

Duchennova svalová dystrofia

Preskok exónu - prvá klinická skúška na chlapcoch s DMD

Technika *preskoku exónu* sa pokúša spomaliť rýchlu Duchennovu dystrofiu (DMD) na oveľa miernejšiu Beckerovu dystrofiu (BMD). *Nenahrádza samotný gén s jeho mutáciou*, ale ovplyvňuje, ako je tento poškodený gén čítaný a spracovaný. *Preskok exónu nebude liečbou DMD*, má iba zmierniť jej symptómy.

Pokiaľ mutácia typu „odstránenie“, „duplikácia“ alebo „bodová mutácia“ poruší čítací rámec mRNA (mediátorová rybonukleová kyselina) a teda spôsobí DMD, čítací rámec môže byť *obnovený* pomocou jedného alebo viacerých umelo odstránených exónov z mRNA pomocou *antisense oligoribonukleotidov* (ďalej AONov). Tieto sú krátkymi kúskami RNA, ktorých sekvencie sú skonštruované takým spôsobom, že sa pripájajú iba na komplementárne sekvencie pre-mRNA vo vnútri odstráneného exónu alebo na krajné oblasti pre-mRNA. Tieto AONy teda zasahujú do spájacieho mechanizmu, takže cieľový exón či exóny nie sú viac obsiahnuté v mRNA, sú *preskočené*.

Vzhľadom na to, že táto preskočená mRNA je kratšia ako obyčajne, proteín dystrofín je tiež kratší, obsahuje menej aminokyselín. Ak tieto chýbajúce aminokyseliny sú časťou nepodstatných oblastí, ako napr. tyčinkovitá oblasť, kratší proteín môže ešte častokrát plniť svoju stabilizujúcu úlohu membrány svalových buniek. Výsledkom má byť zmena závažných symptómov DMD na oveľa miernejšie symptómy BMD.

Pre preskok exónu sú väčšinou používané dva druhy chemicky chránených AONov. Musia byť chránené tak, že nie sú vôbec, alebo sú len pomaly ničené v svalových bunkách ničivými enzýmami nukleových kyselín. Tieto dva AONy sú *2'O-metyl-fosforotioáty* (z angl. *2'O-methyl-phosphorothioates*), tiež nazývané *2'O-metyly*, a *morfolíny* (z angl. *morpholinos*).

Keďže **Judith van Deutekom**, v súčasnosti vedúca výskumu v spoločnosti PROSENA B.V., ktorá sa zaoberá biotechnológiou a sídli v Leidene v Holandsku, sa nemohla zúčastniť na stretnutí vo Filadelfii, informovala **Elizabeth Vroom**, prezidentka medzinárodnej organizácie

United Parent Project Muscular Dystrophy (UPPMD), *o prvej skúške techniky preskoku exónu na človeku*, ktorá skončila na konci roku 2006. V ďalšom texte nasleduje sumár toho, čo povedali doktorky van Deutekom a Vroom na stretnutí v Londýne a vo Filadelfii.

Cieľom tejto skúšky bolo vyskúšať, či je preskok exónu prijateľný pre pacientov s DMD. Realizovala sa lokálna štúdia na malej oblasti jediného svalu - sval *tibialis anterior* holennej kosti, ktorý bol liečený pomocou AONu 2'O-metylu proti exónu 51. Skúška bola navrhnutá na *poskytnutie dôkazu o princípe teórie preskoku exónu* a hoci sa pri nej získal dystrofín požadovanej štruktúry, udiala sa na takej lokálnej úrovni, že liečení chlapci z toho nezískali žiadny liečebný efekt.

Holandskí výskumníci vyseletovali 2'O-metylovú verziu anti-51 AONu, pretože majú rozsiahle skúsenosti s týmto typom chemicky stabilizovaných AONov, nielen z úspešnej liečby svalových vlákien vo svalových kultúrach, ale taktiež aj z lokálneho a systematického podávania injekcií do jednotlivých svalov a do krvného obehu živých zvierat.

Exón 51 bol vybraný ako prvý cieľ preskoku, pretože úspešný preskok tohto jediného exónu by mohol viesť k obnove čítacieho rámca proteínu až u 25% všetkých chlapcov s DMD s typom mutácie „odstránenie“. Na začiatku bolo pre túto skúšku vybratých 6 chlapcov, ale keďže výsledky liečby prvých štyroch chlapcov boli také významné a pozitívne, nebolo potrebné pokračovať v liečbe zvyšných dvoch chlapcov. Štyria liečení chlapci boli vo veku 10 až 13 rokov s mutáciou typu „odstránenie“ exónov 50, 52, 48 až 50 a 49 až 50. Skúška bola otvorená, tzn. že každý zúčastnený vedel, že všetci štyria chlapci dostávali AON.

