

Vědecké přístupy k léčbě Duchenneovy svalové dystrofie

Aktualizováno v dubnu 2008

Toto je nová zpráva, kterou jsem já, Gunter Scheuerbrandt, biochemik z Německa, napsal pro Vás chlapce a mladé muže s Duchenneovou svalovou dystrofií (DMD) a vaše rodiny, kteří si přejete vědět jak pokračuje práce vědců a kliniků ve světových laboratořích v oblasti výzkumu terapie DMD. Moje předchozí zprávy, zvláště poslední tři z mítingu Parent Projektu v Cincinnati v červnu 2006, Londýně 2006 a Filadelfii 2007 (www.duchenne-information.eu), obsahovaly dost podrobnou sumarizaci vědeckých výsledků prezentovaných na těchto mítincích. Ale protože probíhá řada dalších významných vědeckých výzkumů, které ještě nebyly prezentovány na těchto mítincích, zkrátil jsem předchozí tři zprávy do této a doplnil o nové informace, hlavně o informace z mítingu ActionDuchenne v Londýně v prosinci 2007, a přidal souhrn současných důležitých publikovaných prací.

Toto je text aktualizovaný během března a dubna 2008, budu jej průběžně aktualizovat o nové informace, první aktualizace bude po mítingu Parent Projektu ve Filadelfii v červnu 2008, report bude dostupný v angličtině, němčině a španělštině o několik měsíců později. Stejně jako všechny mé předchozí reporty ani tento není vědeckou prací s mnoha obtížnými slovy, protože jsem se to pokusil napsat tak, aby Vám to umožnilo pochopit co se děje ve světových laboratořích. Tato zpráva, stejně jako předchozí, obsahuje pouze informace z vědeckého výzkumu. Ale pokusím se přidat i souhrn informací z oblasti lékařské a sociální péče v dalších pokračováních této zprávy na základě budoucích prezentací a publikací.

V souhrnech uvádím pouze jména vedoucích laboratořích ačkoliv další kolegové, postdoktoranti a studenti pracovali na publikovaných projektech v týmech, ale není možné publikovat veškerá jejich jména. Všichni vedoucí laboratořích, jejichž práce jsou zmíněné v tomto reportu, měli možnost vidět koncept mého textu a korigovat jej, pokud bylo potřeba, a téměř všichni tak učinili. Takže by v této zprávě mělo zbývat jen minimum chyb.

Pokud máte dotazy týkající se výzkumu, prosím, napište mi e-mail anglicky, německy, španělsky nebo italsky.. Pokusím se na všechny odpovědět, ale jen anglicky nebo německy.

Gunter Scheuerbrandt, PhD., Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Německo, e-mail gscheuerbrandt@t-online.de

Úvod

Jak geny vytváří bílkoviny. Geny jsou funkční jednotky genetického materiálu – **deoxyribonukleové kyseliny, DNA**. Její ztruktura vypadá jako zkroutený žebřík, dvojitá spirála. Každá příčka obsahuje dva ze čtyř druhů malých molekul zvaných **báze**, jsou to: adenin, guanin, thymin a cytosin (A, G, T, C). Z prostorových důvodů příčky mohou obsahovat pouze dvě kombinace bází, tzv. **párů bází**: A-T a G-C. Jestliže například GGCTTAATCGT je sekvence bází na jednom vlákně, příslušná sekvence na druhém vlákně je: CCGAATTAGCA takže obě sekvence jsou vzájemně komplementární:

```
- GGCTTAATCGT -  
| | | | | | | | | |  
- CCGAATTAGCA -
```

Tato sekvence bází, čili genetických písmen, je genetickou informací pro tvorbu všech živých organismů a předává se z generace na generaci.

Většina genů nese informaci pro biosyntézu **bílkovin**. V jádře buňky je genetická informace aktivního genu **kopírována**, a přepisována/transkribována do jiné genetické formy označované jako **pre-mRNA** nazývané také **transkript**. Většina genů sestává z aktivních neboli kódujících oblastí – **exonů**, které obsahují informaci pro tvorbu bílkovin, a z obvykle podstatně delších oblastí nazývaných introny, které neobsahují pouze genetické „haraburdí“, jak se dříve myslelo, ale také důležité informace pro kontrolu aktivity genů. Po transkripci jsou introny odstraněny z pre-mRNA, exony spojeny dohromady do tzv. **mRNA**, která se potom

přesune ven z jádra k **ribozomům** – mimojaderným strukturám v buněčné cytoplazmě které syntetizují bílkoviny. Ribonukleová kyselina, **RNA**, používá místo báze T bázi U - *uracil*. **Spojovací místa** (splice sites) jsou specifické sekvence v exonu a na rozhraní mezi exonem a intronem nezbytné pro správné odstranění nekódujících intronů z pre-mRNA. Spojování samotné je provedeno **spliceozomy**, to je komplex mnoha proteinů a malých RNA.

V takto vzniklé mRNA tři po sobě jdoucí báze zvané kodon (také se jim říká triplet nebo genetické slovo) specifikují jednu z dvaceti aminokyselin. Kodony navazují bezprostředně jeden na druhý. Ribozomy čtou kodony jeden po druhém a postupně z aminokyselin skládají proteiny. Proteiny jsou obvykle tvořeny stovkami až tisíci aminokyselinami. Existují 3 kombinace kodonů: UAA, UAG a UGA, které nekódují aminokyselinu ale **stop kodon**, který zastavuje tvorbu bílkovin.

Dystrofinový gen a bílkovina. Duchenneova a Beckerova svalová dystrofie jsou způsobeny poškozením dystrofinového genu, který nese informaci pro tvorbu bílkoviny dystrofin. Dystrofinový gen s 2.220.223 bázemi je největším genem v lidském těle. Ale jen 11.058 bází, tj. 0.5% celého dystrofinového genu rozdělených do 79 exonů specifikuje sekvenci 3.685 aminokyselin tvořících normální dystrofinovou bílkovinu ve svalových buňkách.

Velikost dystrofinového genu a bílkoviny. Rozvinutá dvojšroubovice dystrofinového genu je 0.75mm dlouhá. Dohromady s dalšími lidskými geny, kterých je podle

posledních informací 20.488, se vejde do jádra svalové buňky, které má průměr 0.01mm. Jedna molekula úplně dystrofinové bílkoviny je podstatně menší než gen, který ji kóduje, měří 125nm (=0.000125mm), 8.000 dystrofinů natažených a položených jeden za druhým má délku 1mm. A v jednom gramu svalů je 114 miliard dystrofinových molekul. Aby svaly mohly fungovat víceméně normálně, aby bylo dosaženo alespoň 30 % normální koncentrace dystrofinu. Proto je léčba DMD velký vědecký problém. Nový dystrofin nemusí být nutně úplně stejný, může být kratší ale musí být schopen správně fungovat. To znamená miliardy a miliardy nových dystrofinů v každém gramu svalů. A dítě potřebuje kilogramy svalů.

Role dystrofinu. Dystrofin je potřeba pro mechanickou stabilitu svalových buněk. Je umístěn na vnitřní straně svalové membrány. Jeden z jeho konců, tzv. **C-terminál** je připojen na skupinu dalších bílkovin ve svalové membráně, které se říká dystroglykanový komplex. Druhý konec, tzv. N-terminál, se připojuje na struktury, které se umí smrštit a způsobují ztažení svalových buněk. Středová oblast, tzv. rod doména, se skládá z pokrouceného, mnohokrát zahnutého aminokyselinového řetězce. Jestliže nastane kontrakce dystrofinový gen změní svou délku, jeho zkroucená struktura funguje jako pružina, jako jakýsi tlumič nárazu. Dystrofin takto přenáší mechanickou energii produkovanou aktin-myosin kontrakčním aparátem na svalovou membránu a struktury mimo buňku – pojivovou tkáň a šlachy tak, aby nebyly přetěžovány.

Dystrofin má ale víc rolí ve svalové buňce: bez něj se rozpadá složitá struktura dystrofin-glykoproteinového komplexu, je důležitý pro správné umístění mnoha jiných bílkovin. Reguluje složité procesy jako je udržování správné koncentrace vápníku v buňkách nebo růst buněk. Mnoho detailů složitých interakcí, kterých se dystrofin zúčastní, je stále neznámé.

Chlapci s DMD mají ve svalových vláknech příliš málo nebo vůbec žádný dystrofin. Jestliže svalům chybí ochranný a organizační efekt dystrofinu dochází při kontrakcích k poškození svalové membrány a do buněk proniká velké množství vápníku. Nadbytečný vápník aktivuje enzymy jako jsou kalpainy a další proteázy, které rozkládají proteiny ve svalové buňce a zahajují proces buněčné sebevraždy – apoptózu. Následuje celý řetěz událostí jako je zánět a aktivace fibroblastů, který vede k **fibróze**, která dále zpomaluje regeneraci svalů a způsobuje typické symptomy jaké lze pozorovat u starších pacientů s DMD.

Chlapci s pomaleji progredující Beckerovou svalovou dystrofií mají méně dystrofinu než je ve zdravých svalech, tento dystrofin je navíc obvykle kratší než normální. Takovýto dystrofin stále ještě částečně plní svou roli, ale nedokáže pracovat tak efektivně jako normální.

Při absenci dystrofinu netrpí jen kosterní svalstvo ale také hladké svalstvo a srdce. Poškozením srdce vzniká kardiomyopatie. Poškození hladkého svalstva má mnoho důsledků, například sníženou schopnost cév zvětšit svůj průměr když se zvedne průtok krve, to vede k respiračním

problémům a zhoršení prokrvení svalstva. Dalším důsledkem jsou střední potíže způsobené nedostatečnou pohyblivostí střed. Poškození jednoho jediného genu postihuje velkou část těla.

Mutace dystrofinového genu. Existují tři běžné typy mutací, které ovlivňují dystrofinový gen: **delece**, kdy jeden nebo více exonů chybí, **inzerce**, kdy se část genetické informace vyskytuje víckrát a **bodové mutace**, kdy jeden pár bází je změněný, chybí nebo naopak přebývá. Dalším typem mutace jsou změny v intronech, které ovlivňují spojování exonů během procesu vytváření mRNA.

