

Výročná spojená konferencia Parent Project Muscular Dystrophy, Filadelfia, 12. až 14. júl 2007

Spoločná práca s cieľom skončiť s Duchennovou svalovou dystrofiou.

Viac ako 400 ľudí prišlo do Filadelfie, aby sa zúčastnilo výročnej konferencie Americkej organizácie Parent Project Muscular Dystrophy (PPMD). Počas troch dní bolo na programe okolo 60 prezentácií na témy ako výskum liečby, lekársky a sociálny manažment a legislatívne záležitosti. Ja, Günter Scheuerbrandt, biochemik z Nemecka, som bol požiadaný prezidentkou PPMD Patriciou Furlongovou, aby som napísal správu z tohto stretnutia pre vás, chlapcov a mladých mužov s Duchennovou muskulárnou dystrofiou (DMD) a pre vaše rodiny, pre všetkých, ktorí si želáte vedieť, ako pokračuje práca výskumníkov a ostatných expertov pri hľadaní účinnej liečby DMD.

Táto správa je mojou treťou zo stretnutí PPMD. Dve predchádzajúce boli zo stretnutia PPMD v Cincinnati v júli 2006 a zo stretnutia PPUK¹ v Londýne v októbri 2006. Tieto správy si môžete prezrieť na mojej internetovej stránke www.duchenne-research.com a stiahnuť si ich odtiaľ vo formáte PDF.

Táto správa obsahuje len súhrn vedecko-výskumných prednášok, pretože ja nie som lekár alebo expert na sociálnu oblasť. Nie je to vedecká publikácia a pokúsil som sa ju napísať tak, aby ste pochopili, čo sa v laboratóriách deje.

Používal som iba mená prezentujúcich bez ich titulov. Väčšina z nich sú profesori alebo majú titul PhD alebo MD², alebo oboje. A väčšina z nich sú vedúci laboratórií, tzn., že spolu s kolegami a postgraduálnymi a bežnými študentmi pracujú ako jeden tím na projektoch, o ktorých pojednáva aj táto správa. Nie je však možné spomínať tu všetky ich mená. Všetci vedci, ktorých prezentácie tvoria súčasť tejto správy, mali príležitosť vidieť jej návrh a v prípade potreby mali možnosť ho korigovať. Väčšina z nich tak aj urobila.

Úvod

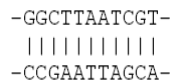
Na začiatok stretnutia **Richard Finkel** z Detskej nemocnice vo Filadelfii, **Dominic Wells** z Imperial College v Londýne a **Steve Winton** z University of Western Australia v Perthe, hovorili podrobnejšie o všeobecných faktoch o DMD a o rôznych výskumných stratégiách. Keďže moja posledná správa zo Cincinnati začínala podobným úvodom, skrátil som tieto moje predchádzajúce odstavce, doplnil som ich novými informáciami a v tejto správe som ich zopakoval. Mojim cieľom bolo pomôcť Vám v chápaní toho, ako gény tvoria proteíny,

¹ PPUK - Parent Project United Kingdom

² MD - angl. skratka z „Doctor of Medicine“

prečo je dystrofin taký dôležitý, ktoré vedecké a výskumné prístupy sa aktívne sledujú a ako funguje preskok exónu.

Ako gény tvoria proteíny? Gény sú funkčné jednotky genetického materiálu, **deoxyribonukleovej kyseliny, DNA**. Jej štruktúra vyzerá ako poprepletaný rebrík, *dvojitá špirála*. Každý stupienok tohto rebríka obsahuje dve zo štyroch rôznych malých molekúl, tzv. **báz**: *adenín, guanín, tymín a cytozín* (A, G, T, C). Z priestorových dôvodov môžu stupienky obsahovať iba dve báze kombinácie, tzv. **bázové páry** A-T a G-C. Ak napr. -GGCTTAATCGT- je postupnosť týchto báz na jednom vlákne, postupnosť na protihlacom vlákne musí byť -CCGAATTAGCA-, takže obe postupnosti sú *navzájom komplementárne*.



Táto postupnosť báz, *genetických znakov*, tvorí **genetickú informáciu** potrebnú na vývoj a udržiavanie živých organizmov a je odovzdávaná z jednej generácie na druhú.

Väčšina génov nosí inštrukcie pre biosyntézu **proteínov**. V bunkových jadrách je **vyjadrená** genetická inštrukcia aktívnych génov, je kopírovaná - **transkribovaná** (prepísaná) - do ďalšej genetickej látky, **premediátorovej ribonukleovej kyseliny**, alebo inak **pre-mRNA**, taktiež nazývanej *transkript*. Väčšina génov pozostáva z **exónov** a z **intrónov**. Exóny sú aktívne alebo kódovacie oblasti, ktoré obsahujú informácie potrebné pre proteíny. Intróny sú často oveľa dlhšie a neobsahujú len „genetický odpad“, ako by sa mohlo zdať, ale aj dôležité informácie na kontrolu aktivít génov. Po prepísaní (transkripcii) sú intróny z premediátorovej RNA odstránené, exóny sú navzájom **spletené** do formy **mediátorovej RNA, mRNA**. Táto sa potom presunie do **ribozómov**, čo sú proteín syntetizujúce štruktúry v cytoplazme mimo bunkových jadier. Ribonukleové kyseliny, **RNA**, používajú bázu U, *uracil*, namiesto podobnej bázy T v DNA. Spájacie strany sú špecifické časti vo vnútri exónov a na hranici medzi exónmi a intrónmi, ktoré sú základom pre správne odstránenie nekódovacích intrónových postupností z pre-mRNA. Samotné spájanie je dokončované pomocou spliceosómov³ (inak nazývané aj „komplexy zostrihu“), čo sú komplexy mnohých proteínov a malých RNA.

V mediátorovej RNA špecifikujú tri po sebe idúce bázy, nazývané aj ako **kodón** (alebo inak *triplet* či *genetická správa*), jednu z dvadsiatich rôznych **aminokyselín** presne podľa **genetického kódu** (až na tri výnimky). Medzi kodónmi nie je žiadne miesto. V ribozómoch sú genetické kódovacie správy čítané a prekladané do jazyka proteínov, pričom proteíny sú zložené z mnohých, často až z tisícok aminokyselín, ktoré sú stavebnými blokmi ribozómov. Tie tri spomínané výnimky sú triplety UAA, UAG a UGA. Tieto sú tzv. **stop kodóny**, ktorými sa zostava proteínov končí.

Dystrofinový gén a dystrofinový proteín. Duchennove a Beckerove muskulárne dystrofie (DMD a BMD) sú spôsobené **mutáciou** alebo poškodením **dystrofinového génu**, ktorý nesie informáciu pre rôzne formy **proteínu dystrofin**. S postupnosťou 2 220 223 báz je to čo do dĺžky najdlhší známy ľudský gén. Iba 11 058 báz, t.j. 0,5%, v 79 exónoch génu dystrofinu špecifikuje postupnosť 3 685 aminokyselín normálneho dystrofinu vo svalových bunkách. Gén má sedem alebo možno aj osem rôznych promótorov⁴, básových postupností, ku ktorým sa regulačné proteíny viažu a tak aktivujú gén iniciovaním transkripcie jeho informácií, s cieľom dokončiť produkciu jeho proteínu. Kvôli mnohým promótorom a v dôsledku alternatívnych väzieb pri spájaní báz, existuje mnoho *rozličných prídavných foriem*

³ Z angl. „**spliceosome**“ - sú dlhé komplexy proteínov RNA, ktoré pozostávajú z piatich malých častíc s názvom ribonukleoproteín, nachádzajúcich sa v bunkovom jadre

⁴ Z angl. „**promoter**“ - charakteristická sekvencia DNA, na ktorú sa viaže prostredníctvom svojej σ -podjednotky RNA-polymeráza; je to miesto, kde sa zahajuje proces transkripcie

dystrofínu. Všetky z nich sú kratšie ako normálny dystrofin vo svaloch. Nachádzajú sa v rôznych orgánoch, jeden z nich dokonca aj v mozgu. Jeho dĺžka je len 32% v porovnaní s bežným dystrofinom a tiež môže byť postihnutý mutáciami. Toto môže byť dôvodom psychických problémov niektorých chlapcov s DMD.

Veľkosť dystrofinového génu a proteínu. Dvojitá špirála dystrofinového génu je dlhá 0,75mm. Spolu s ostatnými 20 488 ľudskými génmi zaberá v bunkovom jadre priemer okolo 0,01 mm, a to len preto, že genetický materiál je zbalený extrémne natenko. Jedna molekula proteínu dystrofin natahnutá do maximálnej dĺžky je oveľa menšia ako je to pri géne dystrofin. Je to 125 nanometrov (t.j. 0,000125mm). 80 000 týchto proteínov na dĺžku meria iba jeden centimeter. A v jednom grame svalu je 114 miliárd molekúl dystrofinu. To môže napomôcť pri hodnotení práce vedcov: zastaviť ochorenie, t.j. nechať svaly opäť pracovať znamená, že sa musí objaviť minimálne 30% bežného množstva dystrofinu, keď ho svaly prestanú samy tvoriť. Nový dystrofin nemusí mať presne tú istú formu, môže byť kratší, ale musí byť schopný poriadne a správne pracovať. Znamená to, že sú potrebné miliardy a miliardy nových molekúl dystrofinu do každého gramu svalu, pričom dieťa má svalov niekoľko kilogramov.

Úloha dystrofinu. Dystrofin je potrebný pre mechanickú stabilitu svalových buniek. Nachádza sa vo vnútri membrán svalových buniek. Jeden z jeho koncov, **C-terminal**, je viazaný na skupinu ďalších proteínov v membráne (**dystrofin-glykoproteínový komplex**). Druhý koniec, **N-terminal**, sa pripája na zmršťujúce štruktúry vo vnútri svalových buniek. Centrálna časť dystrofinu, tzv. **rod domain**, pozostáva z článkov špirálovitej aminokyseliny, ktorá sa niekoľkokrát skladá sama na seba. Ak sťahovací moment svalových buniek núti dystrofin zmeniť jeho dĺžku, jeho „skladaná“ (špirálovitá) štruktúra mu umožní pôsobiť ako pružina, ako akýsi *antišokový absorbér*. Dystrofin teda prenáša mechanickú energiu produkovanú pomocou aktínovo-myozínového *sťahovacieho mechanizmu* do membrán svalových buniek a do štruktúr mimo nich (do spojovacích tkanív a do šliach) pomocou dobre vybalansovaného mechanizmu, ktorý bunky nepreťažuje.

Dystrofin má viacero úloh. Organizuje komplikovanú štruktúru dystrofin-glykoproteínového komplexu a umiestnenie mnohých iných proteínov. Taktiež reguluje komplex procesov ako je udržiavanie správneho množstva vápnika v bunkách a týmto kontroluje rast svalov. Stále je však neznámych mnoho detailov týchto spletených interakcií medzi množstvom zložiek živej bunky.

Chlapci s DMD nemajú vo svalových vláknach žiaden dystrofin, alebo ho majú len veľmi krátky. Keď chýba jeho organizujúci a ochranný mechanizmus, kontrakcie svalov spôsobujú pretrhnutie svalových membrán a to vedie k značnému toku vápnika do svalových vlákien. Nadbytok kalcia aktivuje enzýmy ako *kalpain*⁵ a ostatné proteázy⁶, ktoré porušia svalové proteíny a iniciujú samo deštrukčný mechanizmus buniek, apoptózu. Dôsledkom je reťaz udalostí ako zápal a aktivácia fibroblastov, ktoré vedú k **fibróze**. Ide o zjazvenie tkaniva, ktoré spomaľuje regeneráciu svalov a vedie k typickým symptómom u starších pacientov s DMD.

Chlapci s pomalšou *BMD* majú väčšinou nižšie množstvo dystrofinu ako je bežné a tento je navyše tiež kratší. Stále ale dokáže plniť svoju funkciu, nie však tak efektívne ako je bežné.

Nielen kostrové svaly však trpia neprítomnosťou dystrofinu, ale aj hladké⁷ a srdcové svaly. Porucha srdcových svalov spôsobuje *kardiomyopatiu*; slabnutie hladkých svalov má mnoho následkov. Medzi iným redukuje schopnosť ciev uvoľniť sa, keď narastá objem pretekajúcej

⁵ **Kalpain** - proteáza závislá na vápniku, nachádza sa vo všetkých cicavcoch a v mnohých iných organizmoch

⁶ **Proteáza** - enzým produkovaný bunkami, ktorý štiepi proteíny.

⁷ sú to napr. svaly tráviaceho traktu, ale nachádzajú sa aj v dúhovke oka

krvi, čo má za následok respiračné a iné problémy. Taktiež je zasiahnutý tráviaci trakt, keď je redukovaná pohyblivosť čriev. Teda zmena len jedného génu dokáže ovplyvniť činnosť celého tela.

Mutácie génu dystrofínu. Existujú tri bežne známe typy mutácií, ktoré ovplyvňujú funkciu génu dystrofín. **Delécia**, t.j. ak jeden alebo viacero celých exónov v géne chýba; **duplikácia**, ak sa časť génu opakuje a **bodová mutácia**, ak sú samostatné bázové páry vymenené, eliminované alebo pridané (sú akoby navyše). Medzi ostatné mutácie patria inverzie a zmeny v intrónoch, ktoré pozmeňujú bežný spájací vzorec.

Keďže kodóny mediátorovej RNA sú v ribozómoch bez prerušenia čítané jeden za druhým, nie je tento **čítací rámec** prerušený, pokiaľ mutácia rezultuje do odstránenia alebo prídania celých kodónov v každej z troch báz. V tomto prípade zostáva čítací rámec čitateľný („**in-frame**“), pričom dystrofín môže byť stále tvorený, avšak bude dlhší alebo kratší oproti normálu. Ak zmeny ovplyvňujú len nedôležité časti dystrofínu, tento môže stále čiastočne plniť svoju funkciu a tak umožniť vznik menej závažnej **BMD**.

Ak však mutácia posunie čítací rámec o jeden alebo dva bázové páry, tento sa stane nečitateľný („**out-of-frame**“). Okrem toho je do proteínu štartujúceho z miesta mutácie začlenených mnoho nesprávnych aminokyselín až kým sa nedosiahne **predčasný stop kodón**. Neúplný dystrofín nedokáže plniť svoju funkciu, zaniká a rozvíja sa **DMD**.

Klinický priebeh DMD. Prvé klinické príznaky sa objavujú vo veku dvoch až troch rokov života a spôsobujú problémy pri chôdzi, špeciálne pri zdolávaní schodov. Bez včasného rozpoznanie je dokonca aj dnes toto ochorenie diagnostikované až vo veku okolo troch až piatich rokov. Keďže pri tomto ochorení narastá aj počet kontraktúr chodidla, kolien a bedrových kĺbov, pacienti strácajú vo veku 12 až 15 rokov schopnosť chodiť. Postupujúce deformácie chrbtice, skoliózy a pohybové obmedzenia privedú pacientov postupne do štádia závislosti na nepretržitej starostlivosti. Zasiachnutie respiračných a srdcových funkcií vedie k smrti v dôsledku dychovej a srdcovej nedostatočnosti už v pomerne skorom mládežníckom veku. Liečba kortikosteroidmi, cvičenie, ortopedické zákroky s cieľom zabrániť kontraktúram a deformáciám chrbtice, ako aj pomoc pri dýchaní či iné spôsoby menežovania pacientov, môžu zlepšiť kvalitu ich života a výrazne ho predĺžiť.

Na tomto a na predchádzajúcich stretnutiach Parent Project boli prednesené aj niektoré prednášky k problematike sociálnej a lekárskej starostlivosti. Verím, že nejakému tímu špecialistov sa naskytne možnosť napísať správu podobnú tejto vedeckej, pretože pre chlapcov s DMD bude potrebná pre uvedenie si a využitie všetkého, čo bolo v posledných rokoch dosiahnuté na zmiernenie ich útrap, predĺženie ich života a pre zvýšenie jeho zmysluplnosti.

Rôzne stratégie liečby DMD.

Výskum sa snaží vyvinúť liečbu DMD pomocou dvoch genetických a jedného farmakologického prístupu.

Prvý *genetický prístup*, **preskok exónu**, nezasahuje porušený gén. Zasahuje iba do procesu spracovania genetickej informácie na jej ceste z génu do proteínu. Touto technikou je špecificky nahrádzané splietanie exónov pre-mRNA na mRNA tak, že je prerušená nečitateľná genetická informácia (out-of-frame) znova čitateľná (in-frame). Výsledok je rovnaký ako pri technike transplantácie génov: DMD je spomalená na BMD. Absolútne nový typ *genetických liekov* dokáže vykonať zmenu genetickej informácie. Boli na to špeciálne vyvinuté a volajú sa **antisense oligoribonukleotidy**, **AONy**.

Druhým genetickým prístupom je pokus zaviesť nové gény dystrofínu do jadra svalových buniek, ktoré by potom mohli dystrofín priamo produkovať. Mnohé pokusy na myšiach ukázali, že to môže byť dosiahnuté modifikovaným „skroteným“ vírusom, tzv. **adeno-**

asociovaným vírusom, AAV⁸. Tento vírus sa použije ako prenášač, alebo nosič aktívnych častí, kombinovaných exónov (**cDNA**) génu dystrofinu do svalových buniek. Ale tento nosič AAV nie je dostatočne dlhý na to, aby preniesol kompletný reťazec cDNA so všetkými 79 exónmi. Do AAV zapadnú iba tie cDNA, ktoré majú tretinovú dĺžku oproti normálu. To znamená, že aj nový dystrofin bude mať iba tretinovú dĺžku oproti svojej normálnej dĺžke. Ak tento skrátenejší dystrofin má jednu zo štruktúr, ktorá spôsobuje miernu BMD, efekt liečby ako takej nie je kompletne vyliečenie, ale iba spomalenie rýchlej DMD na oveľa menej progresívnu formu BMD s pomerne normálnymi vyhliadkami na ďalší život. Keďže tento novovložený genetický materiál nedokáže preniknúť do chromozómov buniek, zmutovaný gén dystrofinu nie je zmenený. Zostáva tak ako bol v skrátenej ramene chromozómu X.

Keďže oba tieto genetické prístupy sú nové, výskum musí napredovať veľmi opatrne. Hoci je lákavé pretlačiť nové spôsoby liečby čo najrýchlejšie do praxe, je dôležité neurobiť chybu spochybňujúcu ich bezpečnosť, pretože by to mohlo zasiahnuť celé pole genetickej liečby. Preto sú povoloňacie procedúry veľmi prísne a zaberú značný čas.

Tretí liečebný prístup sa pokúša bojovať s negenetickými následkami absencie dystrofinu, ako napríklad deštrukcia svalov pomocou enzýmov deštruujúcich proteíny, netesnými (bunkovými) membránami, fibrózami a zápalmi. Existuje množstvo liekov (niektoré z nich sú už dokonca na trhu) na liečbu iných ochorení, u ktorých sa predpokladá pozitívny účinok aj pri liečbe DMD. V sekcii farmakologické prístupy sú zosumarizované len nedávne výskumné výsledky, o ktorých sa na stretnutí diskutovalo.

Prečo potrebujeme klinické testy?

Ako dostať liek k pacientovi. Vo svojej prezentácii s názvom *Úvod do klinických testov*, vysvetlila **Kate Bushbyová** z Univerzity v Newcastli, ako sa stáva skutočnosťou myšlienka vedcov, hypotéza, a ako vedie k vývoju efektívnych liečiv na DMD. V tomto súhrne som zopakoval niektoré najdôležitejšie všeobecné informácie, ktoré poskytla Dr. Bushbyová na stretnutí PPUK v roku 2006 v Londýne spolu s niektorými detailmi, ktoré odzneli na tomto stretnutí vo Filadelfii.

Klinické skúšky sú najdôležitejšou súčasťou vývoja liečebných procesov, ktoré zaberú mnoho rokov. Chlapci s DMD však nemajú toľko času, aby čakali na to, kým sa pre nich stanú lieky dostupné. Oni a ich rodiny by však mali pochopiť, že vedci chápu ich situáciu a pracujú tak rýchlo ako len dokážu spolu s mnohými spolupracovníkmi a spolu s regulátormi na tom, aby si boli istí, že lieky, po ktorých pátrajú, sú efektívne a bezpečné. No od začiatku, už v predklinickej úrovni, musia pracovať veľmi opatrne, krok za krokom, aby mohli začať klinické skúšky. A tieto laboratórne experimenty môžu zaberať niekoľko rokov. Napríklad, od prvých myšlienok o preskoku exónu ako o novej metóde boja s dedičným ochorením v roku 1993, trvalo 13 rokov, kým bola táto technika použitá v prvých klinických skúškach na chlapcoch s DMD.

Prvou úlohou vedcov, ktorí začínajú s vývojom liekov, je zozbierať experimentálne údaje testovaním ich novej myšlienky na modeli ochorenia, ktoré je podobné DMD, t.j. na izolovanej svalovej bunke *in vitro*⁹ v laboratórnej miske a *in vivo*¹⁰ na dystrofických mdx¹¹

⁸ **Adeno-asociovaný vírus (AAV)** - je malý vírus, ktorý infikuje ľudí a niektoré iné druhy primátov; napáda deliteľné aj nedeliteľné bunky, pričom môže upraviť svoj genóm podľa hostovskej bunky - preto je veľmi atraktívny pre vedcov a výskumníkov ako genový nosič pri genetickej liečbe; nie je známe, že by spôsoboval ochorenia alebo ťažké imunologické

⁹ **in vitro** - označenie experimentálnych metód, pri ktorých biochemické resp. biologické deje prebiehajú mimo organizmus alebo bunku v skúmavke, banke a pod.

¹⁰ **in vivo** - označenie dejov, ktoré prebiehajú v organizmoch, orgánoch alebo bunkách

myšiach a GRMD¹² psoch. Na stanovenie, či ich metóda zmení proces ochorenia, jeho patológiu, vedci presne stanovujú biochemické a biologické následky nimi navrhovanej liečby, ako je napr. aktivita enzýmu kreatín kináza¹³, štruktúra svalov, t.j ich histológia, prítomnosť a vlastnosti dystrofinu a jeho mRNA. S experimentmi na zvieratách môže byť stanovená úroveň zlepšenia svalových funkcií a odskúšaná toxicita, aby sa ukázalo, či má nová substancia pozitívny účinok a či nie je jedovatá.

Ale ani vysoká kvalita a spoľahlivosť výsledkov predklinických skúšok nedokazuje, že nová zlúčenina, čiže potenciálny nový liek, má vykazovať rovnaké výsledky aj pri testoch na deťoch. Hoci mdx myši nemajú vo svaloch dystrofin, tieto malé zvieratká nie sú v skutočnosti postihnuté. Ich ochorenie je oveľa miernejšie ako u ľudí. Dystrofia u oveľa väčších zlatých retrieverov, tzv. GRMD psov, sa viac podobá na ľudské ochorenie. Tieto psy sú skutočne postihnuté a ich komplikácie narastajú. Avšak vždy treba pamätať na to, že výsledky experimentov, ktoré boli získané na pokusoch so zvieratami, sa nedajú očakávať aj u ľudí. *Dieťa nie je veľká myš či dvojnohý pes!* Z tohto dôvodu sú nevyhnutné klinické skúšky s deťmi s DMD.

Skúšky väčšinou prechádzajú troma fázami a je dôležité spomenúť, že vo fázach I a II účastníci skúšok nemôžu očakávať nejaké liečebné benefity, keďže tieto typy skúšok sú navrhované hlavne na získanie odpovedí na otázky ohľadom bezpečnosti a účinnosti.

- 1.) Fáza I: je určená na testovanie toxicity
- 2.) Fáza II: je určená na testovanie dávkovania, bezpečnosti a niektorých účinkov liečby
- 3.) Fáza III: pokračuje v hľadaní odpovedí na otázky, ale je navrhnutá na potvrdenie klinicky relevantných pozitívnych účinkov a dokazuje účinnosť liečby, t.j. na definitívne ukázanie, že nová liečba urobí reálny rozdiel, funkčné zlepšenie v kvalite života.

