

Duchennova Svalová dystrofie (DMD)

Shrnutí důležitých výsledků výzkumu v období mezi červencem a prosincem 2006

Většina vědeckých výsledků zde shrnutých pochází z prezentací přednesených na konferenci britského sdružení *Parent Project* v Londýně 21. října, zbytek pochází z publikací nebo soukromých e-mailových zpráv. Některé z těchto nových informací jsou aktualizací mé zprávy z výročního setkání amerického sdružení *Parent Project Muscular Dystrophy*, které se uskutečnilo ve městě Cincinnati, stát Ohio, USA ve dnech 13-16. července 2006. Tuto zprávu, stejně jako všechny předchozí, můžete najít a stáhnout si z mých internetových stránek www.duchenne-research.com v angličtině, němčině a španělštině. Jména vědců zde zmíněných jsou bez titulů a, jak je zvykem v DMD komunitě, často jsou použita jen křestní jména. Téměř všichni jsou profesori a všichni mají buď titul PhD nebo MD nebo oba.

Klinický pokus s metodou exon skipping v Holandsku

Judith van Deutekom v Londýně oznámila, že 4 chlapci s DMD dostali do svalu holeně (tibialis anterior) jednu injekci 20-methyl AONu zacíleného na exon 51. Žádné negativní vedlejší účinky nebyly pozorovány ani u jednoho z nich. U dvou chlapců byla provedena biopsie, ta prokázala tvorbu nového zkráceného dystrofinu. *Judith* řekla, že tyto předběžné výsledky jsou slibné, ale víc nebyla oprávněna prozradit.

Na závěr své prezentace řekla, že musíme být opatrní protože „ještě tam nejsme“. Dokonce jestliže exon skipping bude fungovat u jednoho chlapce ještě to neznamená, že bude fungovat u ostatních. Jen malý kousek svalu obdržel lék a lokální léčba není to co potřebujeme. Potřeba je systematická léčba, která obsáhne všechny svaly, a toho je možno dosáhnout jen injekcí AONů do krevního oběhu. Než se o to pokusíme příští rok - v té době už pro exon 46 – musí být nalezen správný AON a nejlepší dávkování. „Ale dostaneme se tam“ prohlásila *Judith*.

Klinický pokus s metodou exon skipping v Anglii

Francesco Muntoni řídí pokus připravený konsorciem MDEX v Anglii. V tomto pokuse bude morfolino AON zacílený na exon 51 injikován do malého svalu na šlapce (extensor digitorum brevis). *Francesco* v odpovědi z 18. prosince píše, že mají dvě ze tří povolení a jakmile obdrží třetí začnou hledat první chlapce na odzkoušení léku. To se předpokládá v prvním týdnu měsíce března 2007.

Žádné předběžné výsledky nebudou publikovány. Ale jakmile všechny data budou analyzovány, zkontrolovány a odsouhlaseny budou publikovány. Jestliže první pokus bude úspěšný druhá plánovaná studie proběhne v druhé půlce roku 2007. Její výsledky budou k dispozici v roce 2008. Jestliže vše bude zdárně pokračovat rozjede se komerční výroba AONu a začne dlouhodobá studie.

Morfolino vniká do srdce

Dosud morfolino AONy nebyly schopny proniknout do srdečního svalu mdx myši. Toto byla obrovská nevýhoda v porovnání s 20-methyl AONy s kterými pracují Holanďané a které způsobují přeskočení vhodného exonu i v srdci mdx

myši. *Dominic Wells* z Londýna publikoval informaci, že morfolino je schopno proniknout i do srdce myši jestliže je současně s morfolinem injikován *Optison* a je na něj působeno ultrazvukem z diagnostického ultrazvukového zařízení. Ultrazvuk otevírá póry v membráně svalové buňky a morfolino může proniknout dovnitř. Jakmile je ultrazvuk vypnut póry se opět uzavřou. Tento postup přitom nijak nenarušuje funkčnost morfolina v ostatních svalech. Bude ale trvat ještě několik let než bude možno tuto jednoduchou metodu otestovat na dětech.