Jelikož ribozomy čtou z mRNA třípísmenné genetická slova postupně slovo po slovu **čtecí rámec** není narušen pokud mutace způsobí delecí nebo inzerci celých slov. V takovém případě čtení zůstává v čtecím rámci a zkrácený nebo naopak prodloužený dystrofin je v buňkách produkován dál. Pokud tyto změny ovlivňují pouze méně důležité části genu dystrofin zůstává stále alespoň částečně funkční, takové mutace vyvolávají Beckerovu svalovou dystrofii. Jestli ale mutace způsobí posun čtecího rámce o jednu nebo dvě báze čtení vypadává z čtecího rámce. V takovém případě dochází v místě poruchy k použití nesprávných aminokyselin, obvykle také brzy následuje předčasný stop kodon. Nekompletní a pozměněný dystrofin není schopem plnit svou funkci, takovéto mutace vyvolávají Duchenneovu svalovou dystrofii.

Dystrofin v mozku. Dystrofin se nevyskytuje jen ve svalových vláknech ale také v jiných orgánech, například v mozku a oční sítnici. Svalová forma dystrofinu má 420kd (jeden dalton je váha atomu vodíku) a je největší *isoformou* (protein o různé velikosti vzniklý různým čtením jednoho genu) dystrofinu. Jak normální dystrofin tak 4 další isoformy se vyskytují v mozku hlavně kolem synapsí a ve stěnách cév v takzvané hemotoencefalické bariéře. Tento dystrofin je důležitý pro správnou komunikaci mezi nervovými buňkami a pro správnou funkčnost hematoencefalické bariéry, která umožňuje průchod bariérou jen těm látkám, které jsou potřebné pro normální funkci mozku.

Dystrofinový gen má 7 promotorů. Promotory jsou sekvence bází, od kterých se startuje produkce bílkovin. První 3 promotory na začátku genu kontrolují syntézu normálního dystrofinu, další 4 jsou uvnitř genu. Čím blíže konci genu je promotor umístěn tím kratší výsledný protein je. To znamená, že mutace neovlivňují produkci těch forem dystrofinu, které mají promotor za mutací. Proto chlapci s DMD s mutací v první půlce genu mohou produkovat kratší isoformy dystrofinu zatímco u chlapců s mutací na konci genu mozková isoforma dystrofinu bude chybět. To vysvětluje proč někteří chlapci mají velké potíže s učením nebo problémy s chováním zatímco jiní jen mírné nebo vůbec žádné.

Jelikož jiné isoformy dystrofinu se nachází i v oční sítnici může u některých typů mutací docházet ke zhoršení barevného vidění.

Tyto informace pochází od profesora **Francesco Muntoni** z Imperial Colledge v Londýně.

Exon skipping

Exon skipping není léčba. Technika exon skipping zkouší převést rychle progredující DMD na výrazně pomaleji progredující BMD. Tato technika *nemění gen*, pouze ovlivňuje to jak je gen čten, jak je z něj dystrofin syntetizován. Exon skipping nikdy nebude úplná léčba DMD, pouze zmírní závažnost symptomů. Jestliže mutace, a je jedno jestli delece, duplikace nebo bodová mutace, porušuje čtecí rámec mRNA a způsobuje DMD je možno jej obnovit umělým odebráním jednoho nebo více exonů pomocí *antisense oligonukleotidů*, AONů. AONy jsou krátké kusky RNA konstruované tak, aby byly komplementárními doplňky spojovacích sekvencí těch exonů v pre-mRNA, které chceme odstranit. Tyto AONy interferují se spojovacími mechanismy tak, že dokáží vyblokovat konkrétní exony a žádné jiné.

Protože takto modifikovaná RNA je kratší než normální, dystrofin bude taky kratší, bude mu chybět část aminokyselin. Jsou-li tyto aminokyseliny součástí oblastí, jako je třeba rod doména, které nejsou nezbytně nutné pro fungování dystrofinu, zkrácená bílkovina stále může vykonávat svoji stabilizující funkci ve svalové membráně. Výsledkem bude změna fenotypu z DMD na mírnější BMD.

Pro první klinické testy jsou použity 2 druhy chemicky chráněných AONů. AONy musí být chráněny protože jinak by rychle podléhaly zničení buněčnými enzymy rozkládajícími nukleové kyseliny. Tyto dva typy AONů se nazývají 2'-O-methyl AONy a morfolino AONy.

Exon skipping - klinický pokus v Holandsku. První pokus s technikou exon skipping na člověku proběhl v Holandsku v období od ledna 2006 do března 2007. Byl vymyšlen tak, aby dokázal funkčnost této metody na člověku, pacienti z něj ale neměli žádný zdravotní prospěch. Byla to lokální studie na malém kousku svalu na šlapce nohy do kterého byl injikován 2'-O-methyl AON s označením PRO051 zacílený na exon 51. S těmito chemicky chráněnými AONy holandské vědci pracovali mnoho let. V předklinických experimentech, byli schopni dosáhnout přeskočení potřebného exonu nejen na kulturách svalových buněk ale i u živých myši a psů jak při lokální tak systematické (zasahující celé tělo) injekci.

Před startem prvních klinických testů každému chlapci byly provedeny klinické a genetické testy tak, aby bylo jisté, že technika exon skipping u nich povede k tvorbě zkráceného dystrofinu. Pokusu se účastnili 4 chlapci mezi 10 a 13 lety, všichni již na vozíku, s delecemi exonů 50, 52, 48-50 a 49-50. Chlapci byli léčeni postupně, to znamená, že až bylo jisté, že u předchozího chlapce nebyly žádné vážné vedlejší účinky a test byl pozitivní, další chlapec byl léčen. Každý chlapec dostal v lokální anestezii injekci 0.2mg PRO051 rozpuštěného v 0.9% roztoku NaCl do malé oblasti svalu tibialis anterior o velikosti 1.5cm.

Po čtyřech týdnech jim byl odebrán kousek svalu a otestován jestli se v něm nachází mRNA s vynechaným exonem 51 a zkrácený dystrofin. Tyto testy ukázaly, že 4 týdny po injekci 64%, 85%, 97% resp. 73% svalových vláken obsahovalo dystrofin správně lokalizovaný v membránách. Vzhledem k lamininu $\alpha 2$, proteinu, který není ovlivněn dystrofickým procesem, bylo množství dystrofinu 33%, 35%, 17% a 25%. Toto porovnání bere v úvahu rozsah svalové

degenerace. Bez tohoto přepočtu by třináctiletý chlapec s velkým množstvím pojivové a tukové tkáně ve svalech měl jen 3% normálního množství dystrofinu, zatímco chlapec s nejméně poškozenými svaly 12%. Molekulární metody prokázaly, že nový dystrofin měl přesně očekávanou strukturu, že čtecí rámec byl obnoven. Nebylo ale možné určit jestli by toto množství nového dystrofinu bylo schopno zpomalit progresi choroby v celém svalu protože léčený objem byl příliš malý.

Tyto výsledky naznačují, že léčba metodou exon skipping by měla být zahájena dokud většina svalů ještě není příliš poškozena, nejlépe ihned poté co bude známa přesná mutace.

Holandské vědci nyní připravují nový klinický pokus při kterém bude AON PRO051 podán tak, aby se dostal do krevního oběhu, takže lék bude moci proniknout i do srdce a plic. Léčba bude podána podkožní injekcí protože pokusy na myších a opicích ukázaly, že při tomto způsobu aplikace je lék schopný se dostat do všech svalů včetně srdce a bránice bez vážnějších vedlejších účinků. Další výhodou je, že v případě častější potřeby léku při tomto způsobu aplikace nebude nutno chodit do nemocnice k odborníkovi.

Tato metoda byla vyvinuta na universitě v Leidenu, vyvinuli ji profesor **Gertjan van Ommen** a profesorka **Judith van Deutekom** a jejich tým, za organizaci a provedení klinických testů je odpovědná firma Prosensa B.V. z Leidenu v jejímž čele je Dr. **Gerard Platenburg**, profesorka van Deutekom je zde nyní ředitelkou pro výzkum.

Positivní výsledky preklinických studií a klinické studie s lokální aplikací přesvědčily vedení firmy Prosensa o tom, že má smysl začít systematickou I/II fází klinických testů v roce 2008. Cílem je zjistit negativní účinky tohoto způsobu podávání léku a efektivnost ve svalech. Studie bude provedena na chlapcích s DMD ve věku 5-15 let, bude trvat 5 týdnů. Po tuto dobu budou účastníci pokusu dostávat 1x týdně podkožní injekci PRO051. Protože není jisté jestli dávka AONů nastavená podle pokusů na zvířatech bude bezpečná u dětí začne se s malou dávkou u jednoho chlapce a pokud nenastanou problémy bude se dávkou pomalu zvyšovat tak, aby bylo dosaženo optimálního množství.

Pro tyto testy Prosensa připravila 1g AONu zacíleného na exon 51 v kvalitě vhodné pro klinické testy. Byly také vyvinuty AONy na exony 43, 44, 45, 46, 50, 52 a 53. Tyto AONy a již zkoušený AON na exon 51 by měly umožnit léčbu přibližně 65% pacientů s delecemi. Ale z finančních důvodů Prosensa připravuje pro klinické testy jen AONy pro exony 44 a 52. Pro další vývoj Prosensa potřebuje víc kapitálu, proto si velmi váží nemalých sponzorských darů rodičovských organizací jako jsou holandský a německý Parent Project, francouzský AFM apod.

Zdroje: Van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, et al.: Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007; 357; 2677-86.

Hoffman, EP. Skipping toward personalized molecular medicine. *N Engl J Med* 2007; 357; 2719-22

Exon skipping - klinický pokus ve Velké Británii. Další klinický test metody exon skipping připravuje ve Velké Británii konsorcium MDEX pod vedením profesora

Francesco Muntoni z Imperial Colledge London. MDEX konsorcium je financované ministerstvem zdravotnictví Velké Británie a charitativními organizacemi jako jsou Muscular Dystrophy Campain, ActionDuchenne a Duchenne Parents Support Group.

Osmdesát různých AONů bylo testováno na svalových buněčných kulturách zdravých lidí, chlapců s DMD, na nedystrofických myších a na myších s lidským genem pro dystrofin. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s morfolinem AON H51A, které vyvinul **Steve Wilton** a u kterého **Dominic Wells** dokázal, že je dostatečně stabilní pro dlouhodobou klinickou léčbu. Morfolino je vyráběno v kvalitě potřebné pro klinické testy firmou AVI BioPharma Inc. V Portlandu, Oregon, a má označení AVI-4658.