Klinické skúšky slúžiace na nájdenie liečby DMD predstavujú množstvo špeciálnych problémov:

- 1.) Toto ochorenie je vzácné, preto sa oň farmakologický priemysel nie vždy zaujíma. Tento záujem je však pre vývoj liekov nevyhnutný. Tento druh priemyslu tiež potrebuje motiváciu vo forme profitu, aby sa na takýto výskum dalo nalákať účinné množstvo kapitálu, takže sú dôležité regulačné dokumenty, ako je napr. *orphan-disease* status popísaný na strane 18 tejto správy.
- 2.) Keďže DMD je pomerne vzácné ochorenie, pacienti so špecifickými formami mutácie dystrofinového génu sa vyskytujú v pomerne nedostatočnom množstve. Tento problém sa bude zhoršovať, pretože mnoho pacientov doposiaľ nepodstúpilo kompletnú molekulárnu diagnostiku, vrátane testov na bodovú mutáciu v tých prípadoch, v ktorých sa nepotvrdila mutácia odstránenia. Rodičia by teda mali naliehať, aby bola čo najskôr, ako je to len možné, identifikovaná presná forma mutácie génu pre dystrofin ich syna.
- 3.) V súčasnosti vznikajú národné a medzinárodné registre, ktoré budú obsahovať kompletne diagnostické údaje o čo najväčšom počte pacientov z celého sveta. Viac detailov o tomto programe môžete nájsť na www.treat-nmd.eu. Rodiny by mali byť

¹¹ **mdx myš** - myš s dedičným ochorením svalov, ktoré je spôsobené mutáciou na chromozóme X; slúžia ako model pri výskume DMD

¹² **GRMD pes** - je zlatý retriever s DMD, ktorá je spôsobená mutáciou jeho génu dystrofinu

¹³ **Kreatín kináza** - katalyzuje premenu kreatínu na fosfokreatín, pričom sa spotrebúva adenosíntrifosfát (ATP) a vzniká adenosíndifosfát (ADP)

nabádané pátrať po týchto registroch a mali by im poskytnúť potrebné údaje o svojich deťoch.

DMD je komplexná porucha a efektívna liečba účinná počas celého pacientovho života bude musieť pravdepodobne pôsobiť na základe genetických postupov, ktoré tvoria dystrofin v zdravých svaloch. Takýto genetický liek bude pravdepodobne úplne novým typom lieku, ktorý bude schopný pracovať dlhodobo, liečiť všetky svaly vrátane svalov pľúc a srdca. Preto sú veľmi prísne nároky na bezpečnosť a účinnosť liekov na DMD.

Dohľad a usmernenia od rôznych úradov a príslušných odborníkov sú tu na ochranu pacientov pred nehodami a poškodeniami a tiež chránia lekárov pred právnymi následkami pri potenciálne nebezpečnej liečbe. Musia sa uistiť, že skúška bude primeraná hľadanej odpovedi na kladenú otázku. Usmernenia, alebo regulácie, by mali tiež zaistiť konzistenciu a presnosť údajov, potrebných pre konečný súhlas od regulátora. Rozsiahle papierovanie, veľké omeškания a rozsiahle náklady klinických skúšok (clinical trial¹⁴) nás uisťujú o tom, že všetko sa odohráva korektne a v záujme chlapcov s DMD a ich rodín.

Existuje viac negatívnych klinických skúšok ako tých pozitívnych, teda žiaden z pacientov by teraz nemal prestávať alebo prerušovať momentálne dostupnú liečbu. Iba korektne navrhnuté a vykonané skúšky prinesú účinnú liečbu v primeranom čase. Za každú cenu sa musí zabrániť vzniku chýb. Chyby by totiž mohli posunúť celé výskumné snaženie späť a mohli by predĺžiť čas, počas ktorého musia chlapci čakať na rozhodujúcu a pozitívnu zmenu ich budúceho života.

Výsledky klinických skúšok musia byť presné a zmysluplné. Richard Finkel vo svojej druhej prezentácii vysvetlil, že aby boli tieto skúšky s chlapcami zodpovedne vyhodnotené a tiež aj pre porovnanie výsledkov s inými skúškami podobných alebo rovnakých liekov, musia sa vedci zhodnúť v tzv. *výstupných meraniach*. Príkladmi meraných medicínskych, genetických a biologických vlastností sú aktivita kreatín kinázy, prítomnosť a štruktúra dystrofinu, funkcie svalov ako sila, výdrž, respirácia, výkonnosť srdca a tiež niektoré aspekty kvality života u chlapcov. Merania by mali umožniť rozhodnúť, či sú výsledky štatisticky významné s p-hodnotou¹⁵ minimálne 0,05. Tento údaj znamená, že pravdepodobnosť, že výsledok sa objaví náhodne, je menej ako 5%.

Metódy by mali byť štandardizované a schopné rozhodnúť, či potenciálny vyšetřovaný liek spôsobuje zmeny v symptómoch ochorenia, ktoré sú medicínsky významné a zároveň pre toto ochorenie - DMD alebo BMD - špecifické. Mali by byť tiež bezpečné a jednoducho fungujúce, dostatočne citlivé na identifikovanie aj malých zmien a mali by byť pre pacientov, ich rodičov a regulačné orgány prijateľné. Teda, a to predovšetkým, musia jednoznačne preukázať, či by bola navrhovaná liečba v záujme dieťaťa, t.j. pokiaľ aj neposkytuje úplné vyliečenie, potom by minimálne mala spomaliť progresiu ochorenia.

Biotechnologické spoločnosti potrebujú kapitál. Jeremy Gelber z Morgan Stanley Investment Banking hovoril o finančnej stránke vývoja liekov pre vzácne ochorenia ako DMD. Priemerné peňažné výdavky pre vývoj lieku až po jeho schválenie sú okolo 300 miliónov dolárov, alebo investičné náklady sú viac ako 800 miliónov dolárov. Tieto peniaze musia priniesť investori, ktorí budú akceptovať riziko pochybenia, ale zároveň očakávajú profit, ak bude liek účinne ponúknutý na trhu. Investičné spoločnosti sú schopné zabezpečiť milióny dolárov, poznajú často novozaložené biotechnologické spoločnosti, poznajú

¹⁴ do slovenčiny sa toto spojenie prekladá aj ako klinický trial

¹⁵ **p-hodnota** - z angl. p-value, nazýva sa aj hladina významnosti získaného výsledku zo vzorky; je to pravdepodobnosť, že zistená závislosť, resp. rozdiel medzi premennými vo vzorke respondentov je čisto náhodná, a že v celej populácii, z ktorej bola vzorka vybraná, táto závislosť, resp. rozdiel neexistuje; čím je vyššia hladina významnosti, tým menej sa teda dá zistená závislosť získaná na výskumnej vzorke respondentov očakávať na celej populácii.

farmaceutické trhy a radia investorom, svojim zákazníkom, ohľadom rizika a možných benefitov. Títo špecialisti sú si vedomí, aké sú dôležité pozitívne výsledky skúšok. Preto musia byť skúšky navrhované a vykonávané veľmi opatrne, pretože chybná skúška má veľký vplyv na kurzy akcií a trhovú hodnotu spoločnosti. Negatívna skúška môže dokonca zničiť spoločnosť a teda spôsobiť oneskorenie vývoja lieku, na ktorý čakajú rodiny pacientov s DMD.

„Prosím, nechajte nášho syna podieľať sa na prvých klinických skúškach, sme pripravení urobiť hocičo a ísť hocikam, pretože potom by mal zrejme šancu na podstúpenie liečby“. Chodí mi mnoho e-mailov s touto zúfalou prosbou, niektoré dokonca zo vzdialených krajín. Nasledujúce odstavce sú odpoveďou na túto otázku.

Iba veľmi málo detí, menej ako 10, sa v Spojených štátoch, Holandsku a Veľkej Británii podieľa na prvých troch klinických skúškach vo fáze I, prebiehajúcich na chlapcoch s DMD. Pochádzajú zo susedstva klinických centier, pretože deti musia byť pravidelne kontrolované a musí byť u nich presne známa mutácia génu dystrofinu.

V týchto prvých skúškach je lokálne liečený iba jeden samostatný sval. Dokonca aj keď sú výsledky pozitívne, t.j. keď sa objaví nový dystrofin bez akýchkoľvek vážnych vedľajších účinkov a ak tento sval potom pracuje lepšie, potom aj napriek tejto pozitívnej zmene, *deti nemajú z týchto skúšok žiaden liečebný profit*. Ich svalová dystrofia nie je ani liečená ani spomaľovaná! Týmito prvými skúškami sa len skúša, či dve nové metódy (preskok exónu a mini génový transfer) skutočne pracujú aj v ľudských svaloch. Hľadá sa iba *dôkaz o fungovaní princípu*.

Vo všeobecnosti, iba ak sa toto vyskúša, môže byť skúšaný ďalší krok, ktorým je systémová aplikácia lieku. Potenciálne lieky - antisense oligoribonukleotidy, AONy alebo adeno-asociované vírusy s mini génmi - budú injektované do krvného obehu tak, že zasiahnu všetky svaly. Prvá systémová skúška sa začne pravdepodobne začiatkom roka 2008 v Holandsku a zúčastní sa jej aj niekoľko detí s DMD zo susedstva dotknutých klinických centier.

Z týchto dôvodov nemá pre rodičov zmysel cestovať s deťmi do skúšobných centier z veľkej diaľky, alebo dokonca z iných kontinentov, a žiť v ich blízkosti niekoľko mesiacov. To by bolo veľmi drahé a deti by to nevyliečilo. To najlepšie, čo môžu rodiny urobiť pre prístup k liečbe, akonáhle bude táto pripravená a schválená, je to, že sa stanú členom jednej z aktívnych organizácií, združujúcich pacientov so svalovými ochoreniami. Ďalej by mali mať pre svoje dieťa hotovú génovú analýzu a mať zaregistrovanú jeho presnú mutáciu a všetky ostatné lekárske informácie v niektorej databanke o pacientoch s DMD, ktoré teraz vznikajú. Potom budú môcť vedci kontaktovať rodiny tých detí, ktoré majú „*potrebnú*“ mutáciu, pretože v nasledujúcich rokoch bude realizovaných stále viac a viac klinických skúšok aj s chlapcami so vzácnymi ochoreniami a nezvyčajnými mutáciami dystrofinového génu. Rodiny by tiež mali študovať najaktuálnejšie výskumné správy, aby vedeli „čo sa deje“ a kedy a kde bude dostupný skutočne efektívny liek.

Preskok exónu a génová terapia.

Preskok exónu nie je vyliečenie. Technika *preskoku exónu* sa pokúša spomaliť rýchlu DMD na oveľa miernejšiu BMD. *Nenahradí samotný gén s mutáciou*, ale ovplyvní, ako bude poškodený gén prečítaný a spracovaný. Preskok exónu *nebude vyliečením DMD*, mal by iba znižovať závažnosť symptómov. Je iba terapiou.

Ak mutácia - odstránenie, duplikácia alebo bodová mutácia - naruší čítací rámec mRNA a spôsobí DMD, čítací rámec môže byť opäť *obnovený* pomocou odstránenia jedného alebo viacerých exónov z mRNA s použitím *AONov*. Sú to krátke kúsky RNA, ktorých postupnosti sú navrhnuté takým spôsobom, že sa viažu presne na komplementárne postupnosti pre-mRNA vo vnútri odstránených exónov alebo v ich okrajových oblastiach a *nikde inde*. Tieto AONy

teda narúšajú spájací mechanizmus a cieľový exón alebo exóny tak nie sú viac súčasťou mRNA. Sú *preskočené*.

Keďže táto preskočená mRNA je kratšia ako normálna, proteín dystrofín je tiež kratší. Obsahuje menej aminokyselín. Ak sú chýbajúce aminokyseliny súčasťou nedôležitých oblastí, ako je napr. rod domain, krátky proteín môže často plniť svoju stabilizujúcu úlohu v membráne svalových buniek. Výsledkom by mohla byť zmena vážnych symptómov DMD na oveľa miernejšie symptómy BMD.

Na prvé skúšky preskoku exónu sú používané dva druhy chemicky chránených AONov. Chránené musia byť preto, aby bola spomalená alebo zastavená ich deštrukcia vo svalových bunkách, ktorú spôsobujú enzýmy ničiace aminokyseliny. Dva spomínané typy AONov sú *2'-O-methyl-phosphorothioates* (nazývané tiež *2'-O-methyls*) a *morpholinos*. Kvôli ich nezvyčajnej štruktúre nie sú morpholinos skutočné nukleotidy¹⁶, teda použitie skratky AON nie je celkom korektné. Ale z praktických dôvodov používam v tejto správe označenie AON pre oba typy, rovnako ako sa to robí aj v iných vedeckých publikáciách.

Skúška preskoku exónu v Holandsku. Judith van Deutekomová, momentálne vedúca výskumu biotechnologickej spoločnosti Prosensa B. V. z Leidenu v Holandsku, sa nemohla tohto stretnutia vo Filadelfii zúčastniť, a preto prítomných o prvých skúškach techniky preskoku exónu na ľuďoch oboznámila Elizabeth Vroomová, prezidentka medzinárodnej organizácie United Parent Project Muscular Dystrophy (UPPMD). Tieto skúšky skončili na konci roka 2006.

Cieľom skúšky bolo zistiť, či je táto technika účinná aj priamo u pacientov s DMD. Bola to *lokálna štúdia* na malom priestore jediného svalu, a to svalu *tibialis anterior* na holennej kosti. Tento sval bol liečený AONom 2'-O-methyl pôsobiacim proti exónu 51. Skúška bola navrhnutá tak, aby len *poskytla dôkaz o fungovaní princípu*. Nebola teda vykonávaná s cieľom dosiahnutia akéhokoľvek liečebného benefitu pre liečených chlapcov.

Holandskí výskumníci vybrali takú verziu 2'-O-methylu, ktorá pôsobí „proti“ exónu 51, pretože s týmto typom chemicky stabilizovaného AONU majú rozsiahle skúsenosti. A to nielen pri úspešnom liečení svalových vlákien vo svalových kultúrach ale aj pri lokálnom a systematickom podávaní injekcií do jednotlivých svalov a krvného obehu živých zvierat. Exón 51 bol zasa ako prvý cieľ preskoku vybraný preto, lebo jeho úspešné preskočenie by umožnilo obnovu proteínového čítacieho rámca až pre 25% všetkých chlapcov s DMD s deléciou.

Keďže preskok exónu je nová liečebná procedúra, boli pred štartom tejto skúšky na každom chlapcovi vykonané rozsiahle klinické a molekulárne testy. Vzhľadom k tomu, že Holandský regulačný úrad nevydal súhlas na vykonanie svalovej biopsie pre začiatkom skúšky, urobila sa iba povrchová (podkožná) biopsia, z ktorej bola vypreparovaná bunková kultúra. V týchto laboratórnych procedúrach bola na úrovni mRNA potvrdená konkrétna delécia (predtým bola stanovená na úrovni DNA). Taktiež bola stanovená bazová postupnosť okrajových oblastí pred a za odstráneným exónom. Navyše bol kvôli uisteniu, či neobsahuje akékoľvek nepravidelnosti, preverený celý dystrofínový gén. Hoci už predtým bolo známe, že technika preskoku exónu funguje dobre na živých zvieratách a bunkových kultúrach, odobratých z chlapcov s DMD, celá procedúra preskoku exónu bola u každého pacienta zopakovaná na svalových bunkových kultúrach, získaných z povrchovej (podkožnej) biopsie. Robilo sa to s cieľom vylúčiť všetky riziká, aby tieto potom nemohli nastať aj na živom svale pri realizácii samotnej skúšky. Z ďalších bezpečnostných dôvodov boli chlapci liečení postupne, jeden po

¹⁶ **Nukleotid** - (alebo aj nukleozidfosfát) je základná stavebná jednotka nukleových kyselín a niektorých koenzýmov a niektoré plnia aj úlohu energetických prenášačov.

druhom. Tzn., že iba po získaní kladných výsledkov skúšky bez akýchkoľvek vedľajších účinkov na prvom chlapcovi, bol liečený druhý chlapec, a pod.

Výsledky skúšky, hoci sú veľmi povzbudivé, nemôžu byť na tomto mieste zosumarizované, pretože v čase písania tejto správy (koniec novembra 2007) ešte neboli uverejnené. Až po ich publikovaní budú súčasťou mojej ďalšej správy o výskume, dostupnej v prvej štvrtine roku 2008.

Holandskí vedci momentálne pripravujú ďalšiu skúšku, počas ktorej si dali za cieľ *systemové* podávanie 2'-O-methyl AONu (tzn. do celého tela) proti exónu 51 tak, aby zasiahol všetky svaly tela vrátane pľúc a srdca. Tieto štúdie budú krátkodobé (mesačné) a dlhodobé (šesť mesiacov). Budú pri nich použité rôzne množstvá AONov kvôli stanoveniu najefektívnejšej dávky, ktorá by snáď mohla významne spomaliť symptómy u chlapcov s DMD. Ako veľmi sa zlepši funkcia svalov bude tiež závisieť na aktuálnej výslednej funkčnosti proteínov podobných Beckerovmu proteínu, ktoré sa získajú po preskoku príslušných exónov.

Tiež budú prebiehať systematickejšie štúdie na myšiach, ktoré by mali preskúmať farmakodynamické správanie AONov, aby sa zistilo, čo presne sa s nimi stane vo vnútri svalových vlákien. V niektorých z týchto štúdií na zvieratách boli AONy vstreknuté pod kožu, pretože toto bude v budúcnosti zrejme jeden z najpraktickejších spôsobov podávania injekcií, pokiaľ bude potrebné ich opakované podávanie. V podobných štúdiách sa ukázalo, že *systemové* podávanie pracuje dobre, že dokonca môžu byť liečené aj srdcové svaly, a že neexistujú žiadne vážne vedľajšie účinky na pečeneňové enzýmy alebo iné krvné hodnoty.

Úplný vývoj preskoku exónu č. 51 je práve začiatkom výskumného programu spoločnosti Prosensa, ktorého cieľom je nájsť efektívnu liečbu DMD. Vývoj iných AONov na iné druhy delécií bude nasledovať zhruba potom. Okrem AONu 2'-O-methyl na preskok exónu 51, spoločnosť práve navrhuje a vyrába v dostatočne veľkých množstvách iné AONy pre preskok exónov 43, 44, 45, 46, 50, 52 a 53. Tieto AONy by mali spolu umožniť liečbu viac ako 65% všetkých pacientov s DMD s deléciou.

V budúcnosti by taktiež malo byť možné použiť túto techniku na obnovu čítacieho rámca pre niektoré duplikácie. Alebo keď bude potrebné preskočiť viac ako jeden exón. Napr. viacnásobný preskok 11 exónov 45 až 55 by dokázal vyprodukovať Beckerov dystrofín až u 63% pacientov s DMD s deléciami (ako napísal/a *C. Beroud a kol.* v *Human Mutation* 28: 196-202 (2007)). Súčasný stav liečby duplikácie bol popísaný autorom/autorkou *A. Aartsma-Rus a kol.* v *BMC Medical Genetics* 8:43-47 (2007). Prehľad o preskoku exónu bol publikovaný autormi *A. Aartsma-Rus a G.-J. B. van Ommen* v *RNA* 13:1-16 (2007).

Klinická skúška preskoku exónu v Spojenom Kráľovstve (United Kingdom - UK). Na stretnutí vo Filadelfii sa nediskutovalo o klinickej skúške preskoku exónu, ktorá je v UK vo fáze I (aj napriek oneskoreniam) a jej štart sa očakáva okolo začiatku roka 2008. Ale keďže táto skúška je taká dôležitá, zopakujem tu niektoré moje záverečné zhrnutia zo stretnutia PPUK z Londýna v roku 2006 s tým, že ich doplním o niektoré súčasné informácie:

Konzorcium MDEX vzniklo v januári 2005 v UK s cieľom vyvinúť techniku preskoku exónu a vykonať klinické štúdie. Členmi konzorcia sú *Francesco Muntoni, Kate Bushbyová, Volker Straub, Dominic Wells, Jenny Morganová, George Dickson, Ian Graham, Matthew Wood, Steve Wilton a Jenny Versnelová*. Taktiež sú zapojené UK Department of Health¹⁷, Medical

¹⁷ **UK Department of Health** - je úrad vlády Spojeného Kráľovstva, ale so zodpovednosťou za vládnu politiku v oblasti zdravia, sociálnej starostlivosti a National Health Service (NHS - systém zdravotnej starostlivosti financovaný z verejných peňazí) iba pre Anglicko samotné

Research Council¹⁸, PPUK (dnes Action Duchenne) a British Muscular Dystrophy Association spolu s Muscular Dystrophy Campaign.

Francesco Muntoni z Imperial College, ako predseda konzorcia MDEX, na stretnutí v Londýne v roku 2006 povedal, že v tejto skúške je cieľom pokúsiť sa preskočiť exón 51, pretože 20% chlapcov s DMD s mutáciou delécie exónov 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 51, 52-63 môže byť liečených preskočením tohto jediného exónu. Šesť rôznych oligov¹⁹, AONov, bolo testovaných na bežných ľudských svalových kultúrach, vo svalových kultúrach od pacientov s DMD, v celých svalových preparátoch (*Steve Wilton*) a v „poľudštených“ dystrofických myšiach, ktoré majú implantované svaly z pacientov s DMD (*Judith van Deutekomová*). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté s *morpholinom* (AONom) *H51A* vyvinutým v laboratóriu *Stevea Wiltona*. *Dominic Wells* mohol na experimentoch s mdx myšami ukázať, že tento AON (morpholino) bol dostatočne stabilný aj pre potreby dlhodobej liečby pacientov s DMD. Tento výsledok bol získaný v spolupráci štyroch laboratórií, dvoch britských, jedného holandského a jedného austrálskeho a bol publikovaný v septembri 2007 v *Human Gene Therapy*, 18:798-810. Ako bolo spomenuté predtým, morpholinos majú štruktúru chemicky odlišnú ale majú podobný tvar ako 2'O-methyls. Teda nie sú skutočnými nukleotidmi, ale aby som veci príliš nekomplikoval, budem ich aj naďalej nazývať AONmi.

AON morpholino, použitý v Británii, má dĺžku 30 jednotiek a zahŕňa celú postupnosť 2'O-methyllov, ktoré použili Holanďania, a ktoré majú len 20 jednotiek. Oba antisense²⁰ komponenty sa sami viažu na komplementárne postupnosti „zlepšovača spájania exónov“ (exonic splicing enhancer²¹, ESE) vo vnútri exónu 51 v dystrofinovej pre-mRNA a nikde inde. Táto blokáda ESE spomaľuje spájanie SR proteínov²², ktoré sú základnými komponentmi spojovacieho komplexu proteínov RNA. Dôsledkom je vylúčenie cieľového exónu z mRNA, tzn., že exón je preskočený. ESE postupnosti v rôznych génoch majú niektoré podobnosti, ale zároveň sú dostatočne odlišné. A to je dôvodom špecifik techniky preskoku exónu: preskočený je iba cieľový exón v cieľovom géne a žiadne iné exóny v tom istom alebo vo viac ako 20 000 ľudských génoch, pretože je štatisticky nepravdepodobné, že by v celom ľudskom genóme existovala iná kompletne komplementárna postupnosť s dĺžkou dvoch antisense štruktúr. Preto je nepravdepodobné, že by táto genetická technika spôsobovala nejaké vedľajšie genetické účinky.

Britskej skúšky sa zúčastnili tri skupiny chlapcov s DMD. Každá pozostávala z dvoch chlapcov vo veku 12 až 18 rokov. Pre každú skupinu boli použité tri rôzne dávky AONu morpholina - 0,09mg, 0,297mg a 0,9mg v 0,9ml roztoku, ktoré boli dávkované do svalového tkaniva v objeme 1cm³ deviatimi injekciami priamo do jedného z dvoch svalov *extensor digitorum brevis* na vonkajšej strane chodidla, používaných iba na ohýbanie prstov. Teda v prípade, že by sa mali vyskytnúť neakceptovateľné vedľajšie účinky, môžu byť bez vážnych následkov odstránené. Pred podaním injekcií a 30 dní po tom sa vykonali rozsiahle klinické kontroly vrátane biopsií, s cieľom zhodnotiť výsledky liečby.

