíta genetickú informáciu cez jej prirodzené koncové (STOP) kodóny, pretože tieto majú odlišné konštrukčné prostredie v porovnaní s predčasnými STOP kodónmi. Toxikologické testy na myšiach, potkanoch a psoch s extra veľkými dávkami tohto lieku ukázali, že majú akceptovateľné vlastnosti, ktoré umožňujú pokračovanie jeho ďalšieho klinického vývoja.

Na 61 zdravých dospelých dobrovoľníkoch vo veku od 18 do 30 rokov bola vykonávaná fáza-I klinickej skúšky s PTC124. Títo dostávali liek trikrát denne počas dvoch týždňov. Touto dávkou by mohla byť udržiavaná koncentrácia séra na úrovni od 2 do 10 μ g/ml. O tejto úrovni bolo známe, že v mdx myšiach bola aktívna. Dobrovoľníci dobre znášali dávky 100mg/kg/deň bez vážnych vedľajších účinkov. Je to dávka vyššia, než aká sa predpokladá u pacientov s DMD.

Tieto výsledky umožnili spustenie fázy-IIa, teda skúšky s chlapcami s DMD. Táto fáza sa konala v období medzi decembrom v roku 2005 a májom v roku 2007. Zapojených bolo 38 chlapcov vo veku od 5 do 17 rokov. Bola to reprezentatívna vzorka pacientov. 33 z nich mohlo stále chodiť a 29 ich užívalo steroidy. 26 chlapcov malo predčasný STOP kódón UGA, 6 UAG a 6 UAA, a to medzi exónmi od 6 do 70. Skúška nebola navrhnutá s cieľom dosiahnuť akýkoľvek liečebný profit. Šesť chlapcov dostávalo dávku PTC124 vo výške 16mg/kg/deň, 20 chlapcov 40mg/kg/deň a 12 chlapcov vo výške 80mg/kg/deň, pričom táto dávka bola rozdelená do troch častí v rámci dňa. Pacienti boli klinicky sledovaní 21 dní pred spustením skúšky, potom užívali experimentálne dávky počas 28 dní a napokon podstúpili kontrolné vyšetrenia počas ďalších 28 dní. Boli vykonané svalové biopsie pred a po skúšobnej liečbe zo svalu *extensor digitorum brevis* na nohe, aby sa odskúšala obnova produkcie kompletného dystrofinu. Ešte pred samotnou liečbou bolo svalové tkanivo zo svalovej biopsie liečené pomocou PTC124 v laboratóriu. Očakávaný nárast úplného dystrofinu v závislosti od veľkosti dávky bol zaznamenaný v tkanive od všetkých chlapcov.

Analýzy svalového tkaniva z biopsie vykonanej po pokusnej liečbe ukázali u 19 z 38 chlapcov kvalitatívny nárast nového dystrofinu na nízkej úrovni. Hlavnými dôvodmi, prečo sa nový dystrofin neprejavil u všetkých chlapcov a vo

väčších množstvách by mohli byť krátkosť pokusnej liečby alebo nevhodnosť svalu *extensor digitorum brevis* na analýzu, pretože má nízku úroveň degenerácie a regenerácie. Všetci chlapci však počas pokusnej liečby vykázali pokles hladiny kreatín kinázy v krvi. Hladina CK v krvi po skončení liečby opäť vzrástla, čo sa očakávalo, pretože PTC124 je liek, ktorý musí byť užívaný kontinuálne. Niektorí rodičia aj učitelia pozorovali, že po dvoch až štyroch týždňoch liečby, hoci krátkej, vykázali chlapci vyššiu aktivitu a výdrž a klesla im únava oproti stavu pred liečbou. Hoci tieto neoficiálne výsledky musia byť zvažované veľmi opatrne, časový priebeh symptomatických zmien poukazuje na účinok lieku. Boli pozorované aj niektoré mierne a ľahko zvládnuteľné vedľajšie účinky, neboli však jednoznačne spôsobené PTC124 a neboli klinicky významné.