Tři skupiny po třech chlapcích s DMD ve věku od 12 do 18 let dostali tři různé dávky morfolina: 0.09mg, 0.297mg a 0.9 mg ve fyziologickém solném roztoku a to v devíti injekcích do svalu *extensor digitorum brevis* jedné nohy. Tento sval byl vybrán protože je snadno dostupný a může být snadno bioticky odebrán bez vážnějších důsledků v případě, že by došlo k nějakým závažným problémům. Z kontrolních důvodů stejný sval druhé nohy dostal injekci solného roztoku. Rozsáhlá klinická kontrola včetně biopsie byla provedena před injekcemi morfolina a 30 dní po injekci.

První injekci morfolina dostal první pacient 18 prosince 2007. Předpokládá se, že výsledky celé studie budou k dispozici koncem 2008. Jakmile první studie ukáže slibné výsledky začne systematická studie, která je již předem připravována. Při ní bude podkožně injikován AON AVI-4658. Jeden z nejpřesvědčivějších předklinických testů byl proveden na dystrofických myších. Myši dostali v týdenních intervalech 7 injekcí do ocasní žíly. To vedlo ke vzniku přibližně 50% normálního množství dystrofinu ve většině svalů a udrželo se v nich nejméně 14 týdnů.

V plánovaném systematickém testu budou dostávat čtyři skupiny ještě chodících chlapců s DMD jednou týdně podpožní injekci AVI-4658. Začne se s malou dávkou 600mg a postupně se tato dávka bude zvyšovat až na 3g – počítáno na váhu průměrného desetiletého chlapce. V předchozích klinických testech AONů pro jiné choroby bylo použito dávky až 300mg/kg/den, tato dávka byla dobře snášena, takže startovací dávka 600mg je bezpečně nízká. Cílem testu je ověřit bezpečnost léku a zjistit změny ve svalu a v jejich výkonnosti. Vědci doufají, že se jim takto podaří najít nejmenší dávku, která již vyvolá dostatečnou produkci dystrofinu a přitom bude tolerována pacienty bez vážnějších vedlejších účinků.

Detailní popis lokální klinické studie je možno nalézt na: <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00159250>

Arechavala-Gomez V, Graham IR, Popplewell LJ, et al and Muntoni F. Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. *Human Gene Therapy*, 2007; 18; 798/810.

Exon skipping s transferem genu U7. Vědci z G n thon Institute v Evry nedaleko Paříže profesor **Luis Garc a** a Dr. **Aur lie Goyenvalle** (v současnosti Oxfordská univerzita) zkouší kombinovat metodu exon skipping s genovou terapií. Snaží se přimět svalovou buňku k tomu, aby sama

produkovala AONy, aby je nebylo nutno podávat opakovaně. Toho lze dosáhnout tím, že se do svalové buňky vloží modifikovaná U7-snrRNA obsahující genetickou informaci pro tvorbu AONů. U7-snrRNA jsou malé jaderné RNA, které mají strukturu podobnou spojovacím faktorům (splicing factors). V dalším výzkumném programu vyvinuli francouzští vědci dokonce novou, obecnější exon skipping techniku, která využívá virového transferu genu U7.

Aby vyzkoušeli tuto metodu zkonstruovali modifikovaný gen pro U7-snrRNA. Ten obsahoval komplementární DNA sekvence dvou AONů, které jsou potřebné pro odstranění exonu 23 u mdx myši. Tyto krátké snRNA stejně jako všechny ostatní RNA jsou „vytvořeny“ geny. Modifikovaný U7 gen, označovaný jako U7 SD23/BP22, společně s kontrolními sekvencemi byl vložen do AAV vektoru typu 2 a injikován nejdříve lokálně do jednoho svalu mdx myši a potom do krevního oběhu. To vedlo k vytvoření dystrofinu bez části kódované exonem 23 až u 80% svalových vláken léčeného svalu. Tento zkrácený dystrofin migroval do své normální pozice pod buněčnou membránou, byl tak stabilní, že se ve svalu vyskytoval ještě po roce a nezpůsobil žádné imunitní reakce. Dystrofický proces, to znamená zrychlená svalová degenerace a regenerace, byl úplně zastaven. U takto léčených mdx myši se nevyvinula svalová degenerace ani po velké fyzické námaze, která je běžná u neléčených myši.

Technika transferu U7 genu byla poté odzkoušena i na GRMD psoch - dystrofických golden retrievrech. Tito psi mají mutaci v části exonu 7 sloužící k napojení na další exony. Tato mutace může být „opravena“ přeskočením exonů 6 a 8. Za použití modifikovaného U7 vektoru obsahujícího antisense struktury proti exonům 6, 7 a 8 bylo dosaženo téměř normální hladiny dystrofinu po dvou měsících po jediné injekci do jednoho svalu. Při lokálně systematické léčbě, při níž byl lék vpraven do jedné nohy, která měla dočasně přerušovaný krevní oběh, bylo dosaženo velkého množství dystrofinu, který byl přítomen ještě 6 měsíců poté.

Druhá metoda založená na transferu genu U7 je založena na vynechání exonu za pomoci nového a téměř univerzálního U7snRNA vektoru, který nese komplementární DNA sekvenci pro konkrétní exon a volný konec, který má místa pro navázání různých jaderných ribonukleoproteinů A1/A2 (hnRNP), proteinů, které inhibují proces spojování pro všechny exony. Jakmile je komplementární sekvence transferovaného genu přepsána do RNA napojí se na exon, který má být přeskočen, a protože nese struktury přitahující hnRNP proteiny indukuje přeskočení exonu, protože tyto proteiny interferují se spojovacím proteinovým komplexem nacházejícím se na koncích konkrétního exonu v pre-mRNA. Tento způsob přeskočení exonu není způsoben běžným AONem ale univerzálním proteinem, který je stejný pro všechny exony. Tato metoda byla laboratorně úspěšně vyzkoušena pro exon 51 na myoblastech pacienta s DMD.

Důvodem pro tento postup je významné zkrácení schvalovacího procesu vyžadovaného pro všechny AONy u normální exon skipping metody. Nová metoda používá jen jednu „univerzální“ strukturu s komplementární DNA sekvencí pro každý exon.

Goyenvalle A, Vulin A, Foug rouse F, et al, Garc a L a Danos O.: Rescue of dystrophic muscle through U7snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004; 306; 1796-99

Multiexon skipping u dystrofických psů. Přibližně 50% všech případů DMD, které jsou způsobeny delecí, duplikací nebo bodovou mutací bude potřebovat vynechání dvou nebo více exonů pro to, aby byl obnoven čtecí rámec. Protože dystrofické psy potřebují dvojitý exon skipping experimenty s nimi by mohly otevřít cestu k vývoji multi-exon skipping metody pro DMD chlapce s touto „obtížnější“ mutací. Podle teoretických úvah by současné vynechání jedenácti exonů mezi exony 45 a 55 mělo DMD transformovat na BMD s velmi mírnými symptomy asi v 63% případů DMD způsobených delecí.

Profesor **Terence Partridge** z Children's National Medical Center ve Washingtonu a jeho kolegové začali s vývojem multi-exon skipping metody na GRDM psech. Narozdíl od mdx myší, které mají jen mírné dystrofické symptomy, tyto psy jsou silně postiženy, takže pokusy s nimi by měly dát výsledky, které budou velmi podobné výsledkům klinických studií na DMD pacientech. A pokusy trvající několik let mohou být vykonány na psech protože ti žijí podstatně déle než myši.

Tito psy mají mutaci na spojovací části exonu 7, to způsobuje delecí exonu 7 v mRNA, posun čtecího rámce a velmi brzy předčasný stop kodon. Vynechání exonů 6 a 8 by mělo způsobit návrat do čtecího rámce.

V první lokální studii vědci injikovali různé dávky koktejlů tří morfolino AONů, dva různé pro exon 6, jeden pro exon 8, do svalu *tibialis anterior* mladých dospělých GRMD psů. Za dva týdny jim byla udělána biopsie, z analýzy těchto vzorků vyplynulo, že prakticky všechna vlákna obsahovala nový, zkrácený dystrofin a měla téměř normální strukturu. Jenže kromě exonů 6 a 8 byl přeskočen i exon 9, což ale naštěstí nenarušilo čtecí rámec. V předcházejících pokusech na tkáňových kulturách exony 6 a 9 byly přeskočeny při použití jediného AONu na exon 6, toto se ale neprojevilo když bylo morfolino injikováno přímo do svalu. Z toho plyne, že výsledky testů metody exon skipping provedené na tkáňových kulturách nám neumožňují spolehlivě předvídat co se stane ve svaích živých zvířat nebo lidí.

Ve spolupráci s Dr. Shin'ichi Takeda z General Animal Research Facility v Tokiu byl uskutečněn pokus o systematickou léčbu tří dvouměsíčních GRMD psů. Psi dostali tři injekce tří AONů do žíly na noze. Tato léčba vedla opět k vynechání čtyř exonů: 6, 7, 8, 9. Po dvou měsících vysoké procento svalových vláken produkovalo zkrácený dystrofin a to v množství úměrném dávce AONů. Žádný dystrofin ale nebyl nalezen v srdci protože, jak bylo známo již z předchozích pokusů, morfolino není schopno pronikat do srdce.

Na základě svalových testů byl fyzický stav psů stabilizován na té úrovni na jaké byli před léčbou zatímco stav svalů neléčených psů se za tu dobu hodně zhoršil. Z toho vyplývá, že systematická léčba je schopna zastavit degeneraci

Transfer dystrofinového genu

Transfer dystrofinového genu pomocí virového vektoru. Transfer modifikovaného dystrofinového genu pomocí AAV (adenoassociated virus) vektoru (genový přenašeč) do svalových buněk je jedna z možných strategií pro

svalů. Pro analýzu svalů byla využita i nukleární magnetická rezonance (NMR). Tato neinvazivní metoda prokázala, že je schopna poskytnout srovnatelné výsledky jako vzorky svalů z biopsie. Toto je velmi důležitý poznatek pro nadcházející klinické testy protože potřeba opakované biopsie může být minimalizována.

Tyto testy znamenají, že morfolino AONy fungují na velkých savcích s podobnou strukturou těla jako má člověk. Nejsou toxické, nevyvolávají imunitní reakci. Budou ale muset být podávány opakovaně protože jejich efekt není trvalý. Na druhou stranu to znamená, že pokud by se vyskytl problém byl by jen přechodný, ne trvalý. Působí jen ve tkáních jako jsou třeba svaly, kde se z dystrofinového genu vytváří pre-mRNA. Výsledky těchto velmi slibných testů budou brzy publikovány.

Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, et al.: Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exon 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation* 2007; 28(2); 196-202

Exon skipping s peptidovou nukleovou kyselinou. Pro klinické testy jsou používány dva typy AONů. Jsou to 2'-O-methyl v Holandsku a morfolino v UK. Další skupina AONů tzv. PNA (peptide nucleic acids) je v současnosti zkoumána pro svou schopnost vyvolat vynechání exonu. RNA a PNA mají rozdílnou kostru: řetězec střídajících se fosfátových a ribózových jednotek tvoří kostru RNA zatímco kostra PNA je tvořena řetězcem aminokyselin. Díky své ne-iontové peptidové kostře mezi aminokyselinovými jednotkami PNA připomíná elektricky neutrální proteiny. PNA je rozpustná ve vodě, velmi stabilní, je snadno modifikovatelná tak, aby nesla běžné báze DNA a RNA ve správném prostorovém uspořádání s jakoukoliv požadovanou sekvencí, proto se mohou snadno vázat na komplementární DNA nebo RNA sekvence. Takže PNA řetězce s 20-30 bázemi jsou v současnosti také využívány v experimentech s metodou exon skipping.

Dr. Mathew Wood a jeho kolegové na University of Oxford vytvořili antisense PNA pro exon 23 mdx myší. Experimenty na buněčných kulturách a injekce do svalu *tibialis anterior* mladých i starých mdx myší ukázaly, že 3 týdny po jediné injekci mnoho svalových vláken obsahovalo nový dystrofin, který byl stabilní víc jak 8 týdnů. Pro zlepšení efektivnosti pronikání do svalů PNA bylo spojeno s peptidy a proteiny jako jsou například na arginin bohaté syntetické peptidy určené k pronikání TAT doménou HIV viru. Velmi pozitivní výsledky metody exon skipping mohou být dokonce ještě zlepšeny s novou PNA kostrou.

Detaily těchto experimentů zde nemohou být publikovány protože ještě nebyly oficiálně publikovány. Jsou ale velmi nadějně a mohly by vést k lékům, které by velmi efektivně dokázaly odstranit potřebný exon.

terapii DMD. Úspěšné experimenty s dystrofickými psy a myšima pomohly firmě Asklepius z Chapel Hill ze Severní Karolíny ve vývoji léku *Biothropin* a prvním klinickým testům této terapeutické metody.

Tyto malé viry nejsou schopny se množit v buňkách, které infikovaly, protože většina jejich genů je odstraněna. Tím se v nich uvolnilo místo pro terapeutický gen o velikosti 5000 párů bází. Ale i to je málo pro dystrofinový gen. Proto vektory použité v tomto pokusu nesou dystrofinový gen bez intronů (tzv. cDNA) a mají vynechané exony 18-59, 70-79 a částí exonu 17. Transfer takového *mikro genu* proto nebude schopen léčit DMD, pouze jej změnit na daleko pomaleji progredující BMD. Tento nový "Beckerovský" dystrofin má mít asi třetinovou délku oproti normálnímu dystrofinu. V roce 1990 byl diagnostikován 61 let starý pacient stále schopný chůze, který měl právě takto zkrácený dystrofin ve svých svalech. Až bude vyvinuta tato léčba budou z ní mít prospěch všichni pacienti bez ohledu na typ mutace. Předpokládá se, že terapeutické účinky budou srovnatelné s metodou exon skipping, která je ale použitelná jen pro některé typy mutací.

Po dokončení testů bezpečnosti a toxicity mini-dystrofinového vektoru na laboratorních zvířatech byl v letech 2006 a 2007 proveden tzv. *double-blind* test (test při kterém ani pacient ani lékař neví jestli pacient dostává placebo nebo lék) na šesti chlapcích starších šesti let. Tato Ia fáze proběhla v Nationwide Children's Hospital ve spolupráci s The Ohio State University in Columbus, pokus vedl profesor **Jerry Mendel**. Chlapci dostali injekci Biostrophinu do bicepsu do tří míst vzdálených od sebe 0,5cm. Do druhého bicepsu dostali injekci se solným roztokem. Chlapci byli rozděleni do dvou skupin po třech, jedna skupina dostala nižší dávku léku, druhá vyšší. Po čtyřech týdnech byly čtyřem chlapcům odebrány vzorky svalů z injikovaných míst, dalším dvěma byly odebrány po dvanácti týdnech. Během léčby nebyly u pacientů pozorovány žádné negativní vedlejší účinky což naznačuje, že lék by mohl být dobře tolerován. Kompletní výsledky budou publikovány jakmile budou všechna data vyhodnocena.

Neočekává se, že by chlapci měli nějaký zdravotní prospěch z této studie, cílem bylo dokázat že tato metoda neprodukuje jen nějaký dystrofin u myši a psů, ale že funguje i na lidech a nemá žádné závažné vedlejší účinky jako třeba imunologickou reakci na dystrofin nebo AAV vektor.

Před přípravou dalších klinických testů bylo potřeba udělat nejdříve experimenty na zvířatech, aby se našel nejlepší postup pro aplikaci léku do krevního oběhu. Na základě těchto experimentů bylo rozhodnuto aplikovat lék regionálně do krevního oběhu nohou protože lék je zatím vyráběn jen v omezeném množství. Toto množství by mělo být dostačující pro to, aby prodloužilo dobu po kterou budou pacienti schopni chodit.

Jediná injekce AAV typu 6 nebo 8 s mikrodystrofinem do dočasně blokováného krevního oběhu nohy mdx myši vedla k obnově produkce mikrodystrofinu ve více než 80% vláken svalů nohy a vedla k výraznému zlepšení funkčnosti na dobu až jednoho roku.

Tento pokus byl opakován s opicí makak, jejíž tělesná stavba a váha jsou podobné malým dětem. Makak byl zdravý jedinec, produkoval dystrofin a netrpěl tudíž dystrofií. Proto vektory nesly zeleně fluoreskující protein – umělý signální protein, který se snadno detekuje. Pokus opět prokázal, že 60% až 80% vláken ve svalech noh obsahovalo transferovaný zeleně fluoreskující protein.

Tento pozitivní výsledek pokusu na myších a opicích podnítil vědce k přípravě tzv. překlenovacího, pokusu (fáze

Ib) s chlapci s DMD, který začne v roce 2008 nebo 2009. Předpokládá se, že po tomto pokusu s regionální technikou transferu účastníci budou schopni chodit déle než bez léčby čímž se zvýší kvalita jejich života.

Rodino-Klapac LR, Janssen ML, et. Al. a Mendell JJ.: A translational approach for limb vascular delivery of the microdystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Translational Medicine*, 2007;5;45.

Genový transfer pomocí plasmidů. Firma Transgene ze Štrasburgu ve spolupráci s French muscular dystrophy association (AFM) začala v roce 1995 testovat transfer dystrofinového genu pomocí plasmidů. Tuto práci řídil vědecký ředitel AFM Dr. **Serge Braun**. U této techniky všech 79 exonů dystrofinového genu bylo vloženo do plasmidu. Plasmidy jsou malé kruhové DNA neobsahující žádný protein, nic než holou DNA. Po úspěšném testu na kulturách svalových buněk, dystrofických myších a psech začal koncem roku 2000 klinický test na devíti DMD a BMD pacientech, kteří museli být starší 15ti let protože byl vyžadován informovaný souhlas pacientů. Plasmidy byly injikovány do svalu ruky. Nový dystrofin o úplné délce se objevil až ve 25% svalových vláken okolo injikovaného místa. Neobjevila se žádná imunologická reakce ani proti plasmidům ani vůči nově produkovanému dystrofinu. Tento test potvrdil, že transfer genu dystrofinu pomocí plasmidu obsahujícího dystrofinovou cDNA je bezpečný.

Po tomto úspěšném testu začali francouzští vědci spolupracovat s týmem Dr. **Jon Wolffa** z firmy Mirus v Madisonu ve Wisconsinu. Společně injikovali podobné plasmidy *pod tlakem* do krevního oběhu myši, potkanů, psů a opic. Tlak vyvolali krátkodobým zablokováním krevního oběhu končetiny pomocí stahovací manžety. Jakmile bude dostatek nových plasmidových vektorů s dystrofinovým genem začnou klinické testy. Tyto testy jsou nutné kvůli pacientům s takovou mutací u které metoda exon skipping nepomůže.

Transplantace myogenních buněk. Profesor **Jacques Tremblay** a jeho kolegové z Laval University v kanadském Quebecu pokračují ve vývoji techniky transferu myoblastů, které teď říkají *transplantace myogenních buněk*.

V klinických testech dokázali vyvolat vznik dystrofin pozitivních vláken u osmi pacientů z devíti a dosáhnout až 26% dystrofin pozitivních vláken v okolí místa vpichu. K pokusu byly použity normální myogenní buňky od příbuzných dárců. Injekce byly napíchny jen 1-2mm od sebe do malé oblasti holenního svalu *tibialis anterior*.

Tento způsob transplantace má několik výhod: (1) nový dystrofin má normální délku a je pod kontrolou normálních buněčných kontrolních mechanismů, (2) pozitivní efekt této léčby by měl být dlouhodobý, (3) tuto léčbu lze kombinovat s farmakologickou léčbou, (4) to nejdůležitější je, že může pomoci i starším pacientům s DMD.

Tato technika byla nejdříve odzkoušena na opicích, potom na dvou více než osmnáctiletých pacientech s DMD. Při pokusu bylo napíchno přibližně 100 injekcí do 1 čtverečního centimetru svalu. Oba pacienti dostali injekce při lokálním umrtvení do jednoho nebo více celých svalů. Jeden z pacientů

měl v té době 26 let, za 18 měsíců mu byla provedena biopsie a bylo zjištěno, že stále ještě 34% svalových vláken produkuje dystrofin pocházející z myogenních buněk. U tohoto pacienta transplantace umožnila zdvojnásobit sílu svalu hýbajícího palcem. Vzhledem k tomu, že pacient věděl, že dostal myogenní buňky není vyloučeno, že část nárůstu svalové výkonnosti spadá na vrub placebo efektu. Druhý pacient měl v době pokusu 18 let, tomu byly myogenní buňky napíchnuty jen do jednoho svalu účastníčného se pohybu zápěstí. U tohoto pacienta byl zjištěn nárůst svalové síly za 3 měsíce, ale za 6

měsíců vymizel. Žádná dystrofin pozitivní svalová vlákna nebyla nalezena ve vzorku odebraném po šesti měsících. Naopak byly zjištěny stopy odmítnutí těchto buněk organismem. Přesto oba pacienti byli ochotni se zúčastit podobného pokusu znova.