¹⁸ **Medical Research Council** - organizácia založená za účelom podpory vyváženého rozvoja medicínskeho a súvisiaceho biologického výskumu v UK

¹⁹ **Oligonukleotid** (oligo) - krátky segment DNA alebo RNA, typicky pozostávajúci z dvadsiatich báz (alebo menej); v súčasnosti už môžu dosahovať dĺžku až do 200 bázových párov vďaka ich syntetizovaniu

²⁰ **antisense** - z angl., znamená to, že tento koniec molekuly aminokyseliny reaguje s komplementárnou molekulou a modifikuje tak tvorbu génu

²¹ **Exonic Splicing Enhancer** - postupnosť DNA pozostávajúca zo 6 báz vo vnútri exónu ktorý riadi, alebo zlepšuje presnosť spájania hnRNA (hetero-nuclear RNA, čo je neúplný jednoduchý reťazec mRNA, syntetizovaný pomocou transkripcie v bunkovom jadre z DNA) alebo pre-mRNA na mediátorovú RNA

²² **SR proteíny** - sú proteíny bohaté na Serín a Arginín (aminokyseliny), ktoré sa zúčastňujú na regulácii a výbere spájacích strán v mRNA.

Takisto ako v prípade Holandskej skúšky, tak aj Britská skúška bude iba poskytovať dôkaz o fungovaní princípu, že lokálne podávanie AONu morpholino do samostatného ľudského svalu je bezpečné, a že je efektívne pri obnove aspoň nejakého množstva dystrofinu. Dúfa sa, že minimálne v niektorej z rôznych vzoriek sa objaví dystrofin vo viac ako 10% svalových vlákien. Zúčastnení chlapci nebudú nijako profitovať z pohľadu zlepšenia svojho zdravotného stavu. Ale všetky výsledky týchto skúšok budú neskôr potrebné pre systematické podávanie potenciálnych nových liekov na DMD do krvného obehu tak, aby boli zasiahnuté všetky svaly.

Po meškani niekoľko mesiacov bolo v októbri 2007 udelené posledné nevyhnutné povolenie od UK regulačného úradu (viď poznámku 17), takže prví chlapci dostanú svoju prvú dávku injekcií AONov na začiatku roka 2008 po skončení všetkých predklinických príprav.

Janet Rose Christensenová je v spoločnosti AVI BioPharma Inc. v Portlande v Oregone (USA) viceprezidentkou pre získavanie potrebných úradných povolení a pre kvalitu. Vysvetlila úlohu jej spoločnosti v skúškach techniky preskoku exónu na pacientoch s DMD v UK. Pred mnohými rokmi vyvinula táto farmaceutická spoločnosť AONy morpholino ako genetické liečivo pre mnohé kardiovaskulárne, vírusové a pečňové ochorenia. Bolo už vykonaných 11 klinických skúšok so zlúčeninami tohto typu, na ktorých sa podieľalo vyše 300 účastníkov. Spoločnosť má teda s týmito „antisense“ liekmi rozsiahle odborné skúsenosti z chemického aj z lekárskeho hľadiska. V spolupráci so *Steveom Wiltonom* z Perthu z Austrálie boli identifikované postupnosti, ktorých cieľom je vyvolanie preskoku exónu v géne dystrofinu. Steve Wilton bude spolu s konzorciom MDEX aktívne zapojený do fázy I klinickej skúšky, ktorá je v UK tesne pred štartom.

Morpholino použitý v tejto skúške na preskočenie exónu 51, spoločnosťou nazývaný AVI-4658, je reťazec pozostávajúci z 30 subjednotiek. Výskumné štúdie ukázali, že efektívne vyvoláva preskok exónu 51. Viaže sa veľmi špecificky na vyselektovanú komplementárnu cieľovú postupnosť v strede exónu 51 použitím tvorby Watson-Crickových báзовých párov (Watson-Crick base pairing²³). Tento morpholino pozostáva z 1 144 atómov uhlíka, vodíka, dusíka, kyslíka a fosforu. Je syntetizovaný v AVI, a to v klinickom výrobnom priestore a vytrénovanými ľuďmi podľa zásad „dobrých výrobných postupov“ (Good Manufacturing Practise, GMP²⁴) na produkciu liečiv.

Skôr, ako bude môcť byť AVI-4658 použitý v skúške v UK, musí byť schválený vládnu agentúrou MHRA²⁵. *Janet Christensenová* potom popísala komplikovaný schvaľovací proces v USA. Pretože DMD je považovaná za „významne oslabujúcu a život ohrozujúcu chorobu“, očakáva sa, že bude aplikovaná tzv. „FDA regulations 21 CFR 312 Part E²⁶“, ktorá čiastočne hovorí „... je vhodné uplatniť širšiu flexibilitu pri aplikácii zákonných štandardov, pokiaľ budú dodržané primerané záruky v otázkach bezpečnosti a efektívnosti. Tieto procedúry reflektujú poznanie, že lekári a pacienti sú vo všeobecnosti ochotní akceptovať väčšie riziko alebo vedľajšie účinky produktov, ktoré liečia život ohrozujúce a výrazne oslabujúce ochorenia, než by akceptovali pri produkte, ktorý lieči aj menej vážne choroby.“

²³ **Watson-Crick base pairing** - je základné párovanie báz v DNA (adenín sa viaže s tymidínom a guanín s cytozínom) a RNA (to isté, len tymidín je nahradený uracilom).

²⁴ **GMP** - je to pojem, ktorý vo svete všeobecne pomenúva kontrolu a riadenie výroby a kvality testovania potravín a farmaceutických produktov

²⁵ **MHRA - Medicines and Healthcare products Regulatory Agency** - je to vládna agentúra v UK, ktorá je zodpovedná za zaistenie bezpečnosti a účinnosti liečiv a lekárskeho zariadení

²⁶ Je to jedna zo smerníc **U.S. Food and Drug Administration (FDA)**; čo je vládna agentúra pre zdravie a služby ľuďom v Spojených Štátoch a je zodpovedná za bezpečné riadenie väčšiny druhov jedla, dietnych doplnkov, liekov, vakcín, biologických medicínskych produktov, krvných produktov, lekárskeho zariadení, zariadení emitujúcich rádiáciu, veterinárnych produktov a kozmetiky

Janet Christensenová ukončila svoju prezentáciu slovami „Tieto pravidlá oprávňujú FDA (viď poznámku 26) pozerat' trocha inak na žiadosti pre liečbu DMD, ako by pozerali napr. na lieky na bolesti hlavy. Teraz je dôležité podstúpiť prvé klinické skúšky s týmto morpholinom a úspešne ich ukončiť. Veríme, že to otvorí cestu k rýchlejšiemu schvaľovaciemu procesu pre mnoho ďalších morpholinov potrebných na liečbu všetkých chlapcov, ktorých ochorenie môže byť liečené touto technikou preskoku exónu.“

Prvé kroky smerom k „multipreskoku“ exónu. Terence Partridge z Children's National Medical Center vo Washington hovoril o niektorých otvorených otázkach pri preskoku exónu a ďalej o novej výskumnej práci jeho a jeho kolegov, ktorá pojednáva o preskoku dvoch exónov v dystrofických psoch, a ktorá by mohla otvoriť cestu multiexónovému preskoku. Zároveň by mohla preniesť túto novú techniku aj na chlapcov s DMD, pretože niektorí potrebujú preskočiť viac ako jeden exón na obnovu posunutého dystrofinového čítacieho rámca.

Technika preskoku exónu pracuje v mdx myšiach dobre. Používajú sa AONy 2'O-methyl a morpholino proti exónu 23. Vstreknú sa opakovane do krvného obehu myši, kde produkujú nový dystrofin v niektorých svaloch až do 50% jeho bežnej úrovne. Morpholinos však nezasahujú srdcové svaly a dôvod, prečo je tomu tak, nie je známy. Dominic Wells z Imperial College v Londýne na stretnutí PPUK v roku 2006 informoval o prvých experimentoch, ktoré ukázali, že morpholinos dokážu preniknúť aj do srdcových svalov pri liečbe ultrazvukom. Dr. Partridge a jeho kolegovia taktiež pracujú na tomto probléme.

Hoci mdx myši nemajú vo svojich svaloch žiaden dystrofin, ich symptómy svalovej dystrofie sú veľmi mierne a preto nie sú ideálnym zvieracím modelom ľudskej DMD. A pretože sa dožívajú iba niečo okolo dvoch rokov, dlhodobé experimenty, trvajúce niekoľko rokov, nemôžu byť na nich vykonávané. Psy však žijú oveľa dlhšie ako myši a dystrofické GRMD zlaté retrievery sú fyzicky postihnuté, teda experimenty s týmito psami by mohli poskytnúť výsledky, ktoré by boli skôr podobné tým, čo bude neskôr viditeľné v klinických štúdiách pacientov s DMD.

Experimenty na GRMD psoch majú aj inú výhodu. Dve klinické skúšky techniky preskoku exónu 51 na chlapcoch s DMD, v Holandsku a v UK, ukázali a ešte aj ukážu, že táto technika na pacientoch skutočne pracuje. V týchto skúškach bol preskočený iba jeden exón. Ale okolo 50% všetkých Duchenových dystrofií, spôsobených mutáciami odstránenie, duplikácia a bodová mutácia, ktoré sú uvedené v Leidenskej databáze pacientov s DMD, bude potrebovať preskočiť dva alebo tri exóny na obnovenie čítacieho rámca. A multipreskok exónu by mohol byť vhodnou liečbou pre vcelku rozsiahlu skupinu pacientov. Napr., preskok 11 exónov 45 až 55 by dokázal vyprodukovať BMD s veľmi miernymi symptómami až u 63% chlapcov s DMD s mutáciou delécia. A pretože dystrofické psy potrebujú preskočiť dva exóny, experimenty s nimi by mohli otvoriť cestu pre liečbu chlapcov s DMD so zložitejšími formami mutácií.

Dystrofické psy majú mutáciu na spájacej strane exónu 7 v dystrofinovom géne, ktorá spôsobuje odstránenie tohto exónu v mRNA a rýchlo potom posúva čítací rámec aj s predčasným stop kodónom. Preskočenie príľahlých dvoch exónov 6 a 8 by čítací rámec obnovilo.

Rôzne dávky kokteilu troch AONov morpholino, dve proti exónu 6 a jedna proti exónu 8, boli mladým GRMD psom injektované lokálne do svalu tibialis-anterior. Dva týždne po podaní injekcie bola vykonaná svalová biopsia, ktorá ukázala, že vo všetkých svaloch okolo injektovaného miesta sa objavil nový dystrofin a svalová štruktúra vyzerala väčšinou normálne.

Dr. Partridge a jeho spolupracovníci nedávno spolupracovali s Shin'ichi Takeda z General Animal Research Facility v Tokiu, kde boli schopní vykonať systematické podávanie injekcií

do krvného obehu psov s veľmi sľubnými výsledkami. Keďže detaily o týchto experimentoch ešte neboli nikde publikované, nemôžu byť na tomto mieste zosumarizované.

Vykonanie preskoku exónu s morpholinos má niekoľko výhod.

- 1.) Zasahujú svaly celého tela, stále však s výnimkou srdca
- 2.) Sú vysoko efektívne
- 3.) Nezdajú sa byť toxické
- 4.) Nie sú v tele metabolizované, t.j. degradované, ale sú vylučované v moči
- 5.) Majú len krátkodobý účinok, teda bude nevyhnutné opakované liečenie. To ale znamená, že by táto liečba mohla byť v prípade, že by sa stala dostupná iná liečba, bezpečne ukončená.
- 6.) Nevytvárajú imunologické problémy, pretože neobsahujú cudzie proteíny a nový proteín dystrofín je produkovaný iba vo vnútri svalov.

AONy morpholinos pracujú dobre u veľkých cicavcov so štruktúrou tela pomerne podobnou tej ľudskej. To však nie je zárukou toho, že tieto potenciálne lieky budú pracovať takto dobre a účinne počas dlhšieho času aj u chlapcov s DMD. Väčšina práce v minulých rokoch bola vykonávaná s AONmi morpholino a 2'-O-methyl. Budúca a konečná liečba by mohla potrebovať mix oboch typov AONov na optimalizovanie účinku preskočenia a na minimalizovanie toxicity. A stále by sa mohli vyskytnúť neznáme problémy, ktoré by možno musel riešiť iný koktejl AONov alebo dokonca iný typ AONov.

Ale kedy budú existovať lieky na preskok exónu pre chlapcov s DMD? Opýtal som sa túto otázku **Gertjan van Ommen** v Leidene počas interview v januári 2004. Jeho pomerne dlhá odpoveď, tu skrátená do siedmich slov, bola: „budú dostupné počas 10 rokov“. Celé toto interview je uvedené v mojej správe *2004-1 Monaco* na www.duchenne-research.com. Tých desať rokov nebolo myslené ako vedecky presný časový interval. Bol to iba odhad vynikajúceho vedca pracujúceho na tejto novej technike, ktorý poznal pomerne dobre, ktoré pomalé výskumné kroky boli ešte potrebné, a že existuje mnoho vecí, ktoré sa môžu pokaziť. Teraz, na konci roka 2007, by ste mohli povedať, že zostáva niečo menej ako 6 rokov z pôvodných 10, ak vezmete týchto desať rokov ako nominálnu hodnotu. Ale nie je prípustné, aby ste to urobili! Počet zostávajúcich rokov môže byť 8, 9 a dokonca znova 10. Alebo ak všetko pôjde dobre, tak možno menej ako 4 či 3 roky.

A bolo mi povedané, že by sa nemali robiť akékoľvek časové odhady, pretože vy, rodičia, by ste mohli túto informáciu vziať doslovne a začali by ste odpočítavať zostávajúce mesiace a dni. Na druhej strane viem, že tí, ktorí majú predstavu, ako pracuje svet života a vedy predovšetkým, porozumiete tejto situácii a oceníte nasledujúce vyhlásenie, ktoré som obdržal od **Francesca Muntoniho**, ktorý ho napísal po konzultácii s kolegom van Ommenom:

„Úplne súhlasím, že je dôležité poskytovať realistické informácie, a že je realistické predpokladať, že počas nasledujúcich šiestich rokov vedecká komunita, potom, ako sa jej podarilo preskočiť exón 51, skompletizuje systematickejšie skúšky s AONmi, ktoré preskočia niekoľko ďalších exónov. Je dôležité si uvedomiť, že cestička experimentov smerom k liečbe nikdy nekončí. Napr. existujú stále nové antibiotiká, ktoré sa neustále vyvíjajú. Nemyslím si, že budeme musieť čakať šesť rokov na to, aby sme videli prvé potenciálne benefity. Ale rovnako som si dosť istý, že typ AONov a spôsob ich podávania, ktorý používame dnes, bude do tej doby považovaný za zastaralý. Je preto pravdepodobné, že počas nasledujúcich šiestich rokov budeme svedkami vývoja efektívnej a spoľahlivej metódy pre opakované podávanie niekoľkých AONov a snád to povedie k významnej a pozitívnej klinickej odpovedi. Súčasne je tiež veľmi pravdepodobné, že vedecká komunita bude študovať ešte lepšie chemické štruktúry a metódy podávania a neboli by sme prekvapení, ak počas ďalších šiestich rokov budú uvedené ďalšie klinické štúdie na otestovanie nových a vylepšených AONov.“

Čo chcem ale povedať je to, že ide o širokú cestu, teda nie je to jednoduchý cieľ, ale uvedené okolnosti sa hýbu dopredu. A bude to veľmi rušná cesta správnym smerom. Niekedy sa veci dejú rýchlejšie, ako očakávame. Tieto výbuchy geniality niektorých vedcov, ktoré to spôsobujú, sú vždy veľmi vítané, ale absolútne nepredvídateľné. Očakávame, že sa budeme ešte veľa učiť zo skorších skúšok s AONmi a to, čo sa naučíme, bude pozitívne vplyvať na podávanie, rozšírenie a účinnosť a významne to zníži čas čakania pre všetkých tých, ktorí nás sledujú a dúfajú.

Transfer génu dystrofinu, prvé klinické skúšky s vírusovým nosičom. Nasledujúci popis je založený na sumároč informácií z prezentácií **Scotta McPheeho** zo spoločnosti *Asklepios Biopharmaceuticals* a **Xiao Xiao** z University of North Carolina (obe sa nachádzajú v Chapel Hill NC) uverejnených v mojich predošlých správach zo stretnutí v Cincinnati a Londýne. Skoršie informácie sú aktualizované novými údajmi, ktoré odzneli na stretnutí vo Filadelfii od **Christophera Shillinga** z Center for Muscle Gene Therapy pri Children's Research Institute v Columbase v štáte Ohio, kde sa skúšky konali.

Prenos modifikovaného génu dystrofinu pomocou *vírusového nosiča*, génového transportéra, do svalových buniek, je jednou zo stratégií pri liečbe DMD. Použitie AAV ako nosičov, má niekoľko dôležitých výhod. Vo svaloch a v srdci sú vysoko efektívne a pravdepodobne môžu byť použité pri liečbe všetkých pacientov s DMD bez ohľadu na ich mutáciu. Predklinické štúdie, zamerané na overenie fungovania študovaného princípu na dystrofických myšiach a psoch, majú pomôcť pri vývoji minidystrofinového génového nosiča pre prvú klinickú skúšku tejto novej génovej liečebnej metódy. Použitý nosič je AAV sérotypu 2.5, tzv. *BiostraphinTM* (biodystrofin), biologická nanočastica vyvinutá spoločnosťou Asklepius. Tieto vírusy sa nemôžu v bunkách, ktoré infikujú, rozmnožovať, pretože väčšina z ich génov bola odstránená. Táto modifikácia vytvorila priestor pre transfer kódovacích postupností liečivých génov.

Avšak AAV nosiče sú v podstate malé, dokážu akceptovať len cudzí genetický materiál, ktorý nie je dlhší ako 5 000 bázových párov. Z tohto dôvodu, musela byť cDNA normálneho dystrofinu (kombinácia 79 exónov bez intrónov, ktorá je dlhá okolo 14 000 bázových párov) podstatne skrátená, aby zapadla do tohto malého nosiča. Prenos takéhoto *minigénu cDNA* by teda neliečil DMD ale mohol by ju namiesto toho transformovať na oveľa menej progresívnu formu BMD.

Preto vektory použité pri prvej skúške nesú konštrukciu génu minidystrofinu delta-3990 s odstránenými časťami exónu 17 a odstránenými všetkými exónmi od 18 do 59 a od 70 do 79. To znamená, že očakávaný Beckerov dystrofin bude oproti normálnemu dystrofinu dlhý asi okolo jednej tretiny. V roku 1990 bol diagnostikovaný 61 ročný pacient s BMD, ktorý bol ešte schopný chôdze, a ktorý mal vo svojich svaloch práve tento typ skráteného dystrofinu.

Táto fáza Ia klinickej skúšky génovej liečby je momentálne vykonávaná pod dohľadom *Dr. Jerryho Mendella* na Children's Hospital Of the School of Medicine v Ohio State University in Columbus. Skúška bola povolená FDA na základe bezpečnostných a toxikologických testov AAV nosičov na laboratórnych zvieratách. Začala sa 28 marca 2006, kedy prvý chlapec dostal prvú dávku biodystrofinu injekciami do troch miest bicepsového svalu jednej ruky, vzdialených od seba 0,5 cm, zatiaľ čo do bicepsu druhej ruky mu bol vstreknutý iba fyziologický roztok. Skúška je vykonávaná „dvojnásobne naslepo“, t.j., ani pacient ani lekári či vedci netušia až do konca celej skúšky, do ktorého bicepsu boli vstreknuté AAV nosiče.

Pre chlapcov sa neočakáva žiaden benefit z liečenia počas tejto prvej skúšky, ktorej hlavným cieľom je poskytnúť iba dôkaz o fungovaní princípu tohto typu génovej liečby nielen v kostrových svaloch myši a psov, ale rovnako aj v ľudských svaloch. Ďalšími cieľmi bolo zozbierať bezpečnostné údaje, stanoviť požadované dávky na docielenie produkcie

minidystrofinu vo svaloch. Ďalej sa malo ukázať, či existujú nejaké imunologické reakcie na minidystrofin alebo na nosiče.

Skúšky sa zúčastnilo šesť chlapcov s DMD, ktorí mali minimálne päť rokov, a ktorých mutácia génu dystrofinu bola dokonale známa. Všetci šiesti dostali svoje injekcie. Boli použité dve rôzne dávky pre každú skupinu troch pacientov. Vzorky svalového tkaniva z miesta vpichu boli získané svalovou biopsiou od štyroch chlapcov po štyroch týždňoch a od dvoch chlapcov po dvanástich týždňoch od podania injekcie.

Neboli pozorované vedľajšie účinky súvisiace s touto génovou liečbou, čo naznačuje, že táto procedúra je telom tolerovaná. Kvôli povahe tohto typu skúšok „dvakrát naslepo“, boli vzorky svalov zo svalovej biopsie až do konca celej skúšky zmrazené. Po skončení skúšky boli preskúšané na prítomnosť nového skráteného dystrofinu. Výsledky týchto analýz budú dostupné na konci roka 2007.

Momentálne sa pripravuje na psoch a opiciach nasledujúca fáza skúšky, tzv. premost'ovacia, alebo fáza Ib. Už by mal byť dosiahnutý povzbudivý prenos génu a získanie výsledkov. „Premost'ovacia“ štúdia s chlapcami s DMD bude, dúfajme, vykonaná v rokoch 2008 a 2009. V tejto skúške dostane celá končatina infúziu nosičov prostredníctvom dočasne blokováného krvného obehu. Toto „regionálne“ doručovanie môže potenciálne ponúknuť nejaké vylepšenia v kvalite života účastníkov. Napokon, fázy skúšky II a III so systematickým podávaním do celého tela je plánované na prelom rokov 2009/2010 už s väčším počtom pacientov.

Prenos génov pericytmi²⁷, dospelými svalovými kmeňovými bunkami. Giulio Cossu zo Stem Cell Institute pri Hospital San Raffaele v Miláne, popísal veľmi sľubnú prácu jeho pracovného tímu, smerujúcu k liečbe DMD pomocou kmeňových buniek.

Pre efektívnu liečbu DMD pomocou kmeňových buniek je potrebný bezpečný a eticky akceptovateľný zdroj veľkého množstva dospelých svalových kmeňových buniek, ktorý by umožnil vznik predovšetkým svalových buniek a nie neželaných buniek, akými sú napríklad nádory. A malo by byť možné aplikovať tieto bunky systematicky ich vstrekaním do krvného obehu, ktorý by ich distribuoval do celého tela. Potom musia prejsť cez steny ciev a svalových buniek a zotrvať vo vnútri vlákien bez tvorby akýchkoľvek lokálnych problémov. Zdá sa, že tieto podmienky spĺňajú *mesoangioblasty*²⁸ (z angl. „mesoangioblast“), čo sú dospelé kmeňové bunky, nachádzajúce sa na vonkajšej strane veľkých krvných ciev vo vnútri svalového tkaniva. Z tohto miesta môžu byť aj účinne izolované.

Talianski vedci použili na svoje prvé testy na zvieratách myši s pletencovou svalovou dystrofiou (z angl. „limbgirdle muscular dystrophy“), ktorým chýbal jeden z proteínov dystrofin-proteínového komplexu. Po injekcii mesoangioblastu z normálnych zdravých myší, boli tieto „zdravé“ kmeňové bunky schopné spôsobiť vo všetkých kostrových svaloch dystrofických myší opätovný vznik viac ako 80% bežného počtu chýbajúceho proteínu, alfa-sarkoglykán²⁹.

²⁷ **Pericyt** - je bunka podobná mezenchymálnej kmeňovej bunke, spojená so stenami malých krvných ciev. Ako relatívne nerozlíšená bunka slúži na podporu týchto ciev, ale môžu byť odlišné vo fibroblaste, hladkých svalových bunkách alebo aj v makrofágoch, ak je to požadované.

