

Návrh spoločného Holandsko-nemeckého výskumného projektu.

Liečba Duchenneovej svalovej dystrofie preskokom exónu.

Duchenneova svalová dystrofia (DMD) postihuje iba chlapcov - asi každého 3 500tého - pretože, podobne ako pri hemofilii, ženy, ktoré sú jej genetické prenášačky, ju prenášajú priemerne na polovicu svojich synov. Niekedy sa vyskytne svojvoľne aj v nových rodinách. Toto ešte stále *neliečiteľné dedičné ochorenie* spôsobujú mutácie najdlhšieho z našich 20 488 génov. Je to dystrofinový gén na chromozóme X, ktorý pozostáva z 2 220 223 genetických znakov (tzv. báz), z ktorých 11 058 je spojených v 79 aktívnych sekciách, tzv. exónoch. Exóny obsahujú genetickú informáciu pre biosyntézu dystrofinového proteínu, ktorý je zložený z 3 685 aminokyselín. Je potrebný pre mechanickú stabilitu svalových buniek, pretože pôsobí ako šokový absorbér. Chlapci s DMD nemajú dystrofin a preto ich svaly degenerujú. 5-ročný chlapec s DMD má k dispozícii iba polovicu svalstva oproti zdravému. V dvanástich rokoch potrebuje vozík, vo veku 15 až 18 rokov dýchač prístroj ako pomoc pri dýchaní. Stáva sa úplne závislý na pomoci iných a napokon zomiera na udusenie vo veku medzi 20 a 30 rokmi. Chlapci môžu navštevovať bežnú školu (s pomocou) a niektorí dokonca získavajú aj univerzitné vzdelanie.

Úloha výskumu. Zdravý 5-ročný chlapec vážiaci 30kg má 12kg hmotnosti vo svaloch, ktoré obsahujú $1,5 \times 10^{15}$ molekúl dystrofinu. 5-ročný chlapec s DMD má k dispozícii iba 6kg svalov, ktoré prakticky neobsahujú žiaden dystrofin, keďže kvôli poškodenému génu nemôžu byť počas biosyntézy proteínu potrebné informácie správne čítané. Aby sa jeho svaly stali aspoň do určitej miery opäť funkčné, musí sa opätovne vytvoriť minimálne 30% bežného množstva dystrofinu a toto množstvo musí byť prítomné počas celého života chlapca. To by znamenalo počet 200×10^{12} molekúl dystrofinu v jeho 6kg svalov.

Prvá cesta ku genetickej liečbe. Počas diskusie v polovici 90-tych rokov minulého storočia mi profesor *Gertjan van Ommen* z Leidenskej univerzity v Holandsku vysvetlil, ako by mohla vyzerať genetická liečba, ktorá by spoľahlivo dlhodobo spĺňala takúto úlohu (t.j. znovuoobnovenie aspoň 30% bežného množstva dystrofinu) bez vážnych vedľajších účinkov. Dnes sa táto metóda nazýva *preskok exónu* a bola vyvinutá počas posledných 15 rokov ním a ostatnými výskumnými skupinami, predovšetkým v Spojenom Kráľovstve a Austrálii, a to v takom rozsahu, že sa tento postup netestuje len na myšiach a psoch, ale už aj na pacientoch s DMD. Holandskí vedci, pracujúci na univerzite a v spoločnosti *Prosensa* a špecializujúci sa práve na preskok exónu, sú s touto technikou najďalej. Okrem profesora Van Ommena by tu mali byť tiež spomenuté tímy okolo doktorky *Judith van Deutekomovej* a doktorky *Annemieke Aartsma-Rusovej*.

Preskok exónu znamená "preskočenie exónov". V dystrofinovom géne chlapcov s DMD chýba jeden alebo viac exónov, aktívnych častí génu, alebo sú tieto exóny duplikované či majú chyby v postupnosti ich genetických znakov, v ich bázových sekvenciách. To narušuje čítací

proces genetickej informácie pre biosyntézu proteínu takým spôsobom, že nemôže byť vyrobený žiaden dystrofin. Toto prerušenie môže byť aj zvrátené, tzn., že *syntéza proteínu môže byť znova obnovená*, ak sa blokuje jeden alebo viacero susedných exónov takým spôsobom, že čítací mechanizmus ich preskočí a teda ich už viac nepoužije. Pre túto blokádu sú potrebné tzv. *antisense oligoribonukleotidy* (AONy). Sú to krátke kúsky genetického materiálu, dlhé okolo 20 znakov v takej špeciálnej postupnosti, že sa dokážu naviazať na komplementárne, presne pasujúce sekvencie preskakovaného exónu. AONy sa momentálne vyrábajú pre všetkých 79 exónov, každý má inú štruktúru a blokuje len jeden cieľový exón. Nie však žiaden iný v tisícach ďalších ľudských génoch.