Dr Tremblay a kolegové nyní zkouší blokovat myostatin při transplantaci myogenních buněk a vyvíjí techniku, kterou by umožnili vyhnout se dlouhodobému použití imunosupresivních léků.

Kmenové buňky

Svalová regenerace s pomocí embryonálních kmenových buněk. Již v ranných fázích vývoje embrya se kolem nervové trubice začínají tvořit buňky, které jsou předchůdci kosterního svalstva. Pod vlivem transkripčních faktorů (proteinů, které kontrolují aktivitu genů – zvláště Pax3) se dále diferencují (tvorí se z nich specializovanější buňky) až z nich nakonec vzniknou buňky kosterního svalstva. Kdyby bylo možno získat nediferencované buňky schopné diferencovat se ve svalové buňky mohly by být namnoženy a potom použity k regeneraci dystrofických svalů protože by jim mohly přinést nepoškozený dystrofinový gen.

Profesorka **Rita Perlingeiro** a její tým z University of Texas Southwestern Medical Center v Dallasu zkoušeli izolovat tento ranný typ buněk z myších embryonických buněk v buněčné kultuře. Zjistili, že pokud chtějí z buněčné kultury získat myogenní buňky (svaly vytvářející buňky) diferencující se embryonální buňky potřebují transkripční faktor Pax3. Gen pro Pax3 vložili do X chromosomu kmenových buněk a cytometrickými metodami (metody pro třídění buněk) byli schopni získat myogenní buňky, které pak diferencovali pět dní. Buňky, které měly PDGF-alpha receptor ale neměly Flk-1 receptor generovaly buňčnou populaci, která produkovala pouze svalová vlákna bez rizika vzniku rakovinných útvarů.

Buňky s touto vlastností byly namnoženy a injikovány mdx myším lokálně do svalu tibialis anterior nebo do krevního oběhu. Dystrofin začalo produkovat 11% - 16% všech svalových vláken což bylo doprovázeno výrazným vzrůstem svalové výkonnosti. Vzhledem k tomu, že ne všechny buňky musí obsahovat dystrofin, aby došlo k výraznému zlepšení zdravotního stavu, tento typ buněčné léčby by mohl vést k účinné terapii DMD.

Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, et al., Perlingeiro RCR. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nature Medicine*, 2008;14:134-143

Regenerace svalů pomocí svalových kmenových buněk. Aby kmenové buňky mohly být použity pro léčbu DMD musí mít tyto vlastnosti: (1) Měly by být snadno izolovatelné z lidského biologického materiálu jako je například svalová tkáň; (2) měly by se dít snadno namnožit v laboratorních podmínkách na množství nezbytné pro systematickou léčbu; (3) mělo by být možné do nich dostat "zdravý" dystrofinový gen pomocí virových vektorů; (4) měly by být vhodné pro systematickou léčbu, tj. kolovat tělem pomocí krevního oběhu; (5) měly by být schopné dostat se z

krevního oběhu do svalů; (6) měly by být schopné vyprodukovat funkční svalové buňky s dystrofinem a vytvořit funkční satelitní buňky uvnitř dystrofických svalů; (7) neměly by mít vážné vedlejší účinky, zejména nesmí způsobit rakovinu. Byly identifikovány dva typy buněk, které, jak se zatím zdá, mají tyto vlastnosti a jsou to "dospělé" nikoliv embryonální kmenové buňky: *mesoangioblasty* a *pericyty*. Tyto kmenové buňky se nachází na vnější straně vlásečnic ve svalech, odtud mohou být získány.

Po úspěšném experimentu s mesoangioblasty na myších, kterým chyběl protein *alfa-sarkoglykan*, profesor **Giulio Cossu** a jeho kolegové ze Stem Cell Institute z Hospital San Raffaele v Miláně izolovali podobné buňky nazvané *perocyty* z kapilár zdravých i dystrofických lidských svalů a injikovali do mdx myši s inaktivovaným imunitním systémem. Než byly dystrofické pericyty injikovány podstoupily léčbu virovými vektory nesoucími minidystrofinový gen. V obou případech velké množství svalových vláken myši obsahovalo nový dystrofin a funkčnost jejich svalů se výrazně zlepšila.

Dalším krokem směrem k léčbě člověka byla pokusná systematická léčba čtyř dystrofických psů pomocí jejich vlastních buněk do kterých byl přenesen lidský mikrodystrofinový gen a šesti psů pomocí buněk od zdravých psů, které obsahovaly normální psí dystrofin ale vyžadovaly použití imunosupresivního léku cyklosporin. Daleko lepších výsledků bylo dosaženo léčbou pomocí zdravých psích buněk než pomocí vlastních buněk. Jeden pes, který dostal kmenové buňky přímo do aorty chodil 5 měsíců po ukončení pětítýdenní léčby. Ostatní psi regenerovali podstatně pomaleji.

Léčba pomocí vlastních buněk se nyní opakuje s využitím většího minidystrofinu. Dělají se také kontrolní pokusy, které mají určit jak velký vliv na zlepšení zdravotního stavu má cyklosporin, a zjišťuje se jestli satelitní buňky na svalových vláčkách jsou funkční. Po dalších dlouhodobých testech na psech a po přípravě buněk v kvalitě nutné pro klinické testy bude spuštěna I. fáze testů na pacientech s DMD v níž bude ověřována bezpečnost a produkce alespoň nějakého dystrofinu ve svalech.

Svalová regenerace pomocí geneticky modifikovaných kmenových buněk. Profesor **Luis García** a jeho tým z Genéthon Institute in Évry u Paříže a profesor **Yvan Torrente** z Stem Cell Laboratory z University of Milan pracují společně na nové terapii pro DMD. Izolovali kmenové buňky ze svalů pacientů s DMD, opravili jejich dystrofinový gen pomocí modifikované metody exon skipping a injikovali je

mdx myším. Tato léčba regenerovala myší svalová vlákna a výrazně zredukovala dystrofické symptomy.

Následující text je zjednodušené a zkrácené shrnutí velmi složité strategie. Pacientům s DMD s delecí exonů 49 a 50 byly odebrány kmenové buňky, hlavně satelitní buňky. Pro svůj experiment francouzsko-italský tým použil jen asi 1% buněk, které obsahovaly markerový protein CD133 ve svých membránách. U těchto buněk bylo před tím zjištěno, že jsou schopny opravit dystrofické svalové buňky a vytvořit nová svalová vlákna v poškozených svalech. CD133+ buňky byly laboratorně namnoženy a potom přeléčeny lentivirovým vektorem, který obsahoval genetický materiál pro tvorbu AONů pro exon skipping exonů 51 přímo v buňkách.

Pro experiment byly použity scid/mdx myši, to znamená myši bez dystrofinu a s poruchou imunitního systému. 24 hodin před experimentem byly myši donuceny plavat, aby se zvýšil proces degenerace-regenerace v jejich svalech. 24 myši dostalo od 20.000 do 40.000 lidských dystrofických geneticky upravených kmenových buněk lokálně do tibialis anterior ve

třech injekcích, 6 dalších dostalo 500.000 těchto buněk do stehenní tepny jedné nohy. 21 a 45 dní po injekci kmenových buněk byla vykonána řada testů pro vyhodnocení účinnosti této léčby.

Výsledky pokusu ukázaly, že došlo k svalové regeneraci, ve svalových vláknech vzniklo velké množství dystrofinu, kterému podle očekávání chyběly aminokyseliny kódované exony 49, 50, 51 a svalová morfologie (struktura) se zlepšila a výrazně se zlepšila svalová výkonnost.

Tato technika otvírá nové možnosti léčby DMD. Avšak před tím než bude možno začít s klinickými testy bude nutno úplně porozumět mechanismu exon-skippingu za pomoci lentivirového vektoru protože tyto viry se stávají součástí genetického materiálu buněk a mohou poškodit jiné geny nebo dokonce vyvolat rakovinu.

Benchair R, Merigalli M, Farini A, et al. a García L, Torrente Y. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Stem Cell* 2007; 1; 646-657

Farmakologické metody

Léčba steroidy. Na výroční konferenci organizace ActionDuchenne (bývalý PPUK) v listopadu 2007 profesor **Adnan Manzur** z londýnského Hammersmith Hospital přednesl příspěvek o aktuálním stavu léčby DMD pomocí steroidů, které jsou v současnosti jedinou odzkoušenou léčbou schopnou zpomalit progresi DMD. Léčba steroidy je v současnosti považována za jistý "zlatý standart" s kterým jsou všechny ostatní vyvíjené léčby porovnávány.

Do dneška bylo provedeno 47 klinických studií v mnoha zemích, ale jen 6 z nich bylo vědecky přínosných "oboustranně slepých" (ani pacient ani lékař neví jestli pacient dostal lék nebo placebo) s úplnými veřejně publikovanými výsledky. Ve většině studií bylo zkoušeno denní podávání steroidů, v některých byly zkoušeny i jiné režimy, například 10 dní na steroidech, 10 dní bez nebo 10 po sobě jdoucích dní v měsíci apod. Některé důležité výsledky uvádíme:

První oboustranně slepou studii provedl v roce 1991 *Fenichel* z USA. V této studii 99 chlapců dostávalo po dva roky prednisone v dávce 0,75mg/kg/den. Tento pokus poprvé spolehlivě potvrdil, že steroidy zlepšily a stabilizovaly svalovou výkonnost chlapců s DMD téměř na 3 roky. Ale na 73% chlapců měla tato léčba nějaké vedlejší negativní účinky, většinou to byl velký nárůst váhy.

Další oboustranně slepou studii provedl v roce 2000 *Reitter* z Německa. Zkoušeli dva léky: prednisone a deflazacort na 100 chlapcích. Nárůst váhy byl výrazně vyšší u chlapců léčených pomocí prednisone, ale deflazacort vedl k daleko závažnějšímu zákalu. Ne všechny výsledky této studie byly publikovány.