²⁸ **Mesoangioblast** - mezenchymová bunka, súvisiaca so stenami veľkých ciev. Vykazuje mnoho podobností s pericytmi, ktoré sa nachádzajú v stenách malých ciev. Sú to relatívne nediferencované bunky, ktoré majú potenciál spomaliť endoteliálne a mezodermálne dedenie.

²⁹ **Alfa-sarkoglykán** - z angl. „alpha-sarcoglycan“; rodina piatich transmembránových proteínov (α , β , γ , δ alebo ϵ) zapojených v proteínovom komplexe, ktoré sú zodpovedné za pripojenie cytoskeletonu svalového vlákna na mimobunkovú maticu, čím sa zabraňuje poškodeniu sarcolemmy svalového vlákna rôznymi silami, namáhajúcimi toto vlákno strihom. Mutácie v génoch α , β , γ alebo δ (nie ϵ), ktoré kódujú tieto proteíny, môžu viesť ku vzniku pletencovej muskulárnej dystrofie

Pre možnú liečbu touto novou technikou musí byť pomocou laboratórneho procesu s vírusovým nosičom prenesený do mesoangioblastov pacienta neporušený gén pre tvorbu dystrofinu zo svalového tkaniva zdravého darcu. Potom by sa mohli namnožiť niektoré prenesené bunky, ktoré obsahujú normálny gén dystrofin a nakoniec by sa mohli reinjektovať do krvného obehu pacienta. Takéto autológne³⁰ liečenie by malo zabrániť imunologickým problémom. Alternatívne môžu byť použité mesoangioblasty od zdravých príbuzných pacienta s normálnym génom dystrofinom. Ale tento typ heterológnej³¹ liečby by si vyžadoval ešte dlhodobjšie potlačenie imunity pacienta.

Mesoangioblasty použité v týchto experimentoch, boli izolované z krvných ciev myši a psov. Ale na vykonanie nasledujúceho kroku smerom k vývoju liečebnej metódy pre pacientov s DMD, musia byť takéto kmeňové bunky získané z ľudského zdroja a použité na experimentoch so zvieratami. Dr. Cossu a jeho kolegovia tak skutočne počas posledných mesiacov urobili a publikovali svoje nové výsledky vo februári 2007 v Nature Biology 2007:9, 255-267.

Vedci preto hľadajú podobné kmeňové bunky v stenách drobných krvných ciev v ľudskom svalovom tkanive, ktoré bolo na diagnostické účely získané biopsiami. Takéto kmeňové bunky tam aj našli, avšak ich vlastnosti sa trocha odlišovali od mesoangioblastov. Preto boli tieto bunky nazvané „pericyte-derived“ bunky (z angl.) alebo skrátené *pericyty*. Ich vlastnosti boli presne také, aké by mali mať kmeňové bunky použité pre liečbu DMD, konkrétne:

- 1.) Dajú sa ľahko izolovať z ľudského biologického materiálu ako je svalové tkanivo
- 2.) Môžu byť v laboratóriu rozmnožené do množstva nevyhnutného pre systematickú liečbu detí
- 3.) Je možné preniesť do nich „zdravé“ sekvencie génu dystrofinu pomocou vírových nosičov
- 4.) Sú schopné migrovať z krvného obehu do svalov
- 5.) Vytvárajú sa na funkčné svalové bunky vo vnútri živého svalového tkaniva.

Najrozhodujúcejšie výsledky boli dosiahnuté na pokusoch s mdx myšami, ktoré okrem toho, že nemali dystrofin, mali genetickou manipuláciou potlačený svoj imunitný systém. Jeden mesiac po troch systematických injekciách normálneho, t.j. nedystrofického pericytu do artérie v nohe piatich z týchto myši, sa v každom vyšetřovanom priereze objavilo od 200 do 450 nových svalových vlákien obsahujúcich dystrofin. Keď bol ľudský pericyt od pacientov s DMD so zmutovaným génom dystrofinom prvýkrát liečený pomocou vírových nosičov obsahujúcich gény minidystrofinu (nosiče boli vstreknuté podobným spôsobom ako pri myšiach), tak vo vyšetřovaných svaloch sa našlo od 190 do 320 nových svalových vlákien s minidystrofinom. Zistilo sa, že funkčnosť svalov liečených myši sa výrazne zlepšila.

Preto ako ďalší krok k aplikácii tohto postupu na ľuďoch, izoloval tím Dr. Cossua mesoangioblasty z normálnych a z dystrofických psov, rozmnožil ich v bunkovej kultúre a vstrekol ich do artérie zadných nôh dystrofických psov. Tieto psie kmeňové bunky neboli dostatočne detailne charakterizované, preto nebolo známe, či ich vlastnosti skutočne korešpondujú s ľudským pericytom. Z tohto dôvodu boli opäť nazvané mesoangioblasty.

Štyri psy boli liečené počas piatich mesiacov systematickým podávaním injekcií autológnych buniek, izolovaných z každého liečeného psa, do ktorých bol v laboratóriu prenesený pomocou vírového nosiča gén cDNA, ľudský *mikrodystrofin*. V tomto prípade nebolo nevyhnutné potlačenie imunity. Ale oproti očakávaniam nebola liečba úspešná. Dôvodom zlyhania môže byť to, že malá dĺžka dystrofinu, produkovaného po prenose mikrodystrofinu, bola nedostatočná na zachovanie funkčnosti svalov u tak veľkého zvierat'a, akým je pes.

³⁰ **Autológný** - prirodzene sa vyskytujúci v určitom tkanive alebo orgáne v tele

³¹ **Heterológný** - odlišný, cudzorodý

Pri heterológnej liečbe dostalo šesť iných psov podobné injekcie s darcovskými kmeňovými bunkami od zdravých psov, avšak pri potlačení ich imunity pomocou cyklosporínu³². V tomto prípade sa získalo rozsiahle množstvo dystrofinu a zlepšenie funkčnosti svalov. Pri jednom zvierati boli bunky uvoľnené z katétra priamo do aorty. To umožnilo väčšie rozšírenie buniek. Výsledky dodania kmeňových buniek boli dramatické. Posledné zmieňované zviera vykázalo zlepšenie svojej dystrofie a päť mesiacov po poslednej injekcii bolo schopné chôdze. Ostatné zvieratá získali späť svoje schopnosti na nižšej úrovni.

Výskumníci plánujú zopakovať experimenty s autológnyimi bunkami s tým, že namiesto kratších mikrogénov sa prenesie minidystrofin. Možno bude použitá aj metóda genetického preskoku exónu, ktorú vyvinul *Luis García* vo Francúzsku.

Dr. Cossu ukončil svoju prezentáciu konštatovaním: „Momentálne zamýšľame robiť klinické skúšky s chlapcami s DMD. Ale najprv musíme vykonať dlhodobé štúdie so psami, musíme urobiť toxikologické testy a pripraviť ľudské bunky v kvalitných lekárskech podmienkach. Táto práca už začala a bude trvať ďalší rok. V skúške dostanú traja pacienti injekcie lokálne do jedného svalu, aby sa ukázalo, či ľudské kmeňové bunky skutočne tvoria ľudský dystrofin v ľudských svaloch. Podľa toho dostanú traja ďalší pacienti systematicky injekcie darcovských buniek spolu s liekmi na zabránenie odmietnutia cudzích buniek ich imunitným systémom.

Prvým a najdôležitejším výstupným kritériom bude bezpečnosť z dlhodobého hľadiska. My už vieme, že myšiam ani psom sa nič nestalo, ale nevieme, čo sa stane chlapcom, keď ich budeme v týchto klinických skúškach skutočne liečiť. Druhou výstupnou podmienkou bude to, že sa ukáže, či sa zachovala sila svalov, resp. či vzrástla. Vyvinuli sme novú metódu na meranie sily jedného jediného svalového vlákna. A, samozrejme, budeme sa držať všetkých odporúčaní TREAT-NMD.

Táto liečba kmeňovými bunkami je ešte len vo svojich skorých začiatkoch. Nevieme, ako bude efektívna a aké bude mať riziká. Koniec koncov, do tela chlapcov budeme injikovať veľké množstvá buniek a tam by mohli vzniknúť vážne problémy. Celý proces je komplikovaný, bude trvať niekoľko rokov a bude stáť mnoho peňazí. Ale má veľký, vzrušujúci potenciál. Budeme ho skúšať na deťoch, pretože to môže viesť ku skutočnej liečbe.“

Farmakologické prístupy.

Zvýšenie regulácie utrofinu³³ pre nahradenie dystrofinu. Existujú štyri veľké výzvy, ktoré musí splniť každý, kto sa pokúša nájsť účinnú liečbu na DMD.

- 1.) Musí byť obnovená funkcia veľkého množstva proteínu dystrofinu, ktorý chlapcom s DMD chýba
- 2.) Lepšie povedané, musí sa znova objaviť minimálne 20% bežného množstva dystrofinu, alebo ak to nebude tento proteín, potom to musí byť nejaký iný proteín podobný *utrofinu*, ktorý dokáže proteín dystrofin nahradiť
- 3.) Musí sa to stať vo všetkých kostrových a pľúcnych svaloch, rovnako ako aj v srdci
- 4.) Musí sa zabrániť akejkoľvek imunitnej reakcii voči týmto novým proteínom.

Keď **Kay Daviesová**, momentálne z University of Oxford, skúšala pred viac ako 20 rokmi nájsť gén dystrofin, našla miesto toho proteínu *utrofin* a jeho gén. Utrofin je proteín so štruktúrou a funkciou veľmi podobnou dystrofinu. Ľudia ho majú umiestnený na chromozóme 6, má 75 exónov a je dlhý okolo jedného milióna bázových párov. Podobne ako dystrofin,

³² **Cyklosporín** - imunosupresívum

³³ **Utrofin (UTRN)** - je ľudský gén, proteín zakódovaný týmto génom je súčasťou cytoskeletu

obsahuje F-aktínovú³⁴ (z angl. „F-actin“) štruktúru buniek s proteínovým komplexom v membránach, ktorý je podobný dystrofin-proteínovému komplexu. Utrofín je prítomný v mnohých tkanivách v ľudskom tele, teda aj v ľudských svaloch, ale tu je koncentrovaný v regiónoch, kde sa motorické nervy spájajú so svalovými membránami, v *nervovosvalových spojeniach*.

Pri pacientoch s DMD sa utrofín začína šíriť z nervovosvalových spojení do svalových membrán. Čím viac má pacient utrofínu, o to neskôr je odkázaný na invalidný vozík. To znamená, že väčšie množstvo utrofínu pomocou *zvýšenia regulácie jeho génu*³⁵ by dokázalo zmierniť DMD. V dvanástich týždňoch počas vývoja plodu obsahujú svaly aj utrofín aj dystrofin. Potom sa utrofín zo svalových membrán postupne vytráca a po narodení obsahujú membrány už iba samotný dystrofin. Teda utrofín je fetálna forma dystrofínu. To znamená, že reaktivácia vývojového programu utrofínu by mohla viesť k liečbe DMD.

Mdx myši, ktorých gén utrofín bol experimentálne vyradený, a ktoré nemali vo svaloch ani utrofín ani dystrofin, mali symptómy podobné DMD a zomierali skôr v porovnaní s „normálnymi“ mdx myšami, ktorých svaly vykazovali oveľa miernejšie poruchy aj napriek chýbajúcemu dystrofínu.

V iných experimentoch s transgénymi, t.j. geneticky upravenými (z angl. „transgenic“) mdx myšami, ktoré mali vo svojej zárodočnej línii utrofínové minigény (zavedené pomocou techniky, ktorá nemôže byť realizovaná na ľuďoch), sa ukázalo, že pokiaľ je utrofín prítomný vo väčších množstvách, dokáže nahradiť dystrofin. Nárastom utrofínu činiteľom od troch do štyroch, mohlo byť u týchto myší zabránené vzniku už vcelku ľahkých dystrofických symptómov.

Pre získanie novej liečby DMD by teda bolo možné vyskúšať zvýšiť množstvo utrofínu *zvýšením regulácie* aktivity jeho génu. Gén má dve rôzne štartovacie miesta, štartovacie (zakladateľské) postupnosti, ku ktorým sa viažu signálne zlúčeniny s cieľom začať syntézu proteínu. Jeden promotór vyvoláva tvorbu silnejšej z dvoch foriem utrofínu (*A-utrofín*), ktorá je potom výnimočne umiestnená vo vlastne malom množstve nervovosvalových spojení všetkých svalových buniek. Vedci potom začali s ovplyvňovaním tohto signalizačného procesu tak, že sa vyrobí viac A-utrofínu a doručí sa do membrán svalových buniek, kde by u pacientov s DMD mohol potenciálne obsadiť uvoľnené miesto po dystrofíne. Veľmi zavčasu sa však zistilo, že nájdenie substancie, ktorá by mohla zvýšiť reguláciu utrofínu a následne aj jej vývoj ako potenciálneho lieku na efektívnu liečbu DMD, by bol komplikovanou a drahou úlohou, ktorá by nemohla byť realizovaná v univerzitnom laboratóriu. Takže sa *Dr. Daviesová* stala spoluzakladateľkou spoločnosti *Summit plc* (pôvodne *VASTox plc*) so sídlom v Abingdone blízko Oxfordu.

V tejto spoločnosti bude ku koncu roka 2007 skúmaných cez 30 000 chemických zlúčenín kvôli ich schopnosti zvýšiť reguláciu génu utrofínu v kultúrach tkanív z mdx myši. Enzým luciferáza zo svätobjánskych mušiek, ktorý je zodpovedný za tvorbu ich svetielka, sa používa v novo vyvinutom reagentnom systéme na testovanie prítomnosti utrofínu. Ku koncu júla 2007 sa podarilo nájsť 31 sľubných substancií, ktoré by mohli niekoľkokrát zvýšiť obsah luciferázy. Teraz sú optimalizované a testované na živých mdx myšiach s cieľom zvýšiť ich ďalšiu účinnosť a zaistiť, že vo všetkých svaloch zvierat'a je dostatočne vysoká regulácia utrofínu. Prebiehajú dodatočné testy s dystrofickými akváriovými rybkami (Dánio pruhované, *Danio rerio* alebo „zebrička“), ktoré pravdepodobne pomôžu identifikovať iné farmakologické prostriedky na liečbu DMD.

³⁴ Aktín je polypeptid tvorený 375 aminokyselinami, s celkovou molekulovou hmotnosťou asi 43 kDa.

³⁵ Je to skrátená forma definície „zvýšenie regulácie génu utrofínu, ktorý zapríčini zvýšenie množstva proteínu utrofínu“

Dve zo skorších aktívnych zlúčenín, VOX A a VOX B boli už systematicky testované na myšiach pomocou intraperitoneálnych injekcií (injekcie do brušnej dutiny). Po dvanástich týždňoch systematického podávania injekcií bola v testovaných kostrových svaloch zvýšená regulácia utrofínu s dokázaným pozitívnym účinkom pre svaly. Po ďalšom optimalizovaní zlúčenín ukázal vývoj klinického kandidáta SMT C1100 zmenšenie svalovej degradácie, fibrózy, ukladania tuku a chronických zápalov, teda zvieratám sa významne obnovila funkčnosť ich svalov. Po dennom podávaní injekcií počas 28 dní nevznikli žiadne vedľajšie účinky, takže zlúčenina sa javí byť bezpečná. Pokiaľ prebiehajúce predklinické toxikologické skúšky a výroba budú úspešné, prvé testy na ľuďoch - zdravých dobrovoľníkoch - by sa mohli konať v polovici roka 2008 a testy na pacientoch s DMD pravdepodobne začiatkom roka 2009.

Liečba Biglykánom³⁶ zvyšuje reguláciu utrofínu. Na stretnutí v Cincinnati v roku 2006 popísal **Justin Fallon** z Brown University v Providence, Rhode Island, prácu svojho laboratória na proteíne s názvom *biglykán* a teraz vo Filadelfii prezentoval nové výsledky, ktoré ukazujú, že biglykán môže dramaticky zvýšiť reguláciu utrofínu.

Počas vývinu je proteín biglykán prítomný na vonkajšej strane kostrových a srdcových svalov a svojimi dvoma zakončeniami viaže proteíny alfa- a gama-sarkoglykán, čo sú dva komponenty dystrofin-proteínového komplexu v membránach svalových buniek. Biglykán je dôležitý kvôli regulácii mnohých signalizačných a konštrukčných proteínov v membránach. Experimenty s nedystrofickými myšami, ktoré mali deaktivovaný svoj gén pre tvorbu biglykánu ukázali, že pri absencii biglykánu zmizlo mnoho proteínov dystrofinového komplexu. Liečba týchto myší lokálnym systematickým podávaním injekcií rekombinovanou, umelo vyrobenou, formou ľudského biglykánu, viedla k opätovnému objaveniu proteínu beta-syntrophin-u³⁷, ktorý bol indikáciou toho, že sa obnovil dystrofinový komplex.

Ľudský biglykán bol podávaný takisto pomocou lokálnych systematických injekčných dávok do tela mdx myší, kde zlepšil veľa symptómov týchto mierne dystrofických zvierat, ktoré vo svojich svaloch nemajú dystrofin. Najprekvapivejší nález však bol, že po systematickom podávaní jednotlivých injekcií sa 2,5x zvýšila regulácia ich nízkej hladiny utrofínu, a to dva až tri týždne po ukončení liečby.

Ďalším krokom bolo pozrieť sa, či liečba biglykánom zlepšuje funkčnosť svalov mdx myší. Po troch mesiacoch opakovaného systematického podávania injekcií s ľudským biglykánom, boli svaly týchto myší bez dystrofinu oveľa odolnejšie voči poruchám spôsobeným vynúteným predlžovaním a kontrakciami.

Biglykán je prítomný počas vývinu človeka, teda pri jeho použití ako lieku by sa nemalo očakávať spôsobenie akýchkoľvek odmietavých reakcií imunitného systému. Pretože pôsobí mimo svalových buniek, tak pri jeho použití ako liečebnej látky nemusí prechádzať krížom cez svalové membrány. Alfa- a gama-sarkoglykány, dva proteíny, ku ktorým sa biglykán viaže, sa nachádzajú len v kostrových a srdcovom svalu. To znamená, že biglykán by mohol byť aktívny predovšetkým v týchto dvoch typoch svalov a mohol by mať minimálne vedľajšie účinky.

Experimenty na zvieratách budú pokračovať kvôli ďalšiemu optimalizovaniu liečebných podmienok. Zaberie okolo 12 až 18 mesiacov, kým sa začne výroba účinného ľudského biglykánu v dostatočnej lekárskej kvalite, takže fáza I klinickej skúšky tohto potenciálneho lieku na DMD by potom mohla začať v priebehu dvoch rokov.

³⁶ **Biglykán** - je malý proteoglykán bohatý na opakujúce sa oblasti leucínu; nachádza sa v rôznych mimobunkových matriciach tkanív, vrátane kostí, chrupaviek a šliach

³⁷ **Syntrophins** - angl., sú rodina piatich proteínov s váhou asi 60 kDA, ktoré súvisia s dystrofinom. Týchto päť „syntrophins“ je kódovaných pomocou samostatných génov; poznáme α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ a $\gamma 2$ „syntrophins“

Preskočenie predčasných stop kodónov pomocou prípravku PTC124 pri čítaní genetickej informácie. Langdon Miller z PTC Therapeutics v South Plainfield, New Jersey, upravil zosumarizované výsledky z mojich posledných správ z konferencií zo Cincinnati a z Londýna a aktualizoval ich o najnovšie informácie o fáze-II klinickej skúšky s prípravkom PTC124.

Okolo 13 až 15% pacientov s DMD má mutáciu terminátora³⁸ alebo stop mutáciu génu dystrofinu, ktorá mení jednoduchý kodón aminokyseliny na jeden z troch predčasných stop kodónov - TGA, TAG a TAA. V mRNA sa tieto kodóny menia na UGA, UAG a UAA a spôsobujú, že syntéza proteínov sa končí predčasne ešte pred tým, ako je úplne zhotovený nový dystrofin. V tomto prípade je vyprodukovaný skrátenejší dystrofin, ktorý je navyše príliš krátky na to, aby mohol plniť svoju funkciu. PTC124 je malý molekulárny liek navrhnutý tak, aby umožnil počas procesu tvorby proteínu „preskočiť“³⁹ predčasný stop kodón a vyrobiť tak proteín v jeho úplnej pôvodnej dĺžke. Aby z tohto lieku mohli chlapci profitovať, musí byť pomocou procesu prerozdelenia oblastí v okolí zmutovanej strany dokázané, či ide skutočne o nonsense mutáciu ako príčinu vzniku DMD. Iba ak toto je splnené, je možné, že PTC124 by mohlo fungovať. PTC124 teda môže pomôcť bunkovému mechanizmu prekonať jednu z genetických príčin DMD. Takáto liečba je odlišná od genetickej liečby alebo od preskoku exónu.

PTC124 je novinka, prvý liek vo svojej triede. Bol objavený v rámci vysoko priepustného automatizovaného skenovacieho (screening) programu pre lieky, ktorý testoval okolo 800 000 zlúčenín nízkej molekulárnej hmotnosti na schopnosť prekonať účinky nonsense mutácií. Tieto zlúčeniny potom boli počas niekoľkých rokov laboratórnej práce chemicky optimalizované. Hoci ako prvý vyvolalo „prečítanie“ stop kodónov antibiotikum gentamicín, PTC124 nie je príbuzný gentamicínu a nie je to ani antibiotikum. Detaily o PTC124, vrátane jeho molekulárnej štruktúry a intenzívnych predklinických testov, boli publikované v Nature, 447, 87-91 dňa 3. mája 2007.

PTC124 dnes ešte nie je komerčne dostupný, stále prebieha vývoj v rámci štúdií na zvieratách a ľuďoch. Je to liečivo, ktoré sa podáva ústami, biely kryštalický prášok s mierne vanilkovou chuťou, dodávaný v malých fóliových balíčkoch. Liek sa pred použitím zmieša s vodou, mliekom alebo s džúsom.

Keďže PTC124 môže vyvolať „prečítanie“ nonsense mutácií v každej mRNA, je tak potenciálnym liekom aj na iné genetické ochorenia spôsobené nonsense mutáciami, ako je napr. cystická fibróza. PTC Therapeutics už v skutočnosti vykonala niekoľko štúdií fázy-II a dúfa, že začne aj z dlhodobšími štúdiami s pacientmi s cystickou fibrózou ako aj s DMD.

Kvôli stanoveniu, či by mohol byť PTC124 užitočným liekom na DMD, boli vykonané experimenty na bunkových kultúrach. Liečba svalových buniek s mdx ochorením pomocou PTC124 ukázala, že sa vytvoril dystrofin v kompletnej dĺžke, a že sa presunul na svoje správne miesto naspodku svalovej membrány. V žijúcich mdx myšiach sa po ústnom podávaní počas ôsmich týždňov objavil nový dystrofin v kostrových a srdcových svaloch a v bránici, čo redukovalo ich krehkosť a koncentráciu kreatínkinázy v krvi. Toxikologické štúdie na myšiach, potkanoch a psoch, ktorým boli dávané vysoké dávky lieku, nepreukázali vo všeobecnosti žiadne vážne či akútne vedľajšie účinky. Pri myšiach bol pozorovaný zápal obličiek a u psov bol pozorovaný zápal nadobličiek. U potkanov sa v jednej štúdií vyskytli

³⁸ „Nonsense mutation“ - mutácia terminátora (v ďalšom texte „nonsense mutácia“); je to bodová mutácia v sekvencii DNA, ktorá má za následok vznik predčasného stop kodónu - „nonsense kodón“ - v transkribovanej mRNA a pravdepodobne aj skrátenejšieho a často nefunkčného proteínového produktu

³⁹ „preskočiť“ vo význame, že v rámci procesu výroby proteínu sa genetická informácia prečíta celá aj napriek tomu, že obsahuje predčasnú informáciu o ukončení tohto procesu

tumory hnedého tuku⁴⁰, ale to sa pri opakovaní štúdie nepotvrdilo. Jasný dôkaz akýchkoľvek podobných problémov s obličkami či nadobličkami nebol pri ľuďoch pozorovaný. Ľudia nemajú toľko hnedého tuku, teda je nepravdepodobné, že tento problém bude u nich významný. V klinických štúdiách sa bude klásť dôraz na testovanie problémov s obličkami a nadobličkami.