Keďže preskok exónu je nová liečebná procedúra, boli pred začiatkom skúšok tejto procedúry vykonané na každom chlapcovi rozsiahle klinické a molekulárne genetické testy. Vzhľadom k tomu, že Holandský regulátor nepovolil pred skúškami svalovú biopsiu, vykonala sa len povrchová biopsia, z ktorej boli

pripravené bunkové kultúry. V týchto laboratórnych procedúrach bola v mRNA potvrdená presná mutácia typu „odstránenie“, ktorá bola predtým zistená na úrovni DNA a tiež boli zistené bázové sekvencie okrajových oblastí pred a po odstránení exónov. Navyše bol skenovaný celý gén dystrofin, aby sa potvrdilo, že v ňom nie sú akékoľvek neočakávané nezrovnalosti. Hoci bolo známe, že preskok exónu 51 funguje veľmi dobre v živých zvieratách a v bunkových kultúrach z chlapcov s DMD, celá procedúra preskoku exónu sa opakovala na bunkovej kultúre z povrchovej biopsie každého chlapca, aby sa vylúčilo akékoľvek riziko, že to nebude fungovať v živých svaloch počas skúšky. Ďalším bezpečnostným opatrením bola liečba chlapcov jedného po druhom, tzn. že iba po získaní pozitívnych výsledkov liečby prvého chlapca, ktoré nepreukázali žiadne vedľajšie účinky, bol liečený druhý chlapec, atď.

Každý zo štyroch chlapcov dostával jednu injekciu v lokálnej anestézii do malej oblasti svalu tibialis anterior v roztoku obsahujúcom 0,8mg anti-51 2'O-metylu. Štyri týždne po podaní injekcie bola vykonaná svalová biopsia v mieste vpichu a svalové tkanivo bolo zisťované na prítomnosť skrátenej (preskočenej) mRNA a z toho vyplývajúcu prítomnosť proteínu dystrofinu.

Na konci roka 2006 bola skúška zastavená, výsledky analyzované a pripravované na zverejnenie. Analýzy mRNA a dystrofinu vo svalovom tkanive získanom biopsiou ukázali, že nový skrátený dystrofin bol vo významnom množstve prítomný vo väčšine svalových vlákien u všetkých štyroch chlapcov. To by tiež mohlo ukazovať na to, že „na dystrofin pozitívne“ svalové vlákna neboli „spätne“ (vratné) vlákna, ktoré by mohli byť tvorené spontánnym preskokom exónu bez pomoci AONu. A u všetkých štyroch pacientov neboli zaznamenané žiadne vedľajšie účinky. Kompletné výsledky budú publikované v *New England Journal of Medicine*.

Holandskí vedci v súčasnosti pripravujú ďalšiu klinickú skúšku, počas ktorej bude cieľom podávanie 2'O-metyl AONu na exón 51 do celého tela tak, aby potenciálny liek zasiahol všetky svaly vrátane pľúc a srdca. Tieto štúdie budú krátkodobé (mesačné) a dlhodobé (trvajúce

6 mesiacov) a budú realizované pomocou rôznych dávok AONov na určenie najefektívnejšej dávky, ktorá už by dokázala významne spomaliť symptómy DMD u chlapcov. Do akej miery sa zlepší funkcia svalov bude tiež závisieť na vyplývajúcej funkčnosti „Beckerových“ proteínov získaných po preskoku exónu.

Taktiež sa budú vykonávať systematickejšie štúdie s myšami na vyšetrenie farmakodynamiky AONov na presné zistenie toho, čo sa s nimi presne stane vo vnútri svalových vlákien. V niektorých týchto štúdiách budú AONy vstreknuté pod kožu, pretože to bude neskôr najpraktickejší spôsob podávania, pokiaľ sa budú vyžadovať opakované injekčné dávky. V podobných štúdiách sa už systematické podávanie ukázalo ako dobré, dokonca tak, že môže byť liečený aj srdcový sval, a že neexistujú vážne vedľajšie účinky na pečňové enzýmy alebo iné krvné hodnoty.

Kompletný rozvoj preskoku exónu 51 je len začiatkom výskumného programu PROSENY na nájdenie efektívnej liečby DMD. Čoskoro na to bude nasledovať vývoj iných AONov pre iné mutácie typu „odstránenie“. Okrem AONu 2'O-metylu na preskok exónu 51 vyvinula spoločnosť v dostatočných množstvách aj iné AONy na preskok exónov 43, 44, 45, 46, 50, 52 a 53. Tieto AONy spolu umožnia liečbu vyše 60% všetkých pacientov s mutáciou typu „odstránenie“.

V budúcnosti bude tiež možné použiť túto techniku na obnovu čítacieho rámca nejakého druhu duplikácií alebo keď bude musieť byť preskočený viac ako jeden exón. Napríklad, multiexónové preskočenie jedenástich exónov od 45 po 55 by vyrobilo Beckerov dystrofin u viac ako 63% chlapcov s DMD s mutáciou typu „odstránenie“, ako to je popísané v *C. Beroud et al. v Human Mutation* (Ľudská mutácia) 28:196-202 (2007) a zhodnotenie celej oblasti preskoku exónu bolo publikované autormi *A. Aartsma-Rus a G.-J.B. van Ommen v RNA* 13:1-16 (2007). Táto prvá a úspešná skúška a veľmi aktívny výskum na univerzitách a v biotechnologických spoločnostiach ukázal, že v nie tak vzdialenej budúcnosti bude viesť táto jednoduchá technika k efektívnej liečbe väčšiny chlapcov s DMD.