V roce 2006 publikoval *Biggar* z Kanady výsledky dlouhodobé studie provedené na 74 chlapcích ve věku od deseti do osmnácti let. 40 z nich dostávalo denně deflazacort v dávce 0,9mg/kg/den po dobu průměrně 5,5 roku. 34 neléčených chlapců přestalo chodit ve věku 9,8 roku. 81% z léčených chlapců chodilo ještě ve dvanácti letech, 76% v patnácti letech a 30% v osmnácti letech. Funkce srdce a plic byla u léčených chlapců výrazně lepší, skolioza (deformace páteře) se vyvinula méně často než u kontrolní skupiny.

King z USA revidoval v roce 2007 klinickou historii 143 chlapců, 75 z nich bylo denně léčeno steroidy - převážně deflazacortem po dobu průměrně 8 let, zbývajících 68 chlapců steroidy nedostávalo. Léčení chlapci byli schopni chodit v průměru o 3,3 roku déle a byla u nich výrazně nižší pravděpodobnost skoliozy. Naopak u nich byla větší pravděpodobnost vzniku zlomenin dolních končetin nebo obratlů kvůli osteoporóze než u neléčených chlapců.

Dr Manzur shrnul svou přednášku takto: Dlouhodobé užívání steroidu prednisone (prednisolone dal velmi podobné výsledky) a deflazacortu zlepšuje svalovou funkčnost a prodlužuje dobu schopnosti chůze o několik let, zlepšuje funkčnost srdce a plic, snižuje pravděpodobnost vzniku skoliozy a zlepšuje kvalitu života. Pozitivní efekt léčby je větší když se s léčbou začne brzy, tj. asi ve čtyřech letech a je-li lék podáván denně. Vedlejším efektem, hlavně u prednisone, je typický kulatý tvar obličeje, zvýšená chuť k jídlu a nárůst váhy pokud od začátku léčby chlapci nejsou na přísné dietě bohaté na bílkoviny a chudé na tuky a uhlohydráty. Oba léky způsobují menší vzrůst a vyšší pravděpodobnost zlomeniny a změny v chování. Deflazacort způsobuje benigní katarakt (zákal), který nemusí být léčen.

Protože další výzkum je nutný *North Star Clinical Network* (sdružení patnácti spolupracujících klinických center v UK) spolu s britskými rodičovskými organizacemi Muscular Dystrophy Campaign a ActionDuchenne plánuje optimalizovat a standartizovat léčbu steroidy vytvořením národní klinické databáze a nabídnout všem pacientům od věku čtyř let nebo i dříve steroidy v denním nebo přerušovaném režimu s lékařským a vědeckým dohledem a prohlídkami před a během léčby.

TREAT-NMD, evropská organizace publikovala 8 stránek doporučení jako předběžný standart péče o pacienty s DMD. Tento text lze stáhnout z: <http://www.treat-nmd.eu/soc/eng/dmd/>. (Česká verze je na stránkách: <http://www.parentproject.cz>)

Flenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, et al. Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1991; 12; 1874-1877

Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscular Disorders* 2006; 16; 249-255.

King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, et al. Orthopedic outcome of long-term daily corticoid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2007; 68; 1607-1613

Klinické testy prednisone s cyklosporinem. Klinické testy prednisone s cyklosporinem probíhají v Německu, provádí je profesor **Rudolf Korinthenberg** z Children's Hospital of the University of Freiburg s cílem redukovat vedlejší účinky samotného prednisone. Cyklosporin je lék, který snižuje reakce imunitního systému.

Tento pokus probíhá v 15 klinických centrech od roku 2004. Polovina pacientů dostává 3,5 - 4mg/kg/den cyklosporinu a 0,75 mg/kg/den prednisone, druhá skupina dostává stejnou dávku prednisone ale místo cyklosporinu jen placebo. Každý pacient je léčen 15 měsíců. Pro tento pokus je potřeba 150 pacientů. Už se přihlásil dostatečný počet pacientů a většina z nich už dokončila patnáctiměsíční léčebný cyklus.

Protože je to "oboustranně slepý" pokus dřív než dokončí poslední pacient a data nebudou analyzována nebude možno jej vyhodnotit. Ale již teď je možno říct, že pokus proběhl dobře a neobjevily se žádné vážné vedlejší účinky. Výsledky budou publikovány pravděpodobně koncem roku 2008.

Upregulace utrofinu jako náhrada dystrofinu. Utrofin je protein svou strukturou i funkcí velmi podobný dystrofinu. U člověka je lokalizován na chromozomu 6, má 75 exonů a délka je asi milión bází. Utrofin se nachází v řadě tkání včetně svalů, v těch je ale koncentrován jen kolem nervosvalových destiček, kde se nervy dotýkají svalové membrány. Ve věku 12 týdnů svalová membrána embrya obsahuje oba proteiny, jak utrofin tak dystrofin, později ale utrofin z membrány zmizí a v době narození tam zůstává jen dystrofin. Takže utrofin je vlastně embryonální forma dystrofinu.

Byly vytvořeny mdx myši s knokautovaným utrofinovým genem (poškozeným tak, aby se utrofin neprodukoval), které mají symptomy velmi podobné lidem - narodí od „obyčejných“ mdx myší, u nichž jsou svaly daleko méně poškozeny přestože v nich není žádný dystrofin. Podobně bylo pomocí technik, které nelze na lidech použít, 3x až 4x zvýšeno množství utrofinu v mdx myších a dosaženo mírnějších dystrofických symptomů. U DMD pacientů se dystrofin šíří od nervosvalových destiček dál podél membrány a čím víc utrofinu pacient má tím později bude potřebovat vozík. To znamená, že upregulace (zvýšení množství) utrofinu by mohlo vést k léčbě DMD.

Utrofin existuje ve dvou formách, ale jen *A-utrofin* je lokalizován v malém množství kolem nervosvalových destiček všech svalových buněk. Vědci začali hledat látku, která by mohla upregulovat gen A-utrofinu a pak poslat nově vzniklý protein do svalové membrány, kde by mohl zaujmout místo po chybějícím utrofinu. Výzkum v tomto směru zahájila profesorka **Kay Davies** z University of Oxford a pokračuje v

něm ve spolupráci s firmou [Summit plc](#), kterou vede Dr **Jon Tinsley**. Koncem roku 2007 měli otestováno víc než 30.000 chemických látek na schopnost upregulovat aktivitu genu pro utrofin na tkáňových kulturách mdx myší. Bylo identifikováno několik aktivních látek a v současnosti probíhá jejich optimalizace a testování na živých mdx myších s cílem dostatečně zvýšit koncentraci A-utrofinu ve všech svalech zvířat.

Další hledání a ověřování látek, které by mohly ovlivnit DMD probíhá na dystrofických rybách zebříčkách (Danio rerio). Zebříčky mají velmi malá průsvitná embrya (2-3mm) která jsou plně vyvinuta za 24 hodin. Strukturu jejich svalů je možno snadno pozorovat a analyzovat pod mikroskopem při polarizovaném světle. Svalová patologie (struktura nemocných svalů) embryí neschopných produkovat dystrofin je velmi podobná lidským dystrofickým svalům.

Takto nalezená látka označovaná jako SMT1100 vedla k obnovení svalové funkčnosti u mdx myší. Degenerace, infiltrace tukových a fibrotických buněk a chronický zánět se v takto léčených svalech výrazně zredukovali. Po denní injekci po dobu 28 dní se neprojeví žádné vedlejší účinky. Jestliže probíhající předklinické testy toxicity a účinnosti budou úspěšně ověřeny na zdravých lidských dobrovolnících by mohlo začít v roce 2008, klinické testy na pacientech s DMD by pak mohly začít v roce 2009.

Upregulace utrofinu pomocí biglykanu. Protein biglykan je přítomen v srdci a kosterním svalstvu během růstu a váže se svými konci na dva proteiny dystrofinového komplexu: alfa-sarkoglykan a gamma-sarkoglykan. Biglykan je důležitý pro regulaci řady signálových a strukturálních proteinů ve svalové membráně. Profesor **Justin Fallon** se svým týmem z Brown University v Providence na Rhode Island provedl experimenty na nedystrofických myších jejichž gen pro biglykan byl deaktivován. Pokusy ukázaly, že pokud chybí biglykan řada bílkovin dystrofinového komplexu ve svalové membráně chybí. Léčba myší pomocí vyrobeného lidského biglykanu vedla k obnovení výskytu beta-syntrofinu a alfa-dystrobrevinu, což jsou indikátory obnovení tvorby dystrofinového komplexu ve svalové membráně. Nejprekvapivějším objevem byla upregulace utrofinu na 2,5 násobek normální hodnoty. Po 3 měsících léčby pomocí injekcí biglykanu byly svaly dystrofických myší daleko odolnější proti poškození. Protože oba proteiny na které se biglykan váže se vyskytují jen v srdečním svalu a kosterním svalstvu dá se předvídat, že bude mít minimální vedlejší účinky na ostatní tkáň. Imunitní reakce také nejsou pravděpodobné protože biglykan se v těle vyskytuje během růstu. A protože působí vně svalových buněk nemusí projít svalovou membránou, aby byl účinný.

Experimenty na zvířatech budou pokračovat s cílem optimalizovat tuto léčebnou metodu. A jakmile bude k dispozici dostatek lidského biglykanu v potřebné kvalitě, první fáze klinických testů může začít. Předpokládá se, že klinické testy by mohly začít do dvou let.

Transfer utrofinového genu. Profesor **George Karpati** a jeho kolegové z McGill University v Montrealu přenesli injekčně celý gen utrofinu v adenovirovém vektoru do svalu *tibialis anterior* novorozencům a dospělým mdx myším. Po této jediné injekci obsahovalo 58% vláken injikovaných svalů

novorozených myší a 35% vláken u dospělých myší utrofin v místech pod membránou kde se normálně u zdravých myší nachází dystrofin. Celý dystrofinový komplex v membráně byl obnoven na řadu měsíců až rok.

Nový utrofin ve svalové membráně ochránil svaly před typickými dystrofickými změnami u novorozených myší a zastavil patologické změny u dospělých myší. Fyziologické testy ukázaly, že funkčnost celého léčeného svalu byla zlepšena. Protože utrofin se běžně vyskytuje na nervosvalových destičkách neobjevily se žádné imunitní reakce na nově produkovaný dystrofin.

Zvýšené množství utrofinu klesá u dospělých myší, ne však u nově narozených. To naznačuje, že taková genetická léčba pokud by fungovala by musela být použita co nejdříve.