Pri prvých klinických testoch s PTC124 bola na 61 zdravých mladých dobrovoľníkoch vo veku od 18 do 31 rokov vykonaná otvorená skúška vo fáze I. Uvedený vekový rozsah bol zvolený preto, že ide o rovnaký vek ako pri pacientoch s DMD. Počas dvoch týždňov dostávali dobrovoľníci denne tri dávky lieku. Taktiež bola testovaná schopnosť absorbovania lieku s jedlom a bez neho. Liek bol v tele dobre absorbovaný a bolo možné udržať koncentráciu krvnej plazmy na úrovni od 2 do 10µg/ml, ktorá bola známa už zo skúšok s mdx myšami. PTC124 vykazoval pri veľmi vysokých dávkach (viac ako 150mg/kg) niekoľko vedľajších účinkov ako sú nevoľnosť, hnačky či bolesti hlavy. Občas bola pozorovaná aj zvýšená aktivita pečeneých enzýmov. Dávky do 100mg/kg/deň boli týmito dobrovoľníkmi znášané dobre, pričom išlo o dávky, ktoré sú väčšie ako tie, ktoré sa plánujú dávať chlapcom s DMD.

Tieto výsledky podporili začiatok klinickej štúdie vo fáze II. V úvodnej časti tejto otvorenej klinickej skúšky bolo zapísaných a testovaných 26 chlapcov s DMD vo veku od 5 do 13 rokov. Šesť chlapcov dostávalo dávky 16mg/kg/deň a 20 chlapcov dávky 40mg/kg/deň, obe skupiny ich mali rozdelené do troch dávok za deň. Chlapci mali rozdielne stop mutácie: 15 malo UGA, 6 UAG a 5 UAA stop kodóny rozdelené naprieč medzi exóny od 6 do 70. Pacienti boli 21 dní pred skúškou klinicky sledovaní, potom počas 28 dní dostávali denne dávky lieku a napokon počas ďalších 28 dní podstúpili dodatočné sledovanie a skúmanie. Pred a po liečbe bola vykonaná svalová biopsia zo svalu *extensor digitorum brevis* z nohy, a to kvôli zisťovaniu obnovy produkcie kompletného dystrofinu v jeho úplnej dĺžke. Taktiež boli vykonané iné chemické a funkčné testy na meranie liečebných účinkov a sledovanie bezpečnosti.

Predtým, ako chlapci z prvých dvoch skupín dostali svoje dávky lieku, bolo v laboratóriu liečené pomocou PTC124 svalové tkanivo zo svalovej biopsie, vykonanej pred začiatkom skúšky. U 100% chlapcov bol týmto laboratórnym experimentom zistený očakávaný nárast počtov úplného dystrofinu, závislý na podávanej dávke. U 50% z 26 chlapcov v oboch skupinách - u troch zo šiestich v skupine s nižšími dávkami a u 11 z 20 v skupine s vyššími dávkami - mohol byť v materiáli zo svalovej biopsie, vykonanej po 28 dňoch podávania lieku, zistený mierne viditeľný nárast dystrofinu. Jedným z dôvodov, prečo nebol u všetkých chlapcov nájdený dystrofin môže byť aj to, že koncentrácia PTC124 v krvi bola pod zamýšľaným rozsahom koncentrácie plazmy od 2 do 10µg/ml, čo mohlo byť pravdepodobne spôsobené rýchlejšou degradáciou lieku u detí pri porovnaní s dospelými. Ale všetci títo chlapci vykázali počas liečby redukciiu aktivity kreatínkinázy, ktorá sa potom znova zvýšila počas obdobia sledovania, ktoré nasledovalo po perióde podávania lieku po skončení liečby. Toto sa dalo pri kontinuálne podávaných farmakologických prvkoch očakávať. Boli pozorované nejaké vedľajšie účinky, ktoré však boli nepravidelné a ľahko utíšiteľné, ako napr. hnačky, nevoľnosť či bolesť hlavy, pričom neexistovali žiadne relevantné laboratórne abnormality.

Niekoľkí rodičia a učitelia odpozorovali, že po liečbe niektorí z chlapcov vykazovali väčšiu aktivitu, nárast výdrže a pokles malátnosti oproti predchádzajúcemu stavu. To sú iba

⁴⁰ **Hnedý tuk** - z angl. „brown adipose tissue (BAT)“ alebo „brown fat“ je jeden z dvoch druhov tukového tkaniva (druhý je „white fat“, biely tuk). Jeho hlavnou úlohou je produkovanie telesného tepla.

neformálne správy od rodičov, teda je potrebné, aby tieto typy informácií boli detailnejšie vyhodnocované.

Na základe týchto výsledkov sa predpokladalo, že vyššia dávka PTC124 by mohla viesť k výskytu nového dystrofinu v účinných množstvách, s tým, že by to malo aj zodpovedajúci liečebný účinok. Preto bolo do tohto testu zapísaných ďalších 12 chlapcov s DMD. Títo počas 28 dní dostávali dávku PTC124 vo výške 80mg/kg/deň, rozdelenú do troch samostatných dávok. Táto dávka by mala byť účinná na dosiahnutie koncentrácie minimálne od 2 do 10µg/ml v krvnej plazme. Toto rozšírenie skúšky už skončilo, údaje sú teraz analyzované a konečné výsledky budú dostupné už čoskoro.

Na konci prezentácie spomenul Dr. Miller tri otázky, ktoré musia byť zodpovedané ešte pred tým, ako sa stane PTC124 liekom na DMD:

- 1.) Zmení sa krátkodobá pozitívna aktivita PTC124 do želaných dlhodobých lekárskeho benefitov, ako je nárast funkčnosti svalov, sily a výdrže, ako aj do lepšej kvality života?
- 2.) Aká dávka PTC124 najbezpečnejšie poskytne tie najlepšie lekárske výsledky?
- 3.) Koľko mesiacov zaberie prechod krátkodobej farmakologickej aktivity na dlhodobé lekárske pozitívne výsledky?

Iba dlhodobá riadená klinická skúška dokáže zodpovedať tieto otázky. Ďalšími krokmi, ktoré podnikne PTC Therapeutics teda bude ukončenie analýz údajov z kompletnej štúdie vo fáze-II a následne príprava všetkých požiadaviek, potrebných pre posúdenie dlhodobej klinickej skúšky Americkým FDA a Európskym EMEA⁴¹ ešte pred koncom roka 2007. Začiatok tejto dlhšej skúšky sa očakáva v priebehu nasledujúcich mesiacov. PTC tiež otvorí dlhobojšiu rozšírenú štúdiu pre chlapcov v rámci skúšky vo fáze-IIa.

Projektový Katalyzátor: Nájdenie a vývoj štyroch nových liekov na liečbu DMD. Spoločnosť PTC Therapeutics zo South Plainfield, New Jersey, sa zameriava na objavovanie a vývoj malomolekulárnych liekov, ktoré modifikujú proces *post-transkripčnej kontroly* (post-transcribed control, PTC) pri biosyntéze proteínov *po tom*, ako je genetická informácia skopírovaná (transkribovaná) z génu do RNA. **Ellen Welch**, vedúca jednej skupiny v tejto spoločnosti, predstavila *Projektový Katalyzátor*, program pre hľadanie a vývoj drobných chemických zlúčenín, ktoré by sa mohli stať liekmi na DMD.

Projektový Katalyzátor sa začal v máji v roku 2004 s cieľom identifikovať automatickými triediacimi metódami spomedzi stovky tisíc zlúčenín tie, ktoré by mohli upraviť produkciu (ich *prejavovanie*) štyroch biologických „cieľov“ vo svalových bunkách. Boli vybrané nasledovné (ďalej uvedené) štyri ciele, pretože vedci už dokázali, že zvýšenie alebo zníženie regulácie ich prejavov by mohlo udržať a zlepšiť svalovú štruktúru a funkčnosť u pacientov s DMD. Pokles, resp. zníženie regulácie *myostatínu*⁴² a zvýšenie regulácie *špeciálneho svalového rastového faktora podobného inzulínu - faktor IGF-1*⁴³, nie však jeho špecifickej pečenej izoformy, by mohlo podporiť prírastok svalov a ich regeneráciu. A nárast, resp. zvýšenie regulácie *utrofinu* a *alpha7-integrínu*⁴⁴ by mohol stabilizovať svalovú membránu a teda zlepšiť funkčnosť svalov.

⁴¹ **EMEA** - skratka z angl. European Medicines Agency; Európska regulačná agentúra pre hodnotenie lekárskeho produktov

⁴² **Myostatín** - je rastový faktor, ktorý limituje vzrast svalového tkaniva, t.j. vyššie koncentrácie myostatínu v tele môžu spôsobiť individuálne menší vývoj svalov.

⁴³ **IGF-1 (Insulin-like growth factor 1)** - je to hormón s molekulárnou štruktúrou podobnou inzulínu, veľmi dôležitý pre vývoj dieťaťa, v dospelosti s anabolickými účinkami

⁴⁴ **Integrín** - veľká skupina receptorov na bunkovom povrchu. Zabezpečujú adhéziu mimobunkovej matrice a susedných buniek

Automatické vytried'ovacie techniky pre nájdenie týchto potenciálnych liekov na DMD používajú nové testovacie postupy na meranie ich aktivity pomocou systému „proteín spravodajca“ (je to proteín, ktorý sa dá ľahko detekovať v skúmanom systéme, avšak za normálnych okolností sa v ňom nenachádza, je v ňom umelo vložený): mRNA každého zo štyroch cieľov bola kombinovaná s génom enzýmu luciferázy zo svätajánskych mušiek. V prítomnosti aktívnej zlúčeniny potom intenzita svetla produkovaného pomocou luciferázy buď narastala alebo klesala. Automatické a presné meranie intenzity svetla je oveľa jednoduchšie ako analyzovanie biologických účinkov spomínaných biologických „cieľov“.

Momentálne je prostredníctvom zmien chemickej štruktúry a charakterizovaním biologických, farmakologických a liečebných vlastností optimalizovaný pomerne malý počet zlúčenín s aspoň nejakými želanými vlastnosťami. Pokračujú zmeny ich chemickej štruktúry, ktoré ovplyvňujú napr. aktivitu, silu, rozpustnosť, permeabilitu, metabolizmus, toxicitu, vedľajšie účinky, schopnosť lieku zasiahnuť cieľové oblasti v tele pri ústnom podaní a ďalšie ich vlastnosti. Tento optimalizačný proces zamestná na mnoho rokov mnoho chemikov. Nakoniec musí byť pre najslubnejšie zlúčeniny účinne zvýšený proces laboratórnej syntézy a jej počet, a to kvôli produkcii dostatočného množstva materiálu pre predklinické skúšky na izolovanom svalovom tkanive a na živých zvieratách, ako sú mdx myši. Množstvo zlúčenín so schopnosťou modifikovať prejavy vybraných „cieľov“ sa momentálne nachádza v rôznych štádiách tohto optimalizačného procesu.

PTC Therapeutics má momentálne k dispozícii niekoľko potenciálnych liekov schopných až dvojnásobne znížiť reguláciu myostatínu na veľmi nízku koncentráciu, zvýšiť reguláciu svalovej izoformy IGF-1 (nie jej špecifických pečňových izoformiem), zvýšiť reguláciu utrofínu a alpha7-integrínu. Počas nasledujúcich rokov budú tieto veľmi sľubné potenciálne lieky ďalej optimalizované, s cieľom začať s chlapcami s DMD okolo roku 2009 fázu-I klinických štúdií zameraných na toxicitu.

Informácie zo samotného génu dystrofínu, vrátane jeho mutácií, nebudú týmito liekmi ovplyvnené. Preto budú musieť byť tieto lieky užívané pravdepodobne počas celého života pacientov. Neskôr by mohli byť použité navzájom v kombinácii alebo s inými farmakologickými liekmi, či s genetickou technikou preskoku exónu, s cieľom dosiahnutia optimálnej a vysoko efektívnej liečby DMD.

Spomalenie NFkappaB⁴⁵ (NFkB) zlepšuje funkčnosť a štruktúru svalov. George Carlson a jeho tím zo Still University v Kirksville v Misouri, skúšali porozumieť tomu, prečo vedie úbytok dystrofínu u mdx myši ku vzniku muskulárnej dystrofie, pretože ich práním bolo navrhnuť cieleň výskumný prístup pre dosiahnutie liečby. Myslelo sa, že vstup, alebo prívod zvýšeného počtu iónov vápnika (t.j., nabitých atómov vápnika) do svalových buniek bol zodpovedný za vznik dystrofických symptómov. Ale merania prítoku vápnika do zopár izolovaných dystrofických vlákien z dýchacieho svalu *triangularis sterni* (TS) mdx myši ukázali, že tento prítok nebol v týchto namáhaných vláknach v skutočnosti vyšší oproti prítoku do normálnych svalových vlákien, a to za tých istých podmienok. To naznačovalo, že pri muskulárnej dystrofii nie je nárast prítoku vápnika zodpovedný za degeneráciu svalov. Avšak sval TS je pasívne namáhaný vždy, keď sa zviera nadýchne, čo naznačuje, že pasívne namáhanie dystrofických vlákien aktivuje mechanizmus, ktorý degeneráciu svalov podporuje. Iné vyšetrenia ukázali, že pasívne namáhanie aktivuje vo svaloch signálnu cestu NFkB. *Dr. Carlson* a jeho kolegovia zakrátko začali testovanie hypotézy, že aktivovanie tejto cesty je zodpovedné za poruchy namáhaného dystrofického svalu TS.

⁴⁵ **NFkappaB (NFkB)** - je proteínový komplex, ktorý je vlastne proteínom, viažucim sa na špecifické časti DNA a je súčasťou systému, ktorý kontroluje transkripciu genetickej informácie z DNA do RNA.

Tento proteín NFκB bol objavený v roku 1986, v rovnakom roku ako dystrofinový gén. Nachádza sa v cytoplazme všetkých buniek, ale väčšinu času je kvôli inému proteínu neaktívny. Tento iný proteín je tlmiači κB, alebo IκB (inhibitory κB). Ak je prostredníctvom komplexu regulačných procesov iniciovaný zápalový proces na boj s vírusovou alebo bakteriálnou infekciou, pridá IκB kinázový komplex⁴⁶ (IKK) ku NFκB dve skupiny fosfátov a uvoľní ho tak od jeho inhibítorov. Takto aktivovaný NFκB migruje z cytoplazmy do bunkového jadra a keďže sa tam viaže s promotórom a s nukleotidmi, ktoré zvyšujú úroveň genetickej transkripcie zvyšovaním činnosti práve promotórov na tej istej molekule DNA, čím zvyšuje reguláciu týchto génov. Je známych niekoľko stoviek génov, ktoré tvoria časť rôznych reťazcov spätných krokov, tzv. *kaskád*, ktoré závisia na aktívnom NFκB v bunkovom jadre. Keď už zápal nie je viac potrebný, aktivácia NFκB je pomocou antizápalových faktorov zastavená. Ak genetické mutácie, iné patogénne alebo stresové situácie neumožnia týmto faktorom deaktivovať NFκB, vyvinú sa niektoré chronické ochorenia ako arterioskleróza, fibróza pľúc, astma, reumatická artritída a možno aj DMD.

Dr. Carlson začal testovanie liekov, ktoré spomaľujú aktiváciu NFκB a študoval účinky týchto liekov na chronicky namáhaný sval TS. Existuje množstvo liekov, ktoré to dokážu urobiť. Jeden z nich je *pyrrolidine dithiocarbamate*, ktorý sa ukázal byť tým, ktorý zabraňuje štiepeniu neaktívnej väzby komplexu NFκB-IκB tak, že sa NFκB nemôže presunúť do bunkového jadra. Bolo zistené, že tento liek je efektívny v zlepšovaní štruktúry a funkčnosti dystrofického svalu. Niektoré z týchto liekov spomaľujúcich NFκB sú už schválené na trhu aj pre liečbu iných stavov. Jeden z nich je *sulfasalazin*, ktorý je používaný na liečbu reumatickej artritídy u mladistvých.

Dr. Carlson a jeho spolupracovníci už testovali tieto lieky na izolovaných svalových vláknach TS z mdx myši a zistili, že sa výrazne zvýšil ich priemer a funkčnosť. V súčasnosti Dr. Carlson triedi niekoľko liekov, ktoré spomaľujú NFκB a zaujíma sa hlavne o testovanie zlúčenín, ktoré sú momentálne používané na liečbu iných stavov. Nakoniec Dr. Carlson povedal: „Možno by sme mali začať zvažovať klinické skúšky niektorých z týchto liekov spomaľujúcich NFκB, ktoré sú momentálne používané na liečbu iných ľudských chorôb.“

Beta-agonisti⁴⁷, potenciálne lieky na DMD. Gordon Lynch z University of Melbourne v Austrálii odprezentoval výskumnú prácu svojho laboratória na použitie veľmi dobre známych liekov nazývaných *beta-agonisti* na udržiavanie a zväčšovanie svalov pacientov s DMD. Beta-agonisti sú hormónom podobné zlúčeniny, ktoré sa viažu k špecifickým receptorovým proteínom v bunkových membránach. Ovplyvňujú aktivitu týchto membrán naštartovaním „signálnych ciest“ vo vnútri bunky, pomocou ktorých - prostredníctvom reťazca vzájomne sa ovplyvňujúcich špecializovaných proteínov - posielajú chemické signály k biologickým cieľom v bunke, ktorá musí byť aktivovaná - spomalená. Alebo musí byť predmetná bunka modifikovaná na zaistenie jej správneho fungovania v rámci meniacich sa podmienok. Cesta, *reakčná kaskáda*, ovplyvnená a modifikovaná pomocou beta-agonistov je tzv. *beta-adrenergická⁴⁸ signálna cesta*, ktorá je, o. i., dôležitá pre kontrolu proteínovej syntézy a degradácie proteínov.

Niektorí beta-agonisti sú lieky, ktoré sa široko používajú astmatickými pacientmi, a to vdychovaním s cieľom ukládať hladké svalstvo dýchacích ciest. Sú to tzv. *bronchodilatanciá*. Iné majú silné anabolické účinky na kostrové svaly, špeciálne keď sú

⁴⁶ z angl. **IκB kinase complex** - enzýmový komplex, ktorý je súčasťou kaskády procesu, ktorý mení jeden typ signálu v bunkách na iný, konkrétne pri činnosti NFκB

⁴⁷ z angl. „**beta agonists**“ - agonista je látka, ktorá pripomína svojim pôsobením prirodzenú látku (napr. hormón) tým, že sa viaže na špecifický bunkový receptor a aktivuje jeho biologickú akciu. V širšom zmysle sa niekedy pojem agonista používa aj pre prirodzenú látku ako takú.

⁴⁸ **adrenergický** - súvisiaci s adrenalínom

vpichneté vo veľkých dávkach do krvného obehu. Niekedy sú ilegálne využívané atlétmi na zlepšenie svalového objemu a redukciu telového tuku.

Beta-agonisti môžu byť užitočné aj na zvrátenie úbytku svalov u starších ľudí. Dr. Lynch a jeho kolegovia testovali ich anabolický potenciál v experimentoch na 28 mesiacov starých potkanoch, ktoré sa blížili ku koncu bežnej dĺžky svojho života, ktorá je štandardne okolo 30 až 32 mesiacov. V roku 2004 vedci ukázali, že denná liečba týchto starých potkanov počas štyroch týždňov s dávkami 1,4mg/kg *fenoterolu* intraperitenoálnymi injekciami do žalúdka, zvrátila úbytok svalov súvisiaci s vekom. V porovnaní so 16 mesačnými mladými potkanmi, ktoré už majú ukončený rast svojich svalov, bola svalová hmota starých potkanov omnoho väčšia, svalové vlákna mali väčší priemer, narástla sila svalov a mnoho pomalých svalových vlákien sa stalo rýchlymi, čo viedlo k silnejším a rýchlejšim kontrakciám. Výsledky naznačili, že beta-agonisti by mohli byť snáď použité aj na liečbu *sarkopéni*⁴⁹, čo je ochorenie spôsobujúce úbytok svalov a ich pridružené slabnutie a je široko rozšírené v populácii starších ľudí. Fenoterol je jedným zo staršej generácie beta-agonistov a v následných experimentoch vyskúšal Dr. Lynch a jeho kolegovia účinnosť silnejších beta-agonistov novej generácie - *formoterolu* a *salmeterolu* - pričom oba sú schválené lieky na astmu.

Ak by mohlo byť pomocou beta-agonistov liečený úbytok svalov starších ľudí, potom je zrejmé, že by mohli byť tiež užitočné pre pacientov s ochorením postihujúcim svaly ako je DMD.

V skutočnosti už bola vykonaná prvá klinická skúška s pacientmi s DMD a BMD. Keďže by nemohol byť použitý fenoterol, účastníci boli 28 týždňov liečení *albuterolom* v dávkach 8mg/kg. Albuterol je iný druh beta-agonistu a je tiež schváleným liekom. Táto nízka dávka bola zvolená po inej ročnej skúške s dospelými pacientmi s FSH dystrofiou (Fascioscapulohumerálna muskulárna dystrofia), pričom ukázala, že pri dávkach 16 a 32mg/deň viedol albuterol ku vzniku zopár neakceptovateľných srdcových problémov. Redukovaná dávka v skúške s DMD pacientmi nespôsobila žiadne vedľajšie účinky, ale albuterol vyvolal len mierny nárast sily svalov. Tento nárast bol však neúčinný a nemal žiaden liečebný účinok.

Preto sa Dr. Lynch a jeho kolegovia pýtali, či by nemohol byť silnejší beta-agonista *formoterol* v dystrofických myšiach oveľa účinnejší. Veľmi nízke dávky formoterolu - 25µg/kg - zvýšilo veľkosť svalového vlákna a zlepšilo funkčnosť dvoch testovaných kostrových svalov týchto dystrofických myší. Dôležité je, že zlepšenie sily svalu nebolo spojené so žiadnymi negatívnymi zmenami v ich únave.

Plány do ďalšieho výskumu vedúcemu k liečbe DMD budú zahŕňať ďalšie predklinické experimenty, špeciálne zamerané na oddelenie pozitívnych účinkov beta-agonistov na kostrové svaly od ich potenciálne negatívnych vplyvov na srdce. Pretože títo beta-agonisti pôsobia na tie isté receptory, ktoré boli nájdené v kostrových svaloch a v srdci, je oddelenie ich účinkov dôležitou vedeckou úlohou. Napokon, pacienti s DMD nepotrebujú zväčšenie srdca (kardiatických svalov). Taktiež by malo byť zabránené iným vedľajším účinkom, napr. zníženiu regulácie beta receptorov v membránach svalovej bunky, aby sa umožnil vývoj beta-agonistov s dlhodobšími účinkami. Po vyriešení týchto problémov na psoch a myšiach bude možné vykonať nové klinické skúšky s chlapcami s DMD.

Blokovanie zápalových činiteľov. Degradácia a smrť svalových buniek pri DMD spôsobuje zápalové procesy, ktoré upratujú odumreté zvyšky buniek. Steroidy sú schopné potlačiť zápal a to je možno jeden z dôvodov, prečo liek *prednizon*, jeho aktívna forma *prednizolon* a príbuzný *deflazakort*, môžu zvýšiť svalovú hmotu a silu a redukujú reakciu imunitného systému, avšak často s nepríjemnými vedľajšími účinkami. Sú široko používané pri chlapcoch

⁴⁹ **Sarkopénia** - z angl. „sarcopenia“, postupný degeneratívny úbytok svalovej hmoty a sily

s DMD na udržanie funkčnosti svalov minimálne na niekoľko rokov. Ale presný mechanizmus ich pôsobenia nie je ešte dobre známy.