DMD je konvertovaná na Beckerovu svalovú dystrofiu.

Kvôli chýbajúcim exómom - tým, ktoré sú odstránené alebo tým, ktoré sú preskočené - budú v novom dystrofíne chýbať aj aminokyselinové stavebné bloky, ktoré sú nimi vymedzené. Nový dystrofin bude teda kratší oproti normálnemu ale ešte vždy bude schopný plniť si v určitom rozsahu svoju ochrannú funkciu v membránach svalových buniek. Preto budú príznaky ochorenia miernejšie, degenerácia svalstva bude postupovať pomalšie a výrazne by sa mala zvýšiť predpokladaná dĺžka života. DMD potom bude zmenená na *BMD*.

Liečba, nie však ešte vyličenie. Keďže pacienti zostanú aj po liečbe stále zdravotne postihnutí, aj keď výrazne menej ako predtým, preskok exónu sa nedá považovať za úplné vyličenie DMD, ale iba za jeho efektívne liečenie. Použitím tejto génovej metódy nebude samotný poškodený gén ani nahradený ani opravený, len jeho čítací mechanizmus, presnejšie povedané jeho posunutý čítací rámec, bude normalizovaný.

Osobná liečba. Hoci všetci pacienti s DMD majú viac menej rovnaké klinické príznaky, existuje mnoho rozdielnych príčin tohto ochorenia, a to kvôli mutáciám veľmi dlhého dystrofinového génu, ktoré môžu vzniknúť na mnohých rôznych stranách. Preto je preskok exónu *špecifický pre každú mutáciu*. Stane sa *osobnou liečbou*. Každý pacient bude potrebovať špeciálny AON, ale každý AON bude môcť byť na druhej strane použitý u viacerých pacientov. Napr. 13% všetkých pacientov bude potrebovať preskočiť exón 51, teda potenciálnym liečivom pre najväčšiu skupinu pacientov, ktorým môže preskok exónu pomôcť, je AON anti-51. Preto sa v prvých klinických skúškach zameriava snaha výskumníkov práve na preskok tohto konkrétneho exónu.

Testy na zvieratách. Preskok exónu bol úspešne testovaný na dystrofických myšiach a psoch. Bolo to lokálne podávanie injekcií AONov do jediného svalu alebo systematické podávanie do krvného obehu tak, že boli zasiahnuté všetky svaly v tele (vrátane srdca a pľúc). Vo väčšine týchto systematických experimentov by mohla byť významne zlepšená činnosť svalov.

Prvé klinické skúšky na chlapcoch s DMD. Vôbec prvá klinická štúdia s pacientmi bola uskutočnená v júli v roku 2007 v Leidene. Štyria pacienti vo veku od 10 do 13 rokov dostávali *lokálne* injekciou AON na preskok exónu 51 do holenných svalov. Po štyroch týždňoch bolo v mieste vpichu možné identifikovať nový dystrofín (Van Deutekomová JC et al. N Engl J Med 2007; 357; 2677). Neočakávalo sa zlepšenie funkčnosti svalov, pretože liečený bol iba malý objem svalového tkaniva a preto deti nemali nijaký profit z tejto liečby. Po prvýkrát však bolo ukázané, že preskok exónu účinkuje aj na ľuďoch.

Prvá systematická klinická skúška. V roku 2008 sa začala v Leidene, Louvene a Göteborgu *systematická* štúdia na dvanástich pacientoch. Bol im podávaný AON proti exónu 51, podkožnými injekciami, teda do krvného obehu. Každý z chlapcov dostal každý týždeň v priebehu 5 týždňov jednu injekciu. Je to štúdia na určenie správnej dávky, používajú sa tu teda rôzne veľkosti dávok AONov. Výsledky, ktoré snáď ukážu liečebný účinok, budú publikované až po ich skompletizovaní a celkovom vyhodnotení štúdie asi v roku 2009. Tak ako pri lokálnej štúdií, ani pri tejto sa zatiaľ neukázali žiadne významné vedľajšie účinky. Ak budú výsledky štúdie podľa očakávaní, bude spustená väčšia štúdia na 100 pacientoch s DMD, ktorá bude trvať minimálne 6 mesiacov a pacienti budú dostávať dávku anti-51 AONov v zmysle predošlej štúdie.

Ďalšie preskakované exóny. Preskok exónu 51 bude predstavovať liečbu len pre 13% všetkých pacientov. Aby toto číslo vzrástlo, plánujú Holandskí vedci vyvinúť sedem iných AONov na preskok exónov 43, 44, 45, 46, 50, 52 a 53, čo bude v konečnom dôsledku znamenať liečbu ďalších 38,2% pacientov. Tiež existujú pacienti, ktorí vyžadujú preskok dvoch exónov súčasne. Ak by bolo možné použiť zmes dvoch spomínaných exónov, mohla by byť liečená skupina ďalších 4,3% pacientov, čo by zmenilo celkový počet na 55,5%. Všetky tieto čísla vypočítala doktorka Annemieke Aartsma-Rusová a ešte neboli nikde publikované.