Deal JR, Danielou G, Laroche N, et al., and Karpati G. Úspěšné nahrazení nedostatku dystrofinu pomocným příbuzným adenovirem vyjadřujícím utrofin plné délky.

Molecular Therapy 2007; 15; 1767-74.

Eliminace předčasného stop kodonu pomocí PTC124.

Asi u 13 až 15% všech DMD pacientů je onemocnění způsobené bodovou změnou v dystrofinovém genu. Tento typ mutace je způsoben změnou v jednom nukleotidu a vede na předčasný stop kodon v dystrofinové mRNA. Předčasný terminační kodon způsobuje, že syntéza bílkoviny zkončí předčasně, dříve než je nový dystrofin zcela vytvořen. Neúplný dystrofin je příliš krátký, aby mohl plnit své přirozené funkce, je poškozen, a propukne DMD.

PTC Therapeutics, Inc, společnost v South Plainfieldovi, New Jersey, pod vedením Dr. *Langdona Millera* vyvinula lék, *PTC124*, který umožňuje systému, který vytváří bílkoviny v buňce, přejít takový předčasný zastavovací kodon v mRNA bez zastavení a pokračovat v syntéze dystrofinu. Takto může být vytvořena bílkovina plné délky. Takové léčení je odlišné od genové terapie nebo metody exon skipping. Aby bylo možno rozhodnout jestli chlapci s DMD může tato metoda pomoci, musí být prokázána přítomnost předčasného terminačního kodonu genetickou analýzou. Detaily o tomto novém léku, včetně jeho molekulární struktury byly publikovány v Nature v květnu 2007 i s komentářem. PTC124 je bílý krystalický prášek, který může být podáván orálně po smíchání s vodou, nebo mlékem. PTC124 byl objeven při použití automatizovaného programu, v kterém bylo testováno asi 800.000 chemických látek nízké molekulární váhy jestli jsou schopny předčasný stop kodon nějakým způsobem eliminovat.

Nejefektivnější mezi aktivními sloučeninami nazvaný PTC124 byl chemicky optimalizován a následně rozsáhle otestován v laboratoři. V předklinických experimentech byl ve svalových kulturách svalu vyprodukovan dystrofin. U myší s mdx, které mají předčasný stop kodon v dystrofinovém genu v exonu 23, bylo vidět, že PTC124 navodí produkci dystrofinu plné délky a má za následek menší poškození svalu během stažení a snížení koncentrace kreatin kinázy (CK) v krvi. Tím PTC124 může pomoci svalovým buňkám, aby překonaly jeden typ genetické příčiny DMD.

PTC124 neovlivňuje normální stop kodon, který se vyskytuje v genu v "jiném prostředí" než předčasný stop kodon. Toxikologické studie na myších, kryších a psech s vysokými dávkami léku prokázaly dostatečnou účinnost, proto

se pokračovalo ve vývoji léku.

Klinický pokus fáze I s PTC124 byl proveden u 61 zdravých dospělých dobrovolníků ve věku 18 - 30 let, kteří dostali lék 3 krát denně po dobu 2 týdnů. Takovouto léčbou byla udržována u pokusných osob koncentrace léku 2 až 10 µg/ml, což byla účinná dávka u myší s mdx. Dávky až do 100 mg/kg za den byly zdravými dospělými jedinci dobře tolerovány a byly bez vážných vedlejších účinků. Tato dávka byla větší než kterou plánují dát chlapcům s DMD.

Tyto výsledky dovolily začít II fází klinických testů na chlapcích s DMD. Pokusy byly provedeny v prosinci 2005 až květnu 2007. Zúčastnilo se 38 chlapců ve věku 5 až 17 let. Byla to reprezentativní skupina, 33 mohlo ještě chodit, 29 dostávalo steroidy, 26 mělo stop kodon UGA, 6 UAG, a 6 UAA, a to mezi exony 6 až 70. Pokus byl navržen tak, aby minimalizoval riziko pro pacienty, ti z něj naopak neměli žádný zdravotní přínos. Šest chlapců dostalo 16 mg/kg/den léku, 20 chlapců 40 mg/kg/den, a 12 chlapců 80 mg/kg/den, denní dávky byly rozděleny do 3 dávek denně. Pacienti byli klinicky vyhodnocováni 21 dnů před léčením, pak dostávali lék po dobu 28 dní, a nakonec byli kontrolně vyšetřováni znovu po dobu 28 dnů.

U 12 chlapců byla provedena biopsie svalu před a po léčení svalu nohy *extensor digitorum brevis* (EDB), aby se dala zkontrolovat produkce dystrofinu celé délky. Očekávaný dystrofin plné délky se objevil v tkáních všech chlapců a byl závislý na dávce.

Ještě před pokusem bylo na svalovou tkáň z prvních biopsií aplikováno PTC124. Očekávaná tvorba dystrofinu plné délky závislá na dávce byla objevena v tkáních všech chlapců. Analýza svalové tkáně z biopsií po léčbě ukázala, že u 19 z 38 chlapců dochází jen k velmi malému zvýšení tvorby úplného dystrofinu. Hlavní důvody proč nový dystrofin nebyl nalezen u všech chlapců ve větším množství by mohl být ten, že doba léčení byla příliš krátká a že EDB sval pravděpodobně nebyl nejlepší pro analýzu, protože má nízký poměr degenerace a regenerace. Avšak u všech chlapců došlo ke snížení CK během léčby. Hladina CK v krvi se znovu zvýšila po ukončení léčení tak jak se předpokládá u léku, který musí být brán neustále.

Někteří rodiče a učitelé pozorovali, že 2 až 4 týdny po docela krátkém léčení, chlapci vykazovali větší aktivitu, zvětšenou výdrž, a menší únavu než před léčením. Zatímco tyto neoficiální výsledky musí být brány s rezervou, časový průběh pozorovaných změn naznačuje, že souvisí s léčbou. Byly pozorovány mírné nepříznivé vedlejší účinky, které ale nebyly prokazatelně způsobené PTC124 a nebyly klinicky významné.

Pro porozumění dlouhodobého rizika a výhod PTC124 byl nyní započat dlouhodobý klinický pokus fáze II b. Pro tento pokus se zaregistruje 165 pacientů, kterým je alespoň 5 let a ještě chodí (jsou schopni ujit 75 metrů). Chlapcům, kteří jsou na kortikosteroidech bude povoleno pokračovat v této terapii. Účastníci budou rozděleni do 3 skupin: vyšší dávka PTC124, nižší dávka PTC124, nebo placebo. Léčení bude pokračovat po dobu 48 týdnů. Primárním kritériem bude měření vzdálenosti, kterou chlapci zvládnou ujit za dobu 6 minut, v porovnání s výsledky před léčením a během léčení. Dále se bude měřit 10 dalších sekundárních parametrů. Po dokončení pokusu se všichni pacienti, včetně těch, kteří byli

na placebo, zúčastní dlouhodobé terapie s vyšší dávkou PTC124.

Pro tento pokus byl ustanoven mezinárodní organizační výbor, který bude vše organizovat a dohlížet na spolupráci četných klinických center v Evropě, Austrálii, Izraeli, Kanadě a ve Spojených státech. Za Evropu se organizace účastní experti na DMD lékaři **Kate Bushby** a **Thomas Voit**. Pokus už probíhá v USA a brzo bude zahájen v dalších zemích. Pokud tento velký pokus fáze II b prokáže dobré léčebné účinky, bude snaha o schválení prodeje u regulačních agentur FDA ve Spojených Státech a EMEA v Evropě.

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

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

Projekt Catalyst je program firmy PTC Therapeutics, který slouží k hledání nových malých chemických sloučenin sloužících jako léky pro DMD.

Projekt Catalyst, řízený Dr. **Ellen Welch**, byl zahájen v květnu 2004 a má pomoci automatického screeningu několika set tisíc sloučenin identifikovat ty, které by mohly zvýšit nebo snížit produkci vybraných proteinů ve svalových buňkách a tak udržet případně zlepšit strukturu a funkci svalů u pacientů s DMD. Snížení (downregulace) produkce myostatinu a zvýšení (upregulace) svalového specifického růstového faktoru IGF_1 podobného insulinu by podporovalo růst svalů a regeneraci. Upregulace *utrofinu* a *alpha7 integrinu* by stabilizovala svalovou membránu a tím by zlepšila funkci svalů.

Automatické vyhledávací metody pro nalezení tohoto potenciálního léku na DMD používají nově vyvinutý zkušební postup, kdy se měří světelná intenzita enzymu luciferáza pocházejícího ze světlušek. Malý počet sloučenin s alespoň některou z požadovaných vlastností je pak optimalizován v laboratoři. Kromě toho byly zahájeny práce na nalezení další látky, která by měla regulovat produkci SERCA2a, ta má sloužit k udržení správné funkčnosti srdce. Tyto velmi slibné potenciální léky budou dále optimalizovány tak, aby mohla začít fáze I klinické studie na DMD chlapcích v blízké budoucnosti.

Inhibitor myostatinu: *Myostatin* je neaktivní bílkovina sestávající z 375 aminokyselin, které se tvoří ve svalových buňkách a potom cirkulují v krevním řečišti. Když se odštěpí část této struktury tzv. *propeptid*, myostatin se aktivuje a naváže na receptor *activin II* v buněčné membráně svalů. Na receptor navázaný myostatin uvádí do pohybu kaskádu chemických reakcí, která zasahuje až do jádra svalové buňky a blokuje geny nutné pro růst svalových vláken. Tím myostatin zamezuje růstu svalstva.

Existuje druh dobytka, belgický chov Blue Breed, a psi, rasa bully whippets, kteří jsou velmi svalnatí protože jejich myostatinový gen se stal mutací neaktivní. A v Berlíně v roce 1999 byl nalezen jeden fyzicky velmi silný chlapec bez myostatinu, jehož kosterní svaly jsou asi dvakrát tak větší než svaly normálního dítěte.

Blokování myostatinu protilátkami. Dospělé mdx myši s vyřazeným myostatinovým genem, které kromě dystrofinu ve svalech nevytváří ani myostatin, měly více normálních svalových vláken, méně fibróz (zánět vazivových tkání), a jejich svalstva regenerovala rychleji než u "normálních" mdx myši, což prokázala profesorka **Kathryn Wagner** z Wellstone Muscular Dystrophy Center na Univerzitě Johnse Hopkinse v Baltimore a její výzkumný tým. Tyto a výše uvedené případy signalizují, že downregulace nebo úplné zastavení tvorby myostatinu by mohlo stimulovat regeneraci svalových vláken chlapců s DMD tak, aby nedegenerovaly tak rychle nebo dokonce aby se mohly zvětšovat.