Melisa Spencerová z University of California v Los Angeles podala správu o experimentoch, ktoré ovplyvňujú zápal a imunitné reakcie a teda hľadajú cesty, ako teoreticky nahradiť steroidy liekmi, ktoré sa zameriavajú na špecifické poruchy spôsobené imunitou. Časť nasledujúceho textu je založená na prezentácii *Sylvie Lopezovej*, ktorá je postgraduálnou študentkou v laboratóriu Dr. Spencerovej, z posledného stretnutia PPMD v Cincinnati.

Štúdie ukázali, že zvýšené hladiny CD4 a CD8 T buniek a čo je ešte dôležitejšie - myeloidných⁵⁰ buniek imunitného systému, urýchľujú progresiu ochorenia. Tieto bunky vylučujú cytokíny⁵¹, molekuly, ktoré podporujú zápal a tvorbu fibrózy v mdx svaloch a vo svaloch s DMD. U zdravých ľudí je to normálny proces hojenia rán, ktorý stabilizuje slabé tkanivo a podporuje hojenie. U chlapcov s DMD sa tento proces vymyká kontrole a stáva sa chronickým, teda akoby sa rany stále liečili. Preto spomalenie alebo odstránenie imunitných buniek a tiež utlmenie aktívnych cytokínov, by možno spomalilo degradáciu a fibrózu dystrofických svalov. Existuje už množstvo schválených antizápalových liekov. Ak by sa tieto ukázali ako pozitívne „ovplyvňovače“ DMD, trvalo by získanie povolenia od FDA pre dodatočnú liečbu DMD oveľa menej času, ako by tomu bolo pri schvaľovaní kompletne nového lieku.

Tri z týchto liekov sú testované v laboratóriu Dr. Spencerovej na mdx myšiach. Tieto lieky už boli testované v klinických skúškach na pacientoch s inými ochoreniami: *CTLA-4Ig* proti reumatickej artritíde, *Galectin-1* tiež proti artritíde a ukázal sa tiež ako liek zlepšujúci regeneráciu svalov, a napokon *Anti-asialo GM1*, protilátka používaná pri liečbe Parkinsonovej choroby. Bude nasledovať testovanie dvoch ďalších liekov na mdx myšiach. *Remicade®* a *Enbrel®*, oba lieky sú schválené ako lieky na reumatickú artritídu a iné ochorenia. Iným dôležitým cieľom pre antizápalový liek je proteín NFκB, o ktorom hovoril na tomto stretnutí *Dr. Carlson*.

Na konci svojej prezentácie spomenula doktorka Spencerová dôležité výsledky. *Osteopontín*⁵² je proteín, ktorý preniká do krvného obehu, a ktorý má mnoho funkcií v biológii kosti, pri kontrole imunity, pri prežití buniek a pri zápalových a rakovinových metastázach. Ukázalo sa, že jeho koncentrácia v krvi a v svaloch mdx myši je zvýšená. Mdx myši bez osteopontínu preukázali silnejšie svaly, nižšie hodnoty CK a zredukovanú fibrózu. Teda, ak by sa našiel liek, ktorý by dokázal spomaľovať osteopontín u chlapcov s DMD, pravdepodobne by zlepšil obnovu svalov a ich funkčnosť a znížil by fibrózu.

Na rozhodnutie, či by sa tieto lieky mohli použiť ako liečba pre pacientov s DMD, a teda či by mohli byť použité na zlepšenie životných vyhlídek a kvality života chlapcov s DMD namiesto steroidov a možno aj v kombinácii s genetickými metódami, ako je napr. preskok exónu, budú potrebné dlhodobé štúdie.

Klinická skúška MYO-029 na spomalenie 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 limitujú rast svalov. Preto by mohlo byť možné deaktivovaním myostatínu stimulovať regeneráciu svalových vlákien chlapcov s DMD, takže by neboli tak rýchlo zničené alebo by dokonca mohli narásť.

⁵⁰ **Myeloidný** - týkajúci sa kostnej drene, zvlášť myelocytov (druh bielych krviniek).

⁵¹ **Cytokín** - je látka produkovaná bunkami imunitného systému, ktoré stimulujú rast a aktivitu určitých typov buniek.

⁵² **Osteopontín** - ľudský gén, mimobunkový štruktúrally proteín a teda organická súčasť kostí

Myši bez svalovej dystrofie, ktorých gén myostatín bol genetickými metódami deaktivovaný, mali až trikrát väčšie kostrové svaly s výrazne väčším počtom vlákien s väčším priemerom, ako je to bežné. Existuje druh *dobytky*, z angl. Belgian Blue Breed, ktorý je veľmi svalnatý, pretože jeho gén myostatín bol pred mnohými storočiami deaktivovaný. Nedávno bolo objavené, že tzv. *bully whippets* (z angl.), plemeno anglických dostihových psov, má extrémne zväčšené svaly tiež v dôsledku absencie myostatínu. A v Berlíne sa našiel dnes už osemročný, fyzicky veľmi silný chlapec, ktorého kostrové svaly sú asi dvakrát väčšie ako u normálnych detí. Toto je silnou indíciou toho, že zníženie regulácie alebo spomalenie myostatínu by viedlo aj k nárastu svalov chlapcov s DMD. Avšak liečba myostatínom by nebola schopná ovplyvniť genetické príčiny ochorenia. V kombinácii s genetickou liečbou, ako je napr. prenos génu dystrofinu či preskok exónu, by pravdepodobne prístup s myostatínom mohol zlepšiť ich liečebné účinky.

Kathryn Wagnerová z Wellstone Muscular Dystrophy Center pri Johns Hopkins University v Baltimore oznámila už na stretnutí v Cincinnati, že jej výskumný tím vychoval mdx myši, ktoré okrem toho, že nemali dystrofin, nemohli tvoriť ani myostatín. Tieto dospelé myši bez myostatínu mali viac zdravých svalov, menej fibróz, zjazvených tkanív a dokázali regenerovať svoje svaly rýchlejšie ako zdravé mdx myši.

Odpoveď na otázku, či by absencia myostatínu mala podobné účinky aj na srdce, ukázali následné vyšetrenia na dospelých mdx myšiach - blokáda myostatínu srdca neovplyvňuje. To znamená, že aktivita myostatínu sa zdá byť obmedzená iba na kostrové svaly.

V spolupráci so spoločnosťou Wyeth Pharmaceuticals v Collegeville blízko Filadelfie, sa v súčasnosti realizuje klinická skúška s *Myo-029*. Je to špeciálna protilátka, ktorá sa viaže k myostatínu a blokuje jeho aktivitu. Tento proteín nespôsobuje imunitné reakcie, pretože jeho štruktúra je ľudská, je „poľudštený“. Môže byť vstreknutý do krvného obehu alebo pod kožu.

Tri skupiny dospelých pacientov so svalovou dystrofiou, každá po 36 členov, z ktorých jeden má BMD, sú liečené intravenózne s dávkami *Myo-029* veľkosti 1, 3 a 10mg/kg. Dávky sú podávané počas 24 týždňov každé dva týždne, nasledované 12 týždňovým testovacím a lekárskeym dohľadom.

Cieľom tejto fázy-I/II klinickej skúšky je zhodnotiť bezpečnosť a vyskúšať účinnosť. Predbežné výsledky ukázali, že *Myo-029* je dobre znášaný s výbornou krátkodobou bezpečnosťou. Akonáhle bude skúška vyhodnotená a výsledky úplne skompletizované, bude publikovaná.

Keďže bude dôležité poznať dlhodobé účinky tohto lieku, je plánovaná štúdia na dystrofických psoch. Spoločnosť Wyeth nie je jedinou spoločnosťou aktívnou na tomto poli. Ostatné spoločnosti vyvíjajú ďalšie metódy na blokovanie aktivity myostatínu nielen na liečbu svalovej dystrofie, ale aj pre iné zdravotné problémy, ako je poškodzovanie svalov u starších ľudí, ktoré postihuje širšiu populáciu.

Dr. Wagnerová ukončila svoju prezentáciu v Cincinnati varovaním, ktoré tu zopakujem. „Rodičia by nemali kupovať akékoľvek tzv. myostatínové spomaľovače, ponúkané na Internete. Tieto zlúčeniny neprešli klinickými skúškami, a preto sú neúčinné alebo dokonca nebezpečné.“

BBIC spomaľuje proteázy, ale Myodur (C101) nie. **Lee Sweeney** z University of Pennsylvania vo Filadelfii hovoril o novom výskume na spomaľovanie proteáz. Degradácia svalových proteínov pri DMD je spôsobená niekoľkými rôznymi proteázami, enzýmami, ktoré ničia proteíny. Medzi nimi je enzým *calpain*, ktorý je aktivovaný vápnikom a dlhý

proteínový komplex, nazývaný *proteazóm*⁵³. Keď kvôli nedostatku dystrofínu membrány svalových buniek slabnú, ako je tomu napr. pri DMD, ióny kalcia (nabité atómy) z vonkajšej strany buniek aktivujú kalpain a nepriamo tiež aj proteazóm. Tento nárast aktivity enzýmov vedie k rozšíreniu deštrukcie dôležitých bunkových proteínov, ktoré sú potrebné pre funkciu buniek a pre ich prežitie. Výskumníci skúšajú spomaliť aktivitu kalpainu a ďalších proteáz a teda oddaľujú degradáciu svalovej bunky.

Jeden z takýchto spomaľovačov je *Bowman-Birk inhibitor concentrate*, BBIC, prírodný proteín, pozostávajúci zo 71 aminokyselín, ktorý môže byť izolovaný zo sójových zŕn. Je to vo vode rozpustná látka, ktorá môže byť podávaná ústne. Keďže to je príliš veľa na vstup do svalových buniek, blokuje táto látka zopár proteáz podobných zažívacím enzýmom ako sú trypsin⁵⁴ a chymotrypsin⁵⁵, ktoré sa nachádzajú mimo buniek a narušuje tak signálne cesty, ktoré môžu pri DMD spôsobiť zápalové procesy. BBIC blokuje proces svalovej dystrofie v mdx myšiach pomocou spomalenia svalovej degradácie. Celé je to porovnateľné s prednizonom. Dlhodobá liečba s BBIC zväčšuje svalovú hmotu a silu mdx myši. Aktivity kreatínkinázy sú značne redukované, rovnako ako fibróza. Na základe iných aplikácií BBIC u pacientov s rakovinou je známe, že je to veľmi bezpečný liek.

Práve je pripravovaná fáza I klinických skúšok spoločne s doktorom Kennethom Fishbeckom z National Institutes of Health⁵⁶ (NIH) v meste Bethesda blízko Washingtonu. Započatá bude akonáhle sa získa povolenie od úradu FDA. Ak klinické skúšky ukážu, že u chlapcov s DMD môžu byť dosiahnuté podobné výsledky ako pri pokusoch na mdx myšiach, môže tento v podstate slabý liek, spomaliť degradáciu svalov pri ochorení DMD, hoci nedokáže vyriešiť základnú genetickú príčinu ochorenia. Sójové zrná obsahujú aj iné proteázy, takže BBIC z nich musí byť izolovaná a vyčistená. Samotné jedenie sóje nemá žiadny účinok.

Tripeptid *Leupeptín*⁵⁷ bol prvým identifikovaným spomaľovačom, ktorý by pravdepodobne mohol redukovať aktivitu enzýmu kalpain v mdx myšiach. Leupeptín pozostáva z troch aminokyselín s chemicky reakčnou aldehydovou skupinou, ktorá je pre spomaľovanie kľúčová. Myodur, zlúčenina C101 slúžiaca výskumu a vyvinutá spoločnosťou CepTor v Baltimore, je kombináciou Leupeptínu s karnitínom⁵⁸. O karnitíne sa predpokladalo, že bude schopný efektívnejšie spomaliť kalpain než leupeptín, ako o tom hovorila *Dr. Theresa Micheleová* zo spoločnosti CepTor na stretnutí PPMD v Cincinnati v roku 2006. V laboratóriu doktora *Sweeneyho* boli vykonávané ďalšie predklinické štúdie na odskúšanie účinku leupeptínu, ako aj Myoduru ešte pred tým, ako by mohli byť podniknuté klinické skúšky. Výsledky ale boli sklamaním. V experimentoch na mdx myšiach sa ukázalo, že Myodur po liečbe počas 8 týždňov alebo Leupeptín po liečbe počas 6 mesiacov nespôsobili nárast svalov, nezlepšili ich funkčnosť a neredukovali ich poškodenie. V skutočnosti nebol kalpain spomalený, ale pomocou týchto liekov sa zvýšila jeho regulácia a znížila sa regulácia

⁵³ **Proteazóm** - sú to veľké proteínové komplexy vo vnútri všetkých eukaryot a archaeí (dva rôzne bunkové organizmy), ako aj v niektorých baktériách

⁵⁴ **Trypsín** - serínová proteáza (druh enzýmov, ktorý „strihá“ peptidové zväzky na proteíny), ktorá sa nachádza v zažívacom trakte, kde sa rozpadá na proteíny

⁵⁵ **Chymotrypsín** - tráviaci enzým vykonávajúci proteolýzu (riadený rozklad proteínov pomocou bunkových enzýmov - proteáz alebo pomocou vnútrobunkového zažívania)

⁵⁶ **National Institutes of Health** - agentúra sekcie pre zdravie a služby ľuďom pri vláde USA; je zodpovedná za biomedicínsky výskum a výskum súvisiaci so zdravím

⁵⁷ **Leupeptín** - je spomaľovač proteáz, ktorý sa používa aj ako spomaľovač kalpainu

⁵⁸ **Karnitín** - látka, ktorá sa vyskytuje v dvoch izoméroch - D-karnitín a L-karnitín (v poslednom čase je skôr známa forma L-karnitín, ktorá sa hojne využíva ako potravinový doplnok pri chudnutí, športovaní či prevencii; druhá forma nemá v ľudskom tele žiadnu funkciu, pri veľkom množstve môže byť toxická)

calpastatin-u⁵⁹, prirodzeného spomaľovača kalpainu. Takže kalpain sa ukázal byť neužitočným cieľom ako liek na DMD. Klinická skúška, ktorú plánovala spoločnosť CepTor, sa neuskutočnila.

Medzinárodné klinické skúšky s farmakologickými látkami. The Cooperative International Neuromuscular Research Group, CINRG, predstavuje spoluprácu 22 nemocníc v USA, Kanade, Belgicku, Taliansku, Švédsku, Argentíne, Austrálii a Indii. V rámci nej prebiehajú klinické skúšky s chlapcami s DMD. **Diana Escolarová** z Children's National Medical Center vo Washingtone, DC, ktorá organizuje a dohliada na tieto skúšky, hovorila o nedávno ukončených a ešte stále prebiehajúcich skúškach. Pre zdokumentovanie týchto štúdií boli vyvinuté štandardizované kontrolné metódy na meranie nielen svalovej funkčnosti, ale aj mnohých iných parametrov, vrátane kvality života.

Doktorka Escolarová nehovorila o dvoch nedávno skončených skúškach, ktoré boli prednedávnom publikované. Sú to skúšky s *kreatínom*⁶⁰ a *glutamínom*⁶¹, publikované v *Annals of Neurology* 58:151-155 (2005), ktoré ukázali mierne ale nie významné účinky na funkčnosť svalov a skúška s *oxatomidom*⁶², publikovaná v *European Journal of Pediatric Neurology*, 23. apríla, 2007, ktorá neukázala významné zlepšenie funkčnosti svalov.

Doktorka Escolarová potom prezentovala prvé výsledky otvorenej skúšky vo fáze-I/II pilotnej štúdie *pentoxifylínu*⁶³ na chlapcoch s DMD, ktorí minimálne posledný jeden rok pred ich prihlásením do skúšky nedostávali steroidy. Boli to chlapci vo veku od 4 do 7 rokov. Skúška začala v marci 2002 a skončila v júli 2006. Na začiatku bol každý chlapec počas troch mesiacov pod lekárskeym dohľadom a potom bol liečený počas 12 mesiacov. Účinok liečby bol meraný kvantitatívnymi testmi funkčnosti svalov a tiež pomocou množstva iných testov. Osem chlapcov opustilo štúdiu predčasne. Niektorí z nich kvôli vedľajším účinkom ako bola leukopénia⁶⁴.

Najdôležitejším, avšak negatívnym výsledkom bolo, že rok liečby pomocou pentoxifylínu *bol neúspešný* pokiaľ vyžadujeme významné zvýšenie svalovej sily a funkčnosti. Hoci chlapci nedostávali steroidy, nevyskytlo sa ani žiadne *zhoršenie* sily svalov. Mohol by to teda byť stabilizujúci účinok liečby. Na odskúšanie toho, či je to skutočne tento prípad, sú potrebné väčšie kontrolné štúdie.

V septembri 2005 začala takáto štúdia, vykonávaná „dvakrát naslepo“, aj so 64 pacientmi s DMD staršími ako 7 rokov, ale ešte stále schopnými chôdze na vzdialenosť minimálne desať metrov. Ukončená bude v decembri 2007. Každý chlapec bude dostávať denne liek alebo placebo počas 12 mesiacov. Pacienti môžu byť na steroidoch alebo na iných pomocných zlúčeninách ako kreatín, glutamín, koenzým Q10 a pod., ale počas štúdie nemajú dovolené zmeniť túto liečbu.

⁵⁹ **Calpastatin** - ľudský gén, známy aj ako CAST

⁶⁰ **Kreatín** - organická kyselina, ktorá prispieva u cicavcov k zásobovaniu svalov energiou

⁶¹ **Glutamín** - je neesenciálna biogénna aminokyselina, jedna z dvadsiatich aminokyselín, ktoré sa pri syntéze bielkovín zabudovávajú do novo vzniknutých bielkovín. Okrem svojej úlohy ako súčasť proteínov má dôležitú úlohu tiež pri detoxikácii amoniaku a udržovaní dusíkovej rovnováhy v organizme.

⁶² **Oxatomid** - piperazínové (piperazín - organická látka rozpúšťajúca kyselinu močovú) antihistaminikum (látka používaná pri precitlivelosti organizmu, napr. pri liečbe alergií)

⁶³ **Pentoxifylín** - látka zo skupiny xantínových derivátov; zlepšuje prietok krvi cievnym riečišťom tým, že zväčšuje pružnosť červených a bielych krviniek, potlačuje zhlukovanie krvných doštičiek, znižuje viskozitu krvi a tlmí nežiaducu zvýšenú prezápalovú aktivitu bielych krviniek. Takto zlepšuje krvný obeh a vyživovanie tkanív v miestach zhoršeného prietoku

⁶⁴ **Leukopénia** - (nazývaná aj leukocytopénia) je odborný medicínsky termín pre znížený počet bielych krviniek (leukocytov) v krvi pod hodnotu $4 \times 10^9/l$ (pod 4000 leukocytov v 1 ml krvi).

Fáza II otvorenej pilotnej štúdie s koenzýmom Q10 na 7 až 11 ročných chlapcoch s DMD ambulantne liečených steroidmi, začala v septembri 2001 a skončila v januári 2005. Počiatočná dávka 90mg/deň bola zvýšená na 400mg/deň, čo viedlo k cieľovej hladine séra minimálne 2,5µg/ml. Jediným vedľajším účinkom bola migréna u jedného chlapca po veľkej dávke, ktorá by mohla byť po redukcii dávky zmiernená. Chlapci boli liečení denne počas šiestich mesiacov a potom mali voľbu zotrvať na liekoch až do ukončenia štúdie.

Pri týchto pacientoch s DMD liečených pomocou steroidov, zvýšila liečba koenzýmom Q10 funkčnosť svalov priemerne o 7,3%. Táto funkčnosť bola meraná celkovými kvantitatívnymi svalovými testmi.

V marci 2006 bola na základe týchto výsledkov odštartovaná nepravidelná klinická skúška na kontrolu placebo efektu so 120 nechodiacimi pacientmi vo veku od 10 do 15 rokov, ktorej koniec sa očakáva v decembri 2008. Pacienti sú liečení denne počas 12 mesiacov v štyroch skupinách, pričom dostávajú buď dávku 0,75mg/kg/deň prednizonu alebo dávku séra koenzýmu Q10 s objemom 2,5µg/ml, alebo kombináciu oboch liekov. Výsledky liečby sa porovnávajú s pacientmi, ktorí sú pod dohľadom v rámci lepších štandardov starostlivosti, ale pri ktorých nie je použité placebo.

Výsledky všetkých skúšok budú publikované, akonáhle budú vyhodnotené. Informácie o týchto skúškach, ako aj o iných, sú na internete na www.clinicaltrials.gov.

Na záver svojej prezentácie Dr. Escolarová ukázala zoznam toho, čo ona, ako riaditeľka neuromuskulárnej kliniky Children's National Medical Center odporúča rodičom, aby poskytli svojim chlapcom s DMD:

- 1.) Okamžite po stanovení diagnózy by mala začať liečba *prednizonom* v dávkach 0,75mg/kg/deň alebo *deflazacortom* v dávkach 0,9mg/kg/deň (to iba vtedy, ak pacient alebo rodina je obézna a po konzultácii s výživovým odborníkom);
- 2.) podávanie *vitamínu D* a *vápnika*;
- 3.) *prísna diéta* založená na strave s vysokým obsahom proteínov, nízkym obsahom uhlíkovodíkov a tukov, t. j. chudé mäso, zelenina a ovocie;
- 4.) 5g *kreatínu* denne;
- 5.) dvakrát denne 0,3g/kg glutamínu;
- 6.) 200-400mg *koenzýmu Q10* denne;
- 7.) iné akceptované ale nie povzbudzujúce suplementy, v závislosti od rodičov to môžu byť napr. extrakt zo zeleného čaju, arginín⁶⁵ a antioxidanty ako Protandim⁶⁶.

Pokiaľ liečba steroidmi začala vo veku 2 až 4 rokov dieťaťa, tak prírastok váhy je menším problémom ako keby sa začalo v neskoršom veku. Znížený vzrast je iným vedľajším účinkom v ktoromkoľvek veku. Zmeny správania sú menším alebo prechodným problémom, pokiaľ sa s liečbou začne včas.

Akým spôsobom schvaľuje FDA lieky na DMD?

Tan Nguyen z kancelárie FDA pre vývoj „orphan“⁶⁷ produktov vo Washingtone vysvetlil na veľmi zaujímavej a optimistickej prezentácii, že organizácia FDA (viď poznámka 26) tu nie je na spomaľovanie alebo zastavenie vývoja najpotrebnejších liekov, ale že veľmi dobre rozumie obavám a starostiam rodín detí s neliečiteľným ochorením. V minulosti sa už toho urobilo veľa pre urýchlenie schvaľovacieho procesu liekov pre vzácne a závažné ochorenia ako DMD a na zníženie finančnej záťaže súvisiacej s ich vývojom.

⁶⁵ **Arginín** - kyselina 2-amino-5-guanidinovalérová aminokyselina; je to esenciálna aminokyselina.

⁶⁶ **Protandim** - patentovaný výživový doplnok, ktorý zvyšuje prirodzenú odolnosť organizmu voči antioxidantom.

⁶⁷ špeciálny druh liekov; skrátene sa dá povedať, že sú to vo všeobecnosti lieky na vzácne ochorenia

Pôvodný federálny zákon o jedle, liekoch a kozmetike vstúpil do platnosti v roku 1938 po nešťastí, ktoré spôsobil elixír sulfanilamid⁶⁸, po ktorom v USA zomrelo 107 pacientov. Do roku 1962 však FDA mohla iba vyvíjať tlak na výrobcov, aby preukazovali bezpečnosť svojich liekov. Potom, ako sa v Nemecku kvôli talidomidu⁶⁹, pod obchodným názvom *Contergan*, narodilo viac ako 10 000 deformovaných detí, sa len tak-tak podarilo zabrániť dokonca väčšej katastrofe aj v USA a to vďaka oneskoreniu jeho schvaľovania kvôli nedostatočným údajom o jeho bezpečnosti. Proces schvaľovania liekov zo strany FDA bol radikálne zmenený v októbri 1962 doplnením Kefauver-Harrisových doplnkov. Odvtedy sa od výrobcov vyžaduje nielen dôkaz o bezpečnosti lieku, ale tiež to, aby dokázali, že pre FDA je efektívne schváliť konkrétny liek na jeho následný predaj.