Exon skipping pomocí genového transferu ve Francii

Už jsem psal o experimentech týmu vedeného *Luisem Garcíou* z Paříže, který dokázal dopravit gen pro AON pomocí AAV vektoru do jádra svalových buněk (www.duchenne-research.com). Je známo, že s touto technikou je možno nejméně jeden rok od podání injekce dosáhnout vynechání exonu 23 u mdx myši, která má bodovou mutaci vedoucí na předčasný stop kodon. V Londýně *Luis* oznámil, že tento postup funguje i u dystrofických psů, kteří jsou dystrofií postiženi vážněji než myši a kteří mají asi tolik svalů jako malé dítě (zřejmě myšleno váhově-pozn.překl.). Psi mají ale mutaci obtížněji léčitelnou, lze ji léčit pouze současným odstraněním exonů 6, 7 a 8. A přesto to fungovalo! Francouzi ale neměli dostatek viru obsahujícího U7-RNA s potřebnou sekvencí AONů, aby mohli léčit celého psa. Proto zablokovali krevní oběh v jedné noze a injikovali do žil během patnácti minut prakticky vše co měli – přibližně 10^{14} (!) virových vektorů. Noha sice otekla, ale nebylo to vážné a virus se dostal bez problémů kam měl. Bylo zjištěno docela dost zkráceného dystrofinu, který nebyl sice distribuován rovnoměrně ve svalech nohy ale jeho množství odpovídalo množství, které mají pacienti s BMD. A za 6 měsíců tam stále byl! V současnosti se připravuje I. fáze klinických testů na chlapcích s DMD u kterých by mělo pomoci odstranění exonu 51. Léčba pomocí virových vektorů bude zřejmě vyžadovat imunosupresi.

Luis a jeho kolegové zkouší také kombinovat tuto léčbu s transferem genu pro blokování myostatínu. Toto bylo již odzkoušeno na myších ale s malým úspěchem protože myši regenerují svaly příliš rychle. Nyní se totéž zkouší na psech. Výsledky budou známy příští rok.

Klinický pokus s transferem genu v USA

Scott McPhee z firmy Askleipos ze Severní Karolíny, který společně s *Jerrym Mendellem* z Columbusu v Ohiu začal klinickou studii transferu minidystrofinového genu pomocí AAV vektoru, mi 21.prosince řekl, že 4 ze 6 pacientů už dostali injekci Biostrophinu do bicepsu. Čtvrtý chlapec patří již do druhé skupiny, která dostává velkou dávku vektoru. Žádné vážné negativní vedlejší účinky zatím nebyly pozorovány. Během první půlky roku 2007 by měly být k dispozici předběžné výsledky. Ty budou okamžitě publikovány, kompletní zpráva bude následovat s co nejmenším zpožděním.

Ignorování předčasného stop kodonu s PTC124

Richard Finkel z firmy PTC z New Jersey prezentoval v Londýně detaily ohledně klinických testů s látkou nazvanou PTC124. Tento nový lék, jehož chemické složení se tají, může být podáván jako tableta. Nyní byla dokončena II. fáze klinické studie na 26 chlapcích s DMD, kteří mají předčasný stop kodon. Pacienti dostávali dávku 18mg/kg/den a 40mg/kg/den, u několika chlapců, kteří dostávali vyšší dávku byl zjištěn úplný dystrofin. V této studii, stejně jako v předchozí, žádné vedlejší účinky nebyly pozorovány. Ale produkované množství dystrofinu bylo příliš malé na to, aby bylo dosaženo terapeutického efektu. Proto proběhne další II. kolo, kterého se účastní 12 chlapců a bude jim podáváno 80mg/kg/den léku tak, aby jeho koncentrace v plazmě dosáhla alespoň 10µg/ml. Výsledky budou publikovány během roku 2007. Následně bude provedena dlouhodobá studie, která bude trvat 3 až 6 měsíců.

Je důležité vědět, že jestliže všechny klinické testy proběhnou dobře bude to opravdová léčba protože nový dystrofin bude mít téměř normální délku, nebude to, narozdíl od metody exon skipping, „Beckerovský“ dystrofin. Na druhou stranu jen 10-15% případů DMD je způsobeno bodovou mutací vedoucí na stop kodon a bude možno je takto léčit. Proto je nezbytně nutné přesně znát mutaci u chlapců s DMD.