Príprava AONov. Chemicky komplikované AONy sú syntetizované v laboratóriách spoločnosti Prosensa, pričom sa začína od prekursorov, ktoré sa dajú získať bežným komerčným spôsobom. Syntéza sa vykonáva v zmysle prísnych pravidiel na prípravu liečiv pre ľudí. AON na preskok exónu 51 (PRO051) pozostáva napr. zo 699 atómov, ktoré tvoria reťazec 20genetických znakov. Tieto sú rovnaké ako tie, ktoré sú v ribonukleovej kyseline, ktorá transportuje genetickú informáciu v bunkách z génov do "továrne na proteíny", do ribozómov. Prosensa vyvinula dostatočné množstvo AONov na preskok spomínaných ôsmich exónov.

Návrh na spoluprácu. Predovšetkým z finančných dôvodov môže Prosensa až do získania klinického súhlasu vyvinúť iba AONy na preskok exónov 51 a 44. Potrvá to 4 až 5 rokov a umožní to liečenie iba 19,2% všetkých pacientov (exón 51 - 13%, exón 44 - 6,2%). Aby tento pomer vzrástol, a aby sa urýchlil vývoj, navrhujem spoluprácu Holandských vedcov s tímom profesora

Rudolfa Korinthenberga z detskej nemocnice Univerzity vo Freiburgu v Nemecku.

Klinická štúdia s cyklosporínom. V MD-NET koordinačnom centre pre klinické štúdie vo Freiburgu bola od roku 2004 do roku 2008 pod vedením profesora Korinthenberga vykonaná klinická štúdia na 150 pacientoch s DMD v 15 nemeckých detských nemocniciach. Cieľom bolo otestovať, či samotné imunosupresívum cyklosporín (alebo v kombinácii so steroidom Prednisonom) je schopný pozitívne ovplyvniť ochorenie. Žiaľ, ukázalo sa, že to tak nie je. Avšak spolupráca medzi mnohými nemocnicami, ktorá bola vyvolaná touto štúdiou, by mohla byť využitá na spoľahlivé a bezpečné prešetrenie iných liečebných postupov na vzácne ochorenia akým je aj DMD. Malo by tu byť spomenuté, že centrum vo Freiburgu sa momentálne so siedmimi pacientmi zúčastňuje na medzinárodnej štúdií lieku PTC124, ktorý spôsobuje, že pri čítaní genetickej informácie je predčasný STOP kodón ignorovaný a proces čítania tak pokračuje až do konca.

Spolupráca medzi Leidenom a Freiburgom. Navrhujem, aby sa organizácia založená profesorom Korinthenbergom aktívne zúčastňovala so svojimi nemeckými pacientmi na dlhodobých štúdiách na preskok exónov 51 a 44 a tiež na doplnkových klinických skúškach na preskok iných spomínaných exónov. Vždy by išlo o spoluprácu holandských vedcov na univerzite v Leidene a spoločnosti Prosensa. Tieto vyšetrovania by mali byť koordinované Európskou organizáciou TREAT-NMD so sídlom v meste Newcastle upon Tyne, Veľká Británia.

Náklady na klinické štúdie DMD v Nemecku. Na základe známych nákladov na štúdiu s cyklosporínom, ktoré boli okolo 3 000 000,- € na 150 detí a 20,- € na každé dieťa v štúdií na PTC124, náklady na skúšku preskoku jedného exónu s 12 pacientmi sa dajú odhadnúť na približne 250 000,- €.

Odvolanie na regionálnu vládu Bádenska-Wuerttemberska. Tento môj návrh som už prediskutoval aj s doktorkou Judith van Deutekomovou a s profesorom Korinthenbergom. Obaja v zásade súhlasili a teraz sa spoja a dohodnú sa medzi sebou. Avšak podmienkou na jeho realizáciu bude to, aby boli dostupné dostatočné finančné zdroje. Tento návrh som vypracoval potom, ako sa ukázalo, že problémy asi 2 000 pacientov z Nemecka a ich rodín vzbudili po udelení ceny za zásluhy za moje správy o DMD pozornosť verejnosti. Naši chlapci s DMD potrebujú účinnú liečbu ešte skôr, ako bude pre nich neskoro.

Guenter Scheuerbrandt, PhD

V Talgrunde 2, D-79874 Breitenau, Nemecko

Tel. *49-7652-1777

E-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Internet: www.duchenne-information.eu

Preložil: Filip Zeman