Vývoj „non-orphan“ liekov (opak od „orphan“) musí prejsť nasledovnými štádiami:

- 1.) Predklinická fáza zahrňujúca laboratórne štúdie a skúšky na zvieratách, ktoré trvajú priemerne 6,5 roka s nákladmi na vyhodnotenie ich bezpečnosti, biologickej aktivity a chemických vzorcov vo výške asi 1 až 12 miliónov dolárov.
- 2.) *Fáza I* klinického výskumu na 100 až 200 zdravých dobrovoľníkoch (s trvaním priemerne 1,5 roka) na stanovenie bezpečnostného profilu lieku na ľudí
- 3.) *Fáza II* klinického výskumu na 100 až 500 pacientoch (s trvaním priemerne 2 roky) na určenie optimálnej dávky a vyhodnotenie bezpečnosti a účinnosti lieku
- 4.) *Fáza III* klinického výskumu na 1 000 až 5 000 pacientoch (s trvaním priemerne 3,5 roka) na potvrdenie bezpečnosti lieku a jeho účinnosti pri dlhodobom používaní.

Náklady všetkých troch klinických výskumných fáz sa pohybujú okolo 15 až 300 miliónov dolárov. Preto môže byť celkový čas na vývoj lieku až do 15 rokov pri priemerných nákladoch okolo 360 miliónov dolárov. Vo všeobecnosti sa dá povedať, že z 5 000 vyhodnocovaných zlúčenín len jedna dostala povolenie a dostala sa na trh. Pri vývoji „orphan“ liekov pre ochorenia ako DMD s limitovaným počtom pacientov, nemôžu byť aplikované všetky vyšetrovacie postupy. Musia byť teda kreatívne modifikované v rámci pevného regulačného rámca.

Keď sú predklinické štúdie skončené, predloží navrhovateľ lieku na FDA *Prihlášku na výskum nového lieku* za účelom získania povolenia na vykonávanie klinických skúšok s týmto liekom. Po skončení všetkých fáz klinických skúšok vyplní navrhovateľ *Prihlášku nového lieku* za účelom začatia konečnej fázy schvaľovacieho procesu, ktorý umožní vypustenie lieku na trh. Schvaľovací proces zo strany FDA zahŕňa posúdenie údajov z predklinických a klinických skúšok na podoprenie bezpečnosti a účinnosti lieku. Trvá to vo väčšine prípadov jeden rok, alebo menej, s nákladmi viac ako milión dolárov.

Liek sa nazýva „orphan“, keď je - okrem iných definícií - určený na liečbu vzácných ochorení postihujúcich menej ako 200 000 ľudí (platí to pre USA). Keďže v USA žije asi okolo 10 000 chlapcov s DMD, je DMD považovaná za vzácné ochorenie a liek vyvíjaný za účelom liečby DMD môže byť považovaný za „orphan“ liek. Šesť potenciálnych liekov na DMD už dostalo označenie „orphan“ liek: mazindol, oxandrolón, PTC124, 2'-O-methyl AONy na preskok exónu, Leupeptín a Idebenone. Žiaľ, niektoré z nich už nie sú súčasťou klinického vývoja, a to z rôznych dôvodov. Až doposiaľ vydal FDA cez 300 povolení pre „orphan“ lieky spolu na 180 rôznych vzácných ochorení.

⁶⁸ **Sulfanilamid** - zložka antibakteriálnych liečiv

⁶⁹ **Talidomid** - od 50. rokov do začiatku 60. rokov 20. storočia bol v 48 štátoch používaný ako upokojujúca (sedatívum) a uspávajúca látka (hypnotikum) pre tehotné ženy. Bol však zakázaný, pretože sa ukázalo, že ide o silný teratogén (fyzikálny alebo chemický faktor prostredia, ktorý vyvoláva vznik malformácie, vrodenej poruchy či narušenie vývoja určitého orgánu alebo celého organizmu počas embryonálneho či fetálneho vývoja plodu)

Keď spoločnosť vyvíja „orphan“ liek, dostane prostredníctvom tohto procesu množstvo finančných stimulov. Sú to

- 1.) 50% oprávnených výdavkov na vývoj lieku si môže odpísať pri podávaní dani z príjmu,
- 2.) odpustenie štandardného poplatku zo strany FDA za podanie prihlášky na uvedenie produktu na trh, ktorého výška je okolo milión dolárov
- 3.) sedemročná marketingová exkluzivita v zmysle prideleného povolenia na vstup produktu na trh.

Spoločnosť tiež môže vstúpiť do súťaže o iné granty pre „orphan“ lieky vo výške až 400 000 dolárov ročne, a to až počas štyroch rokov (spolu teda 1,6 milióna dolárov) na uhradenie nákladov spojených s klinickými skúškami. Malo by sa zdôrazniť, že v niektorých prípadoch je možné potenciálne skrátenie schvaľovacieho procesu až na tri roky prostredníctvom súhlasu v zmysle „Subpart E⁷⁰“. To sa dá dosiahnuť hlavne schválením lieku na základe adekvátnych údajov z klinických výskumov vo fáze II. Ešte neschválené lieky v štádiu prebiehajúcich výskumov, ktoré sa však sľubne ukazujú ako bezpečné a efektívne, môžu získať povolenie na podávanie pacientom s vážnymi alebo okamžitými život ohrozujúcimi ochoreniami v rámci akéhosi programu ich milosrdného použitia a to iba v tom prípade, ak neexistuje prijateľná alternatíva liečby.

Aj „orphan“ lieky musia byť bezpečné a účinné.

Medzi mnohými odpoveďami, ktoré musel dať Dr. Nguyen na rôzne otázky po skončení jeho prezentácie, boli aj nasledujúce dve:

„Dnes sa nedá so zodpovedajúcou určitosťou predikovať, či každý zo všetkých možných antisense oligonukleotidov, ktoré majú rozličné postupnosti, musí podstúpiť celý schvaľovací proces tak, ako v prípade nového lieku. Bolo by fajn, keby sa to týkalo iba prvého AONU z každého typu a pre ostatné by sa tento proces o niečo skrátil. Je opodstatnené si myslieť, že komunita okolo ľudí s DMD by mala dopredu na tento problém myslieť a na niektorých verejných fórach mala by poskytovať primerané návrhy alebo odporúčania.“

„FDA trvá na tom, že schvaľovanie „orphan“ liekov je podriadené tým istým vysokým štandardom bezpečnosti a účinnosti, aké platia pre „non-orphan“ lieky. FDA je dokonca citlivá na názory niektorých rodičov, ktorí tvrdia, že keďže je toto ochorenie také závažné, tak by radšej okamžite dali svojim chorým synom síce neschválený, ale zato potenciálne účinný liek a nečakali by dlhé roky. Aj keby to významne zvýšilo riziko a mohlo by sa stať niečo negatívne.“

Kate Bushbyová v súvislosti s tým povedala (uvádzam tu jej slová pokiaľ možno čo najpresnejšie): „Vieme, že musíme rýchlo do pacientov dostať niečo, čo funguje. Ale musíme minimalizovať všetky riziká. Nechcem dať šesťročnému chlapcovi niečo, čo možno ani nebude účinkovať, pretože DMD nezabije šesťročného chlapca hneď zajtra. Človek sa z fázy I nenaučí dostatok, aby to mohol extrapolovať do dlhodobej liečby. Každé štádium skúšky vám povie niečo iné. V každom štádiu môže liek zlyhať, hoci my si to neželáme, ale môže sa to stať. Tiež sa môžu stať aj smrteľné prípady! Pokiaľ doktor aplikuje liek po skončení fázy I a vo fáze II sa ukáže, že je nebezpečný, môže mať potom problémy so zákonom. Pokiaľ chcete, aby sa liek rozšíril do celej spoločnosti, musí prejsť regulačným procesom. Iba tak sa môže stať dostupným všetkým, ktorí ho potrebujú, a to aj po stránke jeho ceny. Pokiaľ hľadáte skratky a dostanete sa na zlú cestu, problémy tým iba oddialíte. Človek tomu musí

⁷⁰ Je to popis oficiálneho legislatívneho postupu, ktorý umožňuje vydať povolenie aj na základe náhradného cieľa alebo na základe iného lekárskeho cieľa, než je prežitie alebo odvrátenie smrti, alebo môže produkt dostať povolenie s obmedzeniami v dôsledku zabezpečenia jeho bezpečného použitia

nechať čas a musí zozbierať všetky nevyhnutne potrebné údaje. Bolo by veľmi zlé, keby sa liek, schválený po krátkodobých skúškach, ukázal počas dlhodobej liečby ako nebezpečný. Potom by musel byť stiahnutý. Rodičia nemôžu akceptovať zodpovednosť a jednoducho len podpísať papier, ktorým na seba preberajú zodpovednosť. To by bolo neetické. A čo sa stane, ak váš syn zomrie? My máme zodpovednosť za pacientov a tiež aj za rodičov.“

TREAT-NMD, sieť excelentnosti Európskej Únie.

Serge Braun, riaditeľ vedeckého výskumu Francúzskej asociácie muskulárnych dystrofií (AFM⁷¹), najprv opísal túto veľmi aktívnu patientskú organizáciu. Bola založená v roku 1958. Dnes má 75 klinických centier vo Francúzsku a v krajine je známa kvôli jej „Téléthon-u“. Je to každoročné 30 hodinové televízne vysielanie počas prvého decembrového víkendu. Potom, ako bola táto akcia v roku 1987 odštartovaná s pomocou *Jerryho Lewisa* a vymodelovaná na základe amerického „Telethonu⁷²“, získa sa len týmto spôsobom každoročne priemerne 140 miliónov dolárov. Celý rozpočet asociácie na rok 2006 bol 170 miliónov dolárov, z ktorých 88 miliónov bolo použitých na financovanie cca. 400 výskumných projektov na liečbu nervovosvalových ochorení (NSO). Medzi nimi bolo okolo 100 projektov mimo Francúzska, vrátane USA.

Dr. Brown potom vysvetlil, ako si AFM a iné Európske patientské organizácie začali uvedomovať, ako minimálne sú v jednotlivých krajinách koordinované aktivity na výskum liečby, diagnostiky a starostlivosti o pacientov s NSO. S ohľadom na vážne dôsledky týchto vzácnych ochorení je to neakceptovateľný stav. Členka AFM *Françoise Salama*, ktorá má syna s DMD, spolu s mnohými kolegami z celej Európy, lobovala u Európskej komisie za poskytnutie financií na integráciu aktivít v tejto oblasti. Boli v tom veľmi úspešní - v roku 2004 sa objavila výzva na vznik siete excelentnosti. Cieľom takýchto sietí je „posilnenie vedeckej a technologickej kvality v hlavných výskumných oblastiach, a to tak, že na Európskej úrovni sa integruje minimálne potrebné množstvo zdrojov a odborných znalostí, ktoré sú potrebné na tvorbu progresívnej a stálej integrácie výskumných kapacít všetkých partnerov zapojených v sieti, ktorými sú výskumníci známi organizáciám združeným v TREAT-NMD“. Vzhľadom na dlhotrvajúci prihlasovací proces bol program TREAT-NMD schválený v decembri 2006 s rozpočtom 10 miliónov Eur (okolo 15 miliónov amerických dolárov) na 5 rokov. Aktívna činnosť začala v januári 2007.

TREAT-NMD je v súčasnosti *sieť excelentnosti, ktorá bude zdieľať vedecké poznatky medzi základnými a klinickými akademikmi a priemyselnými partnermi, aby vyvinula technologické a metodologické nástroje s výhľadom na urýchlenie vypracovania nových liečebných postupov na liečbu NSO.*

TREAT-NMD má svoje kancelárie na univerzite v Newcastli v Anglicku, je koordinovaná *Kate Bushbyovou* a *Volkerom Straubom* a má Vedecký a technologický poradný zbor na čele s *Marianne de Visserovou* z Amsterdamskej univerzity. Internetová stránka TREAT-NMD je www.treat-nmd.eu a okrem veľkého množstva informácií obsahuje aj pomerne často publikovaný leták, ktorý je zároveň posielaný na viac ako 1000 adries, ktoré má na svojom zozname.

Po tomto úvode *Dr. Brauna* nasledovala prezentácia *Kate Bushbyovej* s názvom *TREAT-NMD v akcii, prvých šesť mesiacov*. Najdôležitejšie ciele TREAT-NMD sú:

⁷¹ AFM - Association Française contre les Myopathies

⁷² **Telethon** - druh televíznej verejnej zbierky trvajúcej niekoľko hodín alebo dní s cieľom získať peniaze na charitu či z iných dôvodov

- 1.) Podporovať medzinárodnú spoluprácu zameranú na vývoj liečebných postupov na DMD a na vrodené svalové dystrofie, ako aj na spinálne svalové atrofie
- 2.) Propagovať viacnásobné liečebné prístupy navrhovaním a koordinovaním klinických skúšok
- 3.) Hľadanie pacientov, ktorí by sa zúčastňovali na skúškach, tvorbou medzinárodných databáz
- 4.) Tvorba štandardov pre klinické skúšky a tak umožnenie porovnávania ich výsledkov s inými podobnými skúškami
- 5.) Vývoj medzinárodne akceptovaných štandardov starostlivosti a diagnostikovania
- 6.) Distribúcia najnovších vedomostí o výskume, diagnostikovaní a starostlivosti všetkým pacientom, ich rodinám a liečebným centrom, a to špeciálne tým, ktoré sa nachádzajú v „menej privilegovaných“ častiach sveta.

TREAT-NMD má 21 aktívnych partnerov - univerzít, patientských organizácií, vládnych agentúr, biotechnologických spoločností a jednotlivcov naprieč celou Európou. Predovšetkým všetci títo sú zodpovední za šírenie cieľov TREAT-NMD. Sieť spolupracuje so skupinami z celého sveta a noví spolupracovníci v tejto dôležitej oblasti sú stále vítaní.

Dr. Bushbyová potom spomenula štyri príklady súčasných a budúcich aktivít:

- 1.) Vytvorenie medzinárodného registra pacientov v spolupráci s existujúcimi registrami tak, že bude existovať štandardizovaná minimálna sada klinických a diagnostických informácií o pacientoch, ktorá bude použitá na vývoj a budúce riadenie nadnárodnej databanky. To by umožnilo identifikovať vhodných pacientov na účely klinických skúšok, ďalej zber, monitoring a porovnanie údajov pacientov, ktorí podstupujú rôznu dlhodobú liečbu a informácie jednotlivých rodín o výhodách výskumu a starostlivosti.
- 2.) Stanovenie najpokročilejších štandardov starostlivosti v spolupráci s Center of Disease Control and Prevention (CDC⁷³) v Atlante v USA. Práca na tomto projekte už začala. Bude pokrývať všetky aspekty riadenia pacientov z hľadiska lekárskeho a sociálneho. Bude sa musieť hľadať cesta na uistenie, že všetkými liečebnými centrami, pričom kľúčovou bude spolupráca a partnerstvá s patientskými organizáciami, ktorá by mala byť cestou, ako preberanie odporúčaní zaistiť.
- 3.) Štandardizovať klinické výstupné merania pre skúšky, t.j. spôsob, akým budú merané klinické zmeny. V máji a v júni 2007 sa už na túto tému konali dva workshopy.
- 4.) Pri univerzite vo Freiburgu v Nemecku vzniklo Clinical Trials Coordination Center (CTCC), ktoré vyvinie odporúčania pre návrh klinických skúšok pre vzácne ochorenia v spolupráci s farmaceutickými spoločnosťami a regulátormi.

Na záver svojej prezentácie Dr. Bushbyová povedala, že TREAT-NMD je obrovská príležitosť pre celú komunitu okolo DMD na posun vpred, a že *TREAT-NMD je už aktívna*. Kontaktovať kanceláriu v Newcastli môžete e-amilom na info@treat-nmd.eu, vždy sa potešia vašim otázkam a nápadom.

Prečo potrebujeme vedieť presnú mutáciu?

Robert Weiss z University of Utah v Salt Lake City odpovedal na túto otázku, ako to urobil v roku 2006 na stretnutí v Cincinnati *Kevin Flanigan*. Nasledujúci text využíva sumár z prezentácie Dr. Flanigana ako základ s niektorými doplnenými informáciami.

U chlapcov, u ktorých je podozrenie na DMD, by mala byť presne určená mutácia, aby sa potvrdilo, že ide skutočne o DMD a nie o nejaké iné svalové ochorenie, napr. jednu z mnohých pletencových dystrofií, ktoré by mohli vykazovať podobné symptómy. Ak

⁷³ CDC - the Center for Disease Control and Prevention; agentúra v USA, slúžiaca na ochranu verejného zdravia a bezpečnosť poskytovaním informácií na zlepšenie rozhodnutí v zdravotníctve a podporuje zdravie obyvateľstva cez partnerstvá so štátnymi oddeleniami pre zdravie a s inými organizáciami

mutácia preukáže, že čítací rámec dystrofínu mRNA je posunutý, potom je veľmi pravdepodobné, že ide o DMD, zatiaľ čo mutácie, ktoré nechávajú čítací rámec neporušený, naznačujú vo väčšine prípadoch BMD. Poznanie presnej mutácie umožňuje zlepšiť konzultácie o genetických problémoch s rodinami chlapcov a s ich príbuznými z matkinej strany, medzi ktorými môže byť identifikovaný prenášač DMD. Napokon, niektoré potenciálne nové liečebné postupy, ako napr. preskok exónu či prečítanie stop kodónu pomocou PTC 124, vyžadujú detailné poznatky o mutácii pacientovho génu dystrofínu, pretože sú tzv. *mutation specific* (t.j. použiteľné na konkrétnu mutáciu).

Na odhalenie mutácie odstránenia alebo duplikácie, sa používa v súčasnosti široko rozšírená analytická metóda *MLPA*⁷⁴ (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), ktorú vyvinul Dr. Jan Shouten zo spoločnosti MRC-Holland v Amsterdame. Pre tento genetický test, ako aj pre iné testy, je nevyhnutných iba 5 až 10ml úplnej EDTA⁷⁵ krvnej vzorky pacienta, z ktorých je izolovaný genetický materiál, a to z buniek bielych krviniek. Pacient nemusí chodiť do laboratória, krvná vzorka môže byť poslaná aj poštou.

Nasleduje veľmi stručný popis celej procedúry: použije sa 158 oligonukleotidov so špeciálne navrhnutými sekvenciami, určenými na pripojenie k dvom miestam každého zo 79 exónov dystrofínu. Ak je exón prítomný, dva oligonukleotidy, navrhnuté na jeho konkrétnu postupnosť, sa naviažu na dve miesta a potom sú s enzýmom navzájom chemicky spojené. Takto pospájané oligonukleotidy slúžia ako šablóna na multiplikáciu, resp. akési namnoženie exónu pomocou polymerázovej reťazovej reakcie - PCR⁷⁶, čo je veľmi výkonná rozmnožovacia metóda. Zväčšený produkt sa potom po elektroforetickej separácii dá vidieť ako vrchol grafu. Ak príslušný exón nie je prítomný, pretože je zmazaný, dva oligonukleotidy určené pre tento exón sa nemôžu naviazať na exónovú postupnosť a teda sa nemôžu navzájom spojiť a zodpovedajúci vrchol na grafe potom chýba.

Táto technika dokáže detekovať prítomnosť mutácie odstránenia a väčšinu mutácií duplikácií všetkých 79 exónov génu dystrofínu u pacientov s DMD. Nedokáže však rozoznať bodové mutácie. Keďže je to kvantitatívna metóda, mutácie odstránenia a duplikácie môžu byť identifikované iba v jednom z dvoch génov dystrofínov u žien, ktoré sú nosičmi DMD, a to dokonca aj vtedy, ak mutácia odstránenia a duplikácie u pacientov v príbuzenstve nie je známa. To je jednou z najdôležitejších výhod tejto metódy.

Avšak v ojedinelých prípadoch polymorfie (mnohotvárnosti) alebo mutácie na strane, kde sa sonda *MLPA* pripája na génovú postupnosť, sa môžu vyskytnúť pozitívne výsledky, ktoré naznačujú mutáciu odstránenia jedného exónu, aj keď tam žiadna nie je. Polymorfia je zmena, ktorá nespôsobuje ochorenie bázy v DNA. Preto keď sa metódou *MLPA* identifikuje mutácia odstránenia jedného exónu, požaduje sa potvrdenie tohto nálezu pomocou inej metódy.

Ak sa pomocou metódy *MLPA* nenašla iná mutácia, pacient môže mať ešte stále bodovú mutáciu. Pomocou sekvenčnej techniky zosilnenia pri jednoduchých podmienkach/zosilnenia vnútorného primera (**S**ingle **C**ondition **A**mplification/**I**nternal **P**rimer) *SCAIP*, ktorá bola vyvinutá v laboratóriu Dr. Flanigana, je možné nájsť a detailne popísať bodové mutácie, vrátane predčasného stop kodónu, malých mutácií odstránenia alebo vloženia, ako aj mutácie na spájacích miestach. Touto dvojstupňovou metódou je možné stanoviť kompletnú báзовú postupnosť všetkých exónov génu dystrofínu, ako aj všetkých oblastí na hranici medzi

⁷⁴ **MLPA** - je to zmena reakcie polymerázového reťazca, ktorá umožňuje viacerým cieľom byť zosilnená použitím iba jediného páru primerov (je reťazec nukleovej kyseliny dlhý niekoľko báz, ktorý slúži ako počiatočné miesto replikácie DNA, bez ktorého by DNA polymeráza nemohla začať syntézu nového reťazca)

⁷⁵ **EDTA** - je to skratka od ethylenediaminetetraacetická kyselina, ktorá sa v medicíne používa o.i. akoantikoagulant (látka proti zrážaniu krvi)

⁷⁶ **Polymerázová reťazová reakcia** - je metóda rýchleho a jednoduchého namnoženia rovnakého úseku DNA.

intronmi/exónmi so spájacími signálmi a taktiež aj všetkých promotórov. Všetky tieto separované génové oblasti sú najprv znásobené pomocou jedinej PCR a potom priamo sekvenované použitím štandardnej metódy na sekvenovanie génov na stanovenie bodovej a iných mutácií.

Najnovšia metóda vysoko efektívnych a presných genetických analýz génu dystrofinu je dostupná použitím nových platforiem na báze mikropolí, nazývaná ako technológia genetických čipov (z angl. „gene-chip technology“). Takýto test s použitím genetických čipov v prípadoch rozsiahlych mutácií odstránenia a duplikácie a malých bodových mutácií, je momentálne dostupný v Emory University v Atlante (popísané je to v ďalšej kapitole o programe CETT). Plánuje sa, že metódy na základe genetických čipov budú ponúkané v rámci medzinárodnej siete klinických laboratórií.

S týmito testovacími metódami - MLPA, SCAIP a metóda genetických čipov - môže byť nájdených až 95-98% všetkých mutácií. Avšak zvyšných 2-5% môže chýbať. Pokiaľ pacient vykazuje definitívne príznaky DMD alebo BMD, ale z krvnej vzorky sa nedala určiť mutácia, príde čas pre vykonanie svalovej biopsie. Tak sa pomocou špeciálnych detekčných metód preukáže prítomnosť alebo absencia proteínu dystrofinu vo svalových vláknach. Technika *western blot*⁷⁷ má výhodu v tom, že indikuje množstvo a veľkosť proteínu dystrofinu, avšak väčšinou sa používa *imunofluorescenčná* metóda, pretože keď je dystrofin prítomný, dá sa dosiahnuť, aby bol jasne viditeľný pod mikroskopom. Bunkové membrány svalových vlákien vo vzorke svalu z biopsie od pacienta s DMD zostávajú tmavé. Vzorky od zdravých pacientov vykazujú neprerušované ostré čiary fluorescentného svetla a pri vzorkách pacientov s BMD sú tieto ostré svetelné čiary viditeľné len miestami.