Mesoangioblasty umožňují aby „chromí psi zase běhali“

Tato slova byla použita v titulcích článků některých novin. Takový byl efekt mesoangioblastů - kmenových buněk získaných ze stěn cév krevního oběhu. Mesoangioblasty přinesly dramatické funkční zlepšení u dystrofických psů, o tomto pokusu referovali *Giulio Cossu* a jeho spolupracovníci v *Nature* v čísle z 30.listopadu. Tuto publikaci a komentář *Jeffreyho Chamberlaina* můžete získat ode mne e-mailem. *Giulio* mi 9.prosince napsal, že pravděpodobně už v únoru mi pošle zprávu o výsledcích snahy izolovat tyto buňky z tkání krevního oběhu embrií.

Dále tvrdí, že našel další efektivní lék, o kterém se teď ještě nemůže rozepisovat (pravděpodobně jde o NO donor HTC1026).

Upregulace utrofinu

Kay Davies z Oxfordské univerzity a *Jon Tinsley* z firmy Vastox v Oxfordu v Londýně publikovali informaci, že při automatickém testování více než 13.000 látek našli asi 100, které jsou schopny zvýšit množství utrofinu v buněčných kulturách. Některé z nich jsou schopny zvýšit množství utrofinu více než čtyřnásobně. Léčba mdx myší látkou označovanou VOX185 by měla upregulovat utrofin téměř výhradně jen ve svalech a to působením na A-promotor (sekvence nukleotidů v DNA na které startuje transkripce do mRNA, pozn.překl.), tím by mělo dojít k výraznému zlapšení jejich funkce.

Jiné experimenty na mdx myších už ukázaly, že dvojnásobné až trojnásobné zvýšení hladiny utrofinu způsobilo výrazný terapeutický efekt. Ve Vastoxu doufají, že pomocí optimalizovaného VOX185 dosáhnou pěti až sedminásobného zvýšení množství utrofinu. V půlce roku 2007 by tento potenciálně velmi účinný orálně aplikovatelný lék měl být k dispozici. Během následujících let budou probíhat všechny nezbytné klinické testy.

Inhibice myostatinu

Farmaceutická firma Wyeth Pharmaceutical z USA provedla fázi I/II klinického testování inhibitoru myostatinu nazvaného MYO-39 na 108 dospělých pacientech s chorobami svalů, mezi nimi i na několika pacientech s BMD. Studie je ukončena, výsledky, které se zdají být pozitivní, budou publikovány na jaře 2007.

Transfer myoblastů opět funguje

Koncem září mi *Jacques Tremblay* z Quebec City v Kanadě poslal detailní informaci o svém novém experimentu s transferem myoblastů, který by měl být spíše nazýván „transfer myogenních buněk“ kvůli odlišení od podvodu Petra Lawa. V klinické studii na devíti DMD pacientech dosáhl u osmi pacientů až 26% svalových vláken s novým normálním dystrofinem. Bylo toho dosaženo pomocí injekcí myogenních buněk získaných od příbuzných. Buňky byly injikovány do malé oblasti svalu na holeni ve vzdálenosti 1-2mm od sebe.

V současnosti probíhá druhá studie s injekcemi přímo do svalů, která by měla dokázat funkční zlepšení. Tento buněčný transfer má některé výhody, mezi ně patří: nový dystrofin bude mít normální velikost a bude pod kontrolou normálních buněčných mechanismů, pozitivní efekt bude dlouhodobý, nemělo by dojít k imunitním problémům, technika může být kombinována s myostatin inhibitory a mělo by to pomoci i starším pacientům s DMD.

Guenter Scheuerbrandt, PhD., Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Germany

Toto shrnutí jsem napsal 21. a 22. prosince 2006. Všichni, kteří mají zájem dostávat všechny mé budoucí zprávy a interwiev e-mailem a nejsou ještě v seznamu, mi můžou napsat na e-mailovou adresu gscheuerbrandt@t-online.de

Přeložil a mírně upravil: Miroslav Stuchlík, ems@volny.cz