Kvôli pochopeniu dlhodobého rizika a výhod PTC124 sa v súčasnosti začína dlhodobá randomizovaná fáza-IIb klinickej skúšky tohto nového lieku. Táto fáza si vyžaduje 165 pacientov vo veku minimálne 5 rokov, ktorí sú schopní prejsť minimálne 75 metrov. Chlapcom na kortikosteroidoch bude dovolené pokračovať v ich liečbe. Účastníci budú náhodne rozdelení do troch študijných skupín. Prvá bude dostávať vyššie dávky PTC124, druhá nižšie a tretia placebo. Liečba bude trvať 48 týždňov. Hlavným prostriedkom na meranie výsledkov bude schopnosť chlapcov chodiť počas šiestich minút porovnaním údajov pred a počas liečby. Bude však existovať aj desať ďalších kritérií. Po skončení skúšky budú všetci pacienti, aj tí na placebe, dostávať vyššie dávky PTC124.

Kvôli tejto skúške bola zriadená medzinárodná riadiaca komisia, ktorá bude organizovať a dohliadať nad spolupracou mnohých klinických centier v Európe, Austrálii, Izraeli, Kanade a v USA. Dr. Kate Bushbyová a Dr. Thomas Voit sú Európski špecialisti na DMD a sú členmi riadiacej komisie. Skúška prebieha v USA

a čoskoro bude rozbehnutá aj v iných krajinách. Ak sa v tejto fáze preukáže liečebný efekt PTC124, bude usilované o získanie marketingových povolení od regulačných úradov, ako sú FDA v USA či EMEA v Európe.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007; 447:87-91.

Schmitz A, Famulok M. Ignore the nonsense. *Nature* 2007;447:42-3.

Projektový katalyzátor je program spoločnosti PTC Therapeutics na hľadanie a vývoj malých chemických zlúčenín, ktoré sa použijú ako lieky na liečbu DMD.

Projektový katalyzátor, vedený **Dr. Ellen Welchovou**, sa začal v máji v roku 2004, s cieľom identifikovať pomocou automatických analyzačných metód spomedzi niekoľko stoviek tisíc zlúčenín tie, ktoré by mohli zvyšovať alebo znižovať produkciu, *expresiu*, štyroch biologických cieľových proteínov vo svalových bunkách a udržiavať a zlepšovať tak štruktúru a funkciu svalov u pacientov s DMD. Zvýšenie regulácie

špecifického svalového rastového faktora IGF-1 a zníženie regulácie *myostatínu* by mohlo podporiť rast a regeneráciu svalov. Zvýšenie regulácie *utrofínu* a *alfa7-integrínu* by mohlo stabilizovať svalovú membránu a tak zlepšiť funkčnosť svalov.

Automatické analyzačné metódy na hľadanie týchto potenciálnych liekov na DMD používajú novo vyvinuté testovacie procedúry, ktoré merajú svetelnú intenzitu špeciálnych proteínov určených na zisťovanie chemických vlastností skúmanej zlúčeniny, ktorým je v tomto prípade enzým luciferáza zo svätéhojanských mušiek. Malé množstvo zlúčenín s minimálne nejakými žiadanými vlastnosťami sú momentálne optimalizované v laboratóriu. Navyše sa začala práca na inom cieľovom proteíne, ktorým je sarkoplazmické retikulum Ca^{2+} ATPázy (SERCA2a). Tento proteín pomáha udržiavať správnu funkciu srdca pri jeho kontrakciách. Tieto veľmi sľubné lieky budú ďalej optimalizované tak, aby v blízkej budúcnosti mohla začať klinická skúška vo fáze-I s chlapcami s DMD.

PTC Therapeutics, Inc.

100 Corporate Court
South Plainfield, NJ 07080, USA
Tel. *1-908-222-7000
Email: patientinfo@ptcbio.com
Internet: www.ptcbio.com

Günter Scheuerbrandt, PhD.

Im Talgrund 2
D-79874 Breitnau, Germany
Email: gscheuerbrandt@t-online.de
Internet: www.duchenne-information.eu

S vďačnosťou prijímam finančnú podporu TREAT-NMD Neuromuscular Network pri zabezpečovaní mojej návštevy PTC Therapeutics v New Jersey, ako aj pri písaní a upravovaní tohto rozhovoru a mojich správ o výskume DMD.

TREAT-NMD Neuromuscular Network

Institute of Human Genetics, Newcastle University
Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK
Email: info@treat-nmd.eu
Internet: www.treat-nmd.eu

Pre potreby Organizácie muskulárnych dystrofiíkov v SR
Preložil: Filip Zeman
Preklad neprešiel odbornou korektúrou.