Dr. Johan den Dunnen z Leidenského univerzitného medicínskeho centra poslal správu, ktorá hovorí, že údaje o DNA nie sú dostatočné na zhodnotenie, čo sa na úrovni mRNA deje a teda nie je možné sa rozhodnúť, ktorý AON použiť pri liečbe preskokom exónu. Zverejnené údaje ukazujú, že u 5 až 10% pacientov s DMD s mutáciou odstránenie alebo duplikácia neboli výsledky také, ako sa očakávalo. Teda skôr ako je takáto liečba začatá, zo svalovej alebo kožnej biopsie by mala byť izolovaná mRNA a sekvenovaná okolo miest prerušení pri mutácii odstránenie alebo duplikácia na potvrdenie toho, čo sa predpokladalo pri testoch DNA. Táto skúška bola vykonávaná pre všetkých chlapcov s DMD, ktorí sa podieľali na prvej klinickej skúške preskoku exónu v Holandsku. Ďalej boli použité vypestované bunky na odskúšanie, či liečba preskoku exónu mala účinky, aké sa požadovali. T.j., že posledný nukleotid pred odstráneným exónom alebo exónmi bol spojený s prvým nukleotidom za odstránenými exónmi bez posunutia čítacieho rámca. mRNA môže byť tiež použitá na nájdenie vzácných mutácií, ktoré spôsobujú začlenenie intronových fragmentov medzi exóny v pospätanej dystrofinovej mRNA.

Začala sa nová éra genetických testov na DMD.

CETT (Collaboration, Education and Test Translation Program). Tento program odprezentovala **Madhuri Hegdeová** z Emory University School of Medicine v Atlante, v Georgii. Projekt je spoločným vývojovým projektom a je podporovaný Centres for Disease Control and Prevention v Atlante (viď poznámka 73), Office of Rare Disorders of the National Institutes of Health⁷⁸ v Bethesde pri Emory University v Atlante, American Society

⁷⁷ **Western blot** - je technika na báze elektroforézy a enzymatickej reakcie, hojne využívaná v imunológii, molekulárnej biológii a medicíne k detekcii špecifických protilátok. Touto metódou sa v praxi diagnostikuje rad infekčných ochorení človeka a zvierat.

⁷⁸ Kancelária pre vzácne ochorenia pri národnom inštitúte zdravia (viď poznámka 56)

of Human Genetics⁷⁹, American College of Medical Genetics⁸⁰, Society for Inherited Metabolic Disorders⁸¹ a Genetic Alliance⁸². Táto spolupráca sa začala v roku 2006 s cieľom zmeniť neuspokojivý prenos genetických testov z výskumu do klinických laboratórií pre vzácne ochorenia:

- 1.) podporou klinickej a výskumnej spolupráce na vývoj vysokokvalitných genetických testov
- 2.) podporou zberu genetických a klinických údajov do verejných databáz na presadzovanie výskumu na dosiahnutie liečby
- 3.) vývojom smerníc pre laboratórne testovanie
- 4.) podporovaním a distribuovaním najnovších informačných materiálov pre pacientov, ich rodiny a pre zdravotnícky a opatrovateľský personál, ktorý sa o nich stará.

Detaily o programe CETT môžete nájsť na Internete na www.cettprogram.org.

DMD bola jednou z prvých skupín ochorení, na ktoré bol použitý model programu CETT na vývoj spolupráce medzi zainteresovanými stranami - zástupcami lekárov, výskumníkov a pacientov. Vďaka snahe mnohých ľudí, ako bol v minulosti *Jerry Lewis* z MDA a v súčasnosti je to *Patricia Furlongová* z PPMD, sú problémy a potreby okolo 10 000 chlapcov s DMD v USA známe nielen širokej verejnosti, ale aj politikom vo Washingtone a v hlavných mestách ostatných štátov. Spolupráca medzi CETT a PPMD vlastne dosiahla svoj prvý dôležitý cieľ. Tým je legalizácia a implementácia testovacej metódy na základe mikropolí, použitím *genetických čipov* pre diagnostiku DMD na Emory University, slúžiacej na rozpoznanie mutácie v géne dystrofínu. Testovanie na báze mikropolí je extrémne citlivé a veľmi rýchle. Legalizácia v tomto kontexte znamená, že výsledky získané na základe metódy genetických čipov z mnohých vzoriek od pacientov s DMD a od nosičov s rôznymi mutáciami, boli porovnávané s výsledkami získanými pomocou iných uznaných skúšobných metód na tých istých vzorkách. Vo všetkých prípadoch sa dospelo k rovnakým výsledkom.

Nový test pomocou metódy genetických čipov. V druhej časti svojej prezentácie *doktorka Hedgeová* popísala tento nový test pozostávajúci z dvoch krokov. Krok jeden používa pole CGH (*Comparative Genome Hybridization*⁸³) celej genetickej postupnosti dystrofínu v dĺžke 2.2 milióna bázových párov. V tomto kroku sa dajú identifikovať mutácie odstránenie a duplikácia v exónoch. Krok dva sa stáva nevyhnutným, ak sa v kroku jeden nepodarí identifikovať ani jednu z uvedených mutácií.

Krok 1: Tieto genetické čipy sú tlačené spoločnosťou Roche-NibleGen Systems Inc. v meste Madison vo Wisconsin. Na sklíčko s rozmermi 1x3 palce (25x76mm) je pomocou autorizovanej techniky, nazývanej „Maskless Array Synthesizer“ syntetizovaných 400 000 DNA oligonukleotidov, označovaných ako skúšobné oligá a tieto sú spojené do pravidelných tvarov, nazývaných *pole*. Oligá sú dlhé približne 45 až 60 báz a pokrývajú (dvojmo) 2,2 milióna bázových párov génu dystrofínu. Oligá sú syntetizované so želanou postupnosťou

⁷⁹ Americká spoločnosť ľudskej genetiky - slúži vedcom vo výskume, profesionálnym lekárom a verejnosti a úposkytuje im informácie z oblasti genetiky, organizuje rôzne fóra, lobuje za podporu výskumu, poskytuje vzdelanie budúcim genetikom a pod.

⁸⁰ Americká vysoká škola lekárskej genetiky - organizácia pozostávajúca z biochemických, klinických, cytogenetických, lekárskech a molekulárnych genetikov, konzultantov a iných profesionálov, ktorí sa zaviazali slúžiť lekárskej genetike

⁸¹ Spoločnosť pre dedičné choroby metabolizmu - združuje odborníkov a napomáha výskumu v tejto oblasti, založila sieť centier na liečbu a diagnostikovanie týchto chorôb s cieľom sprístupniť ich pacientom

⁸² Genetická aliancia - zastrešujúca organizácia pre všetky organizácie na obhajobu záujmov ľudí so špecifickými ochoreniami

⁸³ CGH - molekulárna cytogenetická metóda na analýzu kópií množstva zmien (zisky/straty) v DNA, ktoré sa nachádzajú v DNA subjektu a často aj v tumoroch

génu dystrofínu priamo na sklíčko. Vzorka obsahujúca DNA pacienta je najprv nastrihaná na menšie kúsky približne rovnakej dĺžky ako sú skúšobné oligá a sú označené fluorescentnou farbou. Keď je táto vzorka rozložená ponad celé pole, pacientova DNA sa môže špecificky viazať, hybridizovať (krížiť sa), pomocou Watson-Crickových básových párov (viď poznámka 23) s komplementárnymi skúšobnými oligami v poli na sklíčku. Tie skúšobné oligá, ktoré sa skombinovali s partnermi z pacientovej vzorky potom môžu byť viditeľné a zaznamenané pomocou fluorescentného svetla produkovaného farbou na pacientovej vzorke po jej osvetlení ultrafialovým svetlom. Pokiaľ pacientov gén obsahoval mutáciu odstránenie, zodpovedajúce skúšobné oligá zostanú samotné - nehybridizované - a teda neprodukujú žiadne svetlo. Keď sú postupnosť a pozícia nehybridizovaných skúšobných olig známe, hranice mutácie odstránenia (body zlomu) môžu byť v géne stanovené s veľmi veľkou presnosťou. Keď sú nejaké exóny duplikované, spárovaných je dvakrát toľko skúšobných olig so svojimi partnermi, takže intenzita nimi produkovaného fluorescentného svetla je dvakrát silnejšia.

Výsledky tejto metódy sú kvantitatívne, preto môžu byť mutácie odstránenie a duplikácia rozpoznané nielen v jednom géne dystrofínu chlapcov s DMD, ale aj v každom z dvoch génov dystrofínov žien. Teda testovanie pomocou genetického čipu môže pomôcť určiť, či žena je alebo nie je nosičkou DMD, čo je veľmi dôležité pre presné genetické poradenstvo. Keďže táto metóda detekuje mutácie na úrovni samotného génu, má výhodu v tom, že hľadá *približné body prerušenia* mutácií odstránenia a duplikácie, t. j. začiatky a konce týchto mutácií, ktoré sú vo väčšine prípadov vo vnútri intrónov. To môže byť dôležitým objavom pri ďalšom skúmaní dôvodov vzniku rôznych klinických symptómov pacientov s rovnakou mutáciou. Je čoraz jasnejšie, že intróny nie sú genetický odpad, ale že obsahujú regulačné postupnosti, ktoré by, o. i., mohli ovplyvniť vývoj niektorých klinických príznakov. Ak sú porušené mutáciou odstránenie, je možné, že by to mohlo viesť k rozdielom v klinických symptómoch.

Krok 2: Ak sa v Kroku 1 nepodarí identifikovať ani mutáciu odstránenie ani duplikáciu, na rad prichádza Krok 2, ktorý dokáže identifikovať bodové mutácie, ako napríklad malé mutácie odstránenie alebo vloženie. Pre túto druhú časť analýzy je použité tzv. *Resequencing Array* (opätovne sekvenované pole), ktoré pozostáva zo 47 000 básových párov. Umožňuje hľadanie bodových mutácií

- 1.) vo všetkých 14 000 básových pároch všetkých exónov v dystrofíne
- 2.) v 8 promotóroch génu dystrofínu
- 3.) v intrónových sekvenciách dĺžky 100 básových párov v hraničných oblastiach všetkých 79 exónov
- 4.) v sekvenčnej oblasti okolo piatich známych vzácných mutácií vo vnútri intrónov.

Tento krok - resequencing⁸⁴ (opätovné sekvenovanie) - overuje pri každom nukleotide v cieľových oblastiach génu dystrofínu, či je prítomná bežná báza, alebo či bola nahradená jednou z troch iných možných báz, alebo či bola báza odstránená či vložená nejaká iná extra báza.

Bodové mutácie, drobné odstránenia a vloženia, môžu spôsobiť

- 1.) posun čítacieho rámca v mRNA, čo vedie k DMD (posunové mutácie, alebo „frame shift mutations“)
- 2.) výmenu jednej aminokyseliny v proteíne dystrofíne za inú, ktorá môže, alebo nemusí spôsobiť DMD alebo BMD (tzv. „missense mutations“)

⁸⁴ Proces, kedy sa RNA alebo DNA rozdelí na jednotlivé sekvencie, pomocou niektorej z vhodných metód sa jednotlivé sekvencie zväčšia a opäť sa porovnajú s pôvodnými sekvenciami RNA resp. DNA.

- 3.) výskyt predčasného stop kodónu tam, kde je prerušená syntéza dystrofinu (tzv. „nonsense mutation“)
- 4.) vzájomné ovplyvňovanie so spájacím mechanizmom, ktoré môže viesť k odstráneniu exónu v mRNA (mutácie spájacej strany alebo „splice site mutations“)
- 5.) poruchu promotóra, ktorá môže viesť k celkovému zastaveniu syntézy dystrofinu a k vzniku DMD

Vzácnne výnimky. Ako pri všetkých genetických testoch, aj tu sa môže v niektorých výnimočných prípadoch stať, že metóda genetických čipov neidentifikuje u chlapca, ktorý vykazuje príznaky DMD žiadnu mutáciu, pretože sa môže nachádzať mimo testovanej oblasti. Preto sa uvažuje s metódou genetických čipov, využívajúcou 2,1 milióna skúšobných olig v extrémne hustom poli. Taktiež sa vyvíjajú metódy genetických čipov na testovanie ostatných nervovosvalových ochorení, pre používanie vzoriek slín alebo suchých krvných škvŕn z novovznikajúcich rastrovacích programov. Proces legalizácie týchto metód stále napreduje.

Výhody. Okrem spomínaných výhod, akou je napr. vysoká citlivosť pri hľadaní väčšinou všetkých mutácií v géne dystrofínu pacientov s DMD a taktiež aj u nosičov DMD, je hlavnou výhodou rýchlosť celého procesu skúšky, vysoká citlivosť a presnosť. Krok 1 trvá asi iba *sedem dní*, pričom mutácia odstránenie je detekovaná v 60% a mutácia duplikácia v 5% prípadov. Ďalších *štrnásť dní* trvá nájdenie bodovej mutácie v zostávajúcich 35% prípadov.

Nový genetický test je už dostupný. Ak si želáte, aby Váš syn alebo príbuzní z matkinej strany boli týmto testom odskúšaní, kontaktujte prosím Emory Genetics Laboratory v Atlante prostredníctvom ich stránky www.geneticslab.emory.edu, alebo na tel. čísle 404 778-8500, kde Vám povie o nákladoch na testy a o poistení. V prípadoch, v ktorých sa nezistí žiadna mutácia, je k dispozícii sekvencovanie cDNA použitím mRNA ako štartovacieho materiálu. Tento test vyžaduje vzorku svalu zo svalovej biopsie. Akceptované sú aj krvné a svalové vzorky z územia mimo USA.

Budúcnosť CETT. Strany zainteresované v programe CETT veria, že počas nasledujúcich niekoľko rokov vznikne sieť klinických laboratórií, najprv v USA a neskôr možno aj v iných krajinách, kde by bol tento rýchly a spoľahlivý test dostupný pre všetkých pacientov s DMD a ich príbuzných z matkinej strany. Organizácia PPMD s jej novou iniciatívou DuchenneConnect bude poskytovať prístup k tomuto programu a ku všetkým informačným materiálom pripravovaným pre celú komunitu okolo DMD.

Iniciatíva DuchenneConnect bude podporovať spoluprácu a genetické analýzy DMD.

DuchenneConnect je akýmsi základným a zlomovým informačným smerovačom, ktorý celú komunitu okolo DMD a BMD, t. j. pacientov a ich rodiny, profesionálov z radov lekárov a výskumníkov a farmaceutický priemysel spája do jedného zdroja na výmenu údajov, nápadov a rád, ako aj najnovších informácií z výskumu a aktuálnej liečby.

Kyle Brownová zo spoločnosti Innolyt Inc. zo San Matea v Kalifornii, ktorej cieľom je „spojiť neziskovú výskumnú komunitu“, popísala nový program PPMD s názvom DuchenneConnect, jeho vzťah s programom CETT a potreby registrovania všetkých klinických a genetických informácií o takom množstve pacientov s DMD a BMD, ako je to len možné. Kyle na stretnutí oslovila rodiny tak trocha osobne:

„Chceme poznať choré deti a ich rodiny. Chceme, aby ste poskytli informácie programom DuchenneConnect a CETT. Potrebujeme klinické a genetické údaje o Vašom dieťati a radi by sme vedeli, kde žijete. Keď necháme vedcom, farmaceutickým spoločnostiam a iným registrovaným partnerom Vaše lekárske údaje - s Vaším povolením - budeme držať údaje o Vašom bydlisku bokom, kvôli ochrane Vášho súkromia. Zoznam otázok, na ktoré

potrebujeme odpovede je už riadne dlhý: Akým spôsobom bol Váš chlapec diagnostikovaný? Aké boli výsledky jeho genetických a iných testov? Ako chodí? Podstúpil ortopedický chirurgický zákrok kvôli kontraktúram a skoliózam? Aké technické pomôcky používa? Potrebuje pomoc pri dýchaní? Akým spôsobom? Má problémy so srdcom? Sú vo Vašej rodine aj iní členovia s rovnakou diagnózou?

Tento zoznam nie je úplný, v našich dotazníkoch je viac otázok a v blízkej budúcnosti sa dokonca rozšíri. Tento proces prenosu informácií bude kontinuálny mechanizmus „otázka a odpoveď“, pretože musíme byť s Vami v kontakte počas dlhého času.

Pomocou DuchenneConnect budete môcť vidieť, ako sa vyvíja ochorenie Vášho chlapca v porovnaní s ostatnými. My Vám ukážeme, kde vo Vašom okolí sú najlepší poradcovia v oblasti genetiky. A aby naša práca mala pre Vás stále väčší význam, potrebujeme Vaše návrhy a nápady, ktoré nám kedykoľvek môžete adresovať.

Vaše údaje budú v anonymnej forme ponúknuté vedcom v oblasti DMD všade tam, kde to budú potrebovať pre účely svojho výskumu. Teda takým spôsobom, aby nebolo známe Vaše meno, adresa či akýkoľvek iný spôsob, ako Vás identifikovať. My budeme spolupracovať s inými podobnými registrami vo svete, za predpokladu, že sa držia rovnakých štandardov ako my. Taktiež farmaceutické spoločnosti budú mať prístup k týmto údajom, napríklad v prípade, že budú potrebovať pre svoje klinické skúšky pacientov s konkrétnou formou mutácie. Ale ak Vás budú potrebovať kontaktovať, budú sa nás musieť opýtať, či ste dali súhlas s poskytnutím týchto údajov. Teda vždy bude kontrola toho, čo sa stane s Vašimi pomerne osobnými informáciami.

Výsledkom toho všetkého bude rozsiahla spolupráca nielen na národnej ale dokonca aj na medzinárodnej úrovni, v ktorej bude Váš chlapec a celá jeho rodina hrať najdôležitejšiu úlohu.“

Zapíšte sa prosím do nového informačného centra PPMD, aby ste sa stali súčasťou jej silnej siete: www.duchenneconnect.org. Momentálne je jediným používaným jazykom na tejto stránke angličtina, avšak v blízkej budúcnosti budú dostupné aj preklady do iných jazykov.

Čo znamená slovo „spojená“ v názve tohto stretnutia vo Filadelfii?

Záverčné slovo Patricie Furlongovej. Znamená, že každý chlapec a mladý muž s DMD má význam spolu s jeho rodinou, lekármi a opatrovateľmi, ktorí sa uisťujú, že chlapec môže viesť zmysluplný život ako aj spolu s výskumníkmi, ktorí robia všetko pre to, aby pre nich našli liečbu. *Spojenný* tiež znamená, že všetci, celá DMD komunita, musia držať pokope a pracovať pokope tak, aby DMD už viac neskracovala priemernú dĺžku života človeka zo 70 rokov (alebo 25 000 dní) na hodnotu 20 rokov (alebo 7 300 dní) odo dňa stanovenia diagnózy. Súčasná medzera chýbajúcich 50 rokov sa musí zmenšovať a zmenšovať, až kým úplne nezanikne, keďže v nie príliš vzdialenej budúcnosti bude existovať možno nie úplné vyliečenie DMD, ale aspoň efektívne liečenie. Moji dvaja synovia zomreli, keď mali 15 a 17 rokov, nedostali ani tých 7 300 dní. To však bolo pred desiatkami rokov. V posledných 10 rokoch pribudlo okolo 1 500 dní, čo je asi štvrtina života pacienta s DMD a chlapci tak majú 8 800 dní, t. j. 25 rokov viac alebo menej odo dňa stanovenia diagnózy. Teda existuje progres a tento sa bude zrýchľovať so všetkými liečebnými postupmi, ktoré sú aktívne sledované v mnohých svetových laboratóriách a nemocniciach.

Zoznam výskumných stratégií je dlhý. Mnoho z nich na stretnutí odznelo a Vy si môžete uvedomiť, že s akumulovaním pozitívnych poznatkov a so stále rastúcim počtom prebiehajúcich skúšok napredujeme. Že existuje dokonca reálna nádej, že minimálne jedna alebo viac z nových techník - preskok exónu a potlačenie predčasných stop kodónov - má reálnu šancu vyvinúť sa do zmysluplnej liečby v najbližších pár rokoch.

Často sa obávame, že naše čakanie bude nanič, ale toto stretnutie ukázalo, že existuje zmysluplný progres, že nielen výskum pokročil, ale aj lekárska starostlivosť o chlapcov a mladých mužov sa zlepšuje a - čo je pomerne dôležité - verejnosť, vlády a ich zdravotnícke agentúry v mnohých krajinách si uvedomujú, že DMD je celosvetový problém, *s ktorým musíme skončiť spolu*. Dostupné je značné množstvo peňazí a naše vlastné snahy, ktoré môžu byť ešte intenzívnejšie, výrazne prispievajú k tomuto financovaniu, ktoré umožňuje tvorbu nových výskumných programov a urýchľuje dlhodobejšie a vyspelejšie stratégie.

Niektoré z klinických skúšok chlapcov s DMD, špeciálne najdôležitejšie z nich - preskok exónu, prečítanie predčasných stop kodónov, zvýšenie regulácie utrofinu a prenos génov, sú využívané novými neobvyklými liečebnými technikami. Preto musia byť tieto skúšky vykonávané veľmi opatrne, aby boli maximálne bezpečné a účinné. Potrebných bude viac skúšok, preto potrebujú vedci Vašu stálu spoluprácu aj napriek ťažkostiam, cestovaniu a mnohým niekedy zložitým testovacím procedúram, ako napr. opakované biopsie, dokonca keď nie je očakávaný žiaden liečebný prospech. Nevyhnutnou je účasť oveľa väčšieho počtu Vašich chlapcov.

DMD nie je ľahké ochorenie. Pravdepodobne nebude existovať jediná liečba, ktorá by pomohla úplne všetkým pacientom. Viac pravdepodobné je, že bude existovať kombinácia rôznych techník na získanie najefektívnejšej cesty pre ich liečenie. A žiaden z nich nezostane bokom. PTC124 vstupuje do fázy-III. Exón 51 je prvý, ktorý sa v skúškach podarilo preskočiť, ale ďalšie budú nasledovať, aj pre zložité a menej bežné mutácie. Mnohé skúšky s oveľa viac konvenčnými prístupmi ukážu pozitívne výsledky, ktoré by mohli viesť k viacerým druhom liečby, neliečiacich síce ochorenie, ale aspoň by ho spomalili a ochránili by svaly do času, kým by sa našla účinnejšia a trvalejšia liečba.

Pochopte prosím, že mnohé z budúcich liečebných postupov budú špecializované na konkrétne mutácie. Tzn., že je dôležité, aby bola známa presná mutácia každého chlapca s DMD, aby sa dalo rozhodnúť, aký typ liečby by bol pre neho ten správny. Existujú veľmi výkonné metódy, s ktorými môžu byť mutácie presne analyzované a tiež také, ktoré dokážu identifikovať DMD prenášačstvo aj u ich matiek a u ženských príbuzných. Týmto sa stáva genetické poradenstvo oveľa spoľahlivejšie.

Takže toto, je naša pozícia: Všetky deti a mladí muži s DMD kdekoľvek potrebujú a zasluhujú si prístup k presnému a včasnému diagnostikovaniu, genetickým testom, najmodernejšej starostlivosti, príležitosť zúčastňovať sa klinických skúšok a prístup k sľubným liečebným postupom. Aby sme skončili s DMD, musíme sa navzájom spojiť a pracovať spoločne tak, aby sa 8 800 dní života s DMD v čase stanovenia diagnózy zmenilo na 25 000 a viac.

Táto správa, napísaná najmä medzi septembrom a novembrom 2007, je taktiež dostupná v španielčine a nemčine. Moje predchádzajúce správy v angličtine, nemčine a španielčine si môžete pozrieť na Internete na stránke www.duchenne-research.com. Výročné stretnutie Britskej organizácie Parent Project Muscular Dystrophy - PPUK - v roku 2007, tu nazývané Action Duchenne, sa konalo v Londýne od 2. do 4. Novembra. Súčasnú správu aktualizujem počas nasledujúcich mesiacov novými vedeckými poznatkami prezentovanými v Londýne. Tí, ktorí si želajú dostávať moje ďalšie správy e-mailom, akonáhle budú dokončené, by mi prosím mali poslať ich e-mailovú adresu.

Günter Scheuerbrandt, PhD., Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Nemecko. E-mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Preložil: Filip Zeman

Odborná kontrola: MUDr. Andrej Vranovský