Společnost **Wyeth Pharmaceuticals** v Collegeville blízko Filadelfie ve spolupráci s Dr. Wagnerem nedávno publikovala výsledky klinického pokusu s *Myo 029*, specifickou *lidskou protilátkou* proti myostatinu, která se aplikuje injekčně. Pokus byl proveden na 116 dospělých jedincích svalovou dystrofií, včetně pacientů s BMD, kterým byl aplikován MYO-029 nitrožilně ve čtyřech dávkách mezi 1 až 30 mg/kg každé dva týdny po dobu 24 týdnů, poté následovalo 12 týdnů klinického sledování. Cílem tohoto klinického pokusu bylo zhodnotit bezpečnost a prokázat účinnost. Výsledky ukázaly, že MYO-029 je bezpečný ve studovaných dávkách a pravděpodobně dosáhl svého zamýšleného cíle, zvýšení hmotnosti svalů u lidí s BMD. Avšak zlepšení funkčnosti svalů se v tomto šestiměsíčním testu neukázalo. Další klinické pokusy s jinými inhibitory myostatinu jsou plánované několika farmaceutickými společnostmi v U.S.

Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, et al. A Mendell JR. A phase I/II MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurologie* 2008; March 11

Blokování myostatinu jeho propeptidem. Profesor **Keith Foster** z School of Biological Sciences z University of London a jeho kolegové použili stabilizovaný propeptid k navázání na myostatin čímž jej vyřadili. Přenesli gen propeptidu pomocí plazmidů (čistá DNA) do svalů nedystrofických myši, a poté i systematicky pomocí AAV8 vektoru do krevního oběhu. V obou případech se po deseti týdnech zvětšila vlákna svalů a svalová funkce převážně v pomalých svalstvech se zlepšila asi o 20 – 30%.

Avšak stejná léčba mdx myši nevedla ke zvětšení svalstva a k jeho lepší funkci. Dokonce ani souběžný virový přenos propeptidu a mikrodystrofinu neukázal u mdx myši nějaké zlepšení. Přesto by tato kombinace mohla být v budoucnu použitelnou léčebnou strategií pro tvorbu nových vláken a zároveň jejich zvětšení. Mdx myši pravděpodobně potřebují vyšší dávky, protože produkují více myostatinu než myši bez dystrofie. Toto se nyní stále zjišťuje.

Zvětšování objemu a síly svalů blokováním myostatinu folistatinem. *Follistatin-344* je bílkovina podobná hormonu sestávající z řetězce 344 aminokyselin, který je aktivován převedením na folistatin-315 odštěpením 29 aminokyselin z jeho karboxylového konce. Follistatin-315 společně se dvěma dalšími podobnými bílkovinami, FLRG a GASP-1, jsou zapojeny do regulace aktivity myostatinu přímo blokováním jeho receptoru aktivinu a nepřímo jinými, ještě neznámými signálovými cestami.

Profesor **Brian Kaspar** z Nationwide Children's Hospital a z Ohio State University v Columbu a jeho kolegové přenesli tři geny pro člověka follistatin-344, FLRG a GASP-1 pomocí vektorů AAV-type-1 lokálně do svalů normálních myší a mdx myší. Pro srovnání, zelená fluorescenční bílkovina byla přenesena za stejných podmínek.

Injekce, která obsahovala 100 miliard AAV1 vektorů, byla aplikována 4 týdny starým normálním myším. Po 725 dnech (téměř 2 roky) bylo stále patrné zvětšení těla díky viditelně zvětšenému svalstvu nejen v částech, kde byla injekce aplikována, ale také v dalších svalech, což znamená, že toto lokální léčení bylo schopno ovlivnit také další svaly. Celková síla svalstva zvířat byla zvětšená, což se dalo změřit funkční zkouškou pevnosti uchopení.

Aby se tento přístup dal smysluplně využít k testování a pozdějšímu léčení chlapců s DMD, byly provedeny podobné experimenty s mdx myšmi, při kterých se použily dávky buď s 10 nebo 100 miliardami částicemi viru. Tyto mdx myši byly buď tři týdny staré, když jim byla aplikována injekce a potom ohodnoceny po pěti měsících, nebo, a toto je velmi důležité pro pozdější aplikaci této techniky starším pacientům s DMD, jim byla aplikována injekce jednorázově když byli 210 dnů staré (sedm měsíců), kdy již měli významné symptomy onemocnění, a potom následně dokud ještě nebyly 560 dnů staré (asi 1 a půl roku). 60 dnů po injekci měly zvětšenou sílu svalů, která přetrvávala do konce průzkumu.

Ve všech těchto experimentech, se neobjevily žádné viditelné problémy s virovými materiály nebo s léčebnými bílkovinami, follistatinem a dalšími dvěma. Výsledkem bylo robustní svalstvo se zvětšenou masou svalových vláken, zredukovaný zánět svalů a menší fibróza ve srovnání s kontrolní skupinou mdx myší.

Tým Profesora Kaspara skončil svou publikaci se slovy: "pozoruhodná schopnost follistatinu dosáhnout velkého a dlouhodobého funkčního zlepšení dystrofického svalstva u starších zvířat zaručuje, že se bude nadále uvažovat o klinickém rozvoji této metody s cílem léčit muskuloskeletární nemoci, včetně starších pacientů s Duchennem".

Haidet AM, Rizo L, Handy C, et al. a Mendell JR, Kaspar BK. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibition. Proc. Natl. Acad. Sciences 2008; 105; 4318- 4322.

Inhibice TGF-β. Transformační růstový faktor beta (TGF-β) je bílkovina, která zabírá satelitním buňkám (kmenové buňky svalů) v regeneraci svalové tkáně. Mdx myši a také chlapci s DMD mají zvětšené množství TGF-β a to vede k fibróze (zjizvení tkáně), která je způsobena nadměrnou produkcí pojivové tkáně, a k jejímu usazování mezi vlákna svalů kde nahrazuje odumřelá vlákna.

Za normálních okolností, pojivová tkáň drží vlákna svalů pohromadě, ale zvětšené množství vede k tuhosti svalů a jejich zkracování. Pojivová tkáň se sestává hlavně z bílkoviny kolagenu, což je dost nepružná molekula, kterou produkují fibroblasty. Takže inhibice aktivity TGF-β pomocí léků může redukovat fibrózu.

Profesor **Andrew Hoey** z University of Southern Queensland v Toowoomba v Austrálii a jeho spolupracovníci testovali *pirfenidone*, což jsou schválené léky k léčení fibrózy v plicích. Osm měsíců staré mdx myši byly léčeny těmito léky

a po sedmi měsících léčení se ukázalo, že se snížila úroveň TGF-β a obnovila se téměř normální srdeční funkce, ale fibróza u takto staré mdx myši nebyla snížena. Eventuální větší účinnost léku u mladších myší bude prozkoumána v budoucích experimentech.

Van Erp C, Irwin NG, Hoey AJ. Long-term administration of pirfenidone improves cardiac function in mdx mice. Muscle Nerve 2006, 34; 727-734.

Losartan a TGF β. Dr. **Ronald Cohn** a jeho spolupracovníci z Johns Hopkins University School of Medicine v Baltimore zkouší modifikovat onemocnění blokováním TGF-β a signálních cest, které vedou k fibrózám. Začali svou práci se staršími mdx myšmi s pokročilejší svalovou dystrofií. Injekce hadího kardiotoxického jedu do svalů svaly poškozuje; regenerují pak během dvou až třech týdnů. Ve svalstvech mdx myší je tato regenerace významně snížena. Léčení mdx myší protilátkou proti TGF-β zlepšuje čas regenerace.

Jelikož tato protilátka není komerčně dostupná, vědci začali testovat zda *Losartan*, jako lék schválený proti vysokému krevnímu tlaku, by mohl mít stejný účinek, protože blokuje angiotensin-II receptor, který hraje roli v signální cestě odstartované TGF-β. Bylo vidět, že léčba tří měsíců starých myší *Losartanem* po dobu delší než jeden rok zmírnila mnoho dystrofických symptomů jako fibrózu svalů a rozvoj únavy v testech svalových funkcí. Myši nebyly vyléčeny tímto lékem, jen byly méně nemocné.

Léčba *Losartanem*, pokud výsledky na chlapcích s DMD budou podobné těm na myších, by mohla být vhodná farmakologická léčebná strategie, která redukuje symptomy bez ovlivňování genetické příčiny onemocnění.

Dr. **Cohn** a jeho tým nyní připravují klinický pokus s *Losartanem*. Pokusu se bude účastnit asi 100 chlapců s DMD, kteří jsou staří 5 až 15 let a mohou ještě chodit. Jedna polovina chlapců bude léčena po dobu 1 roku *Losartanem*. Další polovina bude dostávat placebo po dobu šesti měsíců a potom po dobu dalších šesti měsíců bude také léčena *Losartanem*. Všichni chlapci v obou skupinách musí nadále brát steroidy pokud je pravidelně brali i před pokusem. Primární kritéria testu, což je hlavní test efektu léčení, je čas, který potřebují k ujití 30 stop (asi 10 metrů). Změny jejich kvality života a jejich dýchací funkce budou mezi mnoha dalšími sekundárními kritérii.

Výzkumníci doufají, že pokus začne někdy v roce 2008. Výsledky pak budou k dispozici o dva roky později. Pokud výsledky ukážou významný léčebný účinek, doporučení pro podávání léku bude vydáno bez prodlení. Avšak je důležité zdůraznit, že *do té doby by rodiče neměli dávat Losartan jejich nemocným chlapcům*, ale měli by pokračovat v současné péči včetně léčby steroidy a ve veškerých dalších aspektech tak, aby udrželi chlapce v co nejlepším fyzickém stavu.

Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. Nature Medicine 2007; 13; 204-210.

Látky blokující zánět. Degradace a smrt svalových buněk u svalové dystrofie způsobuje, že buňky imunitního systému vstoupí do svalové tkáně, aby vyčistily buněčné pozůstatky. Steroidy jsou schopny potlačit zánět, to je

pravděpodobně jedním z důvodů proč *prednisone*, jeho aktivní forma *prednisolone* a podobný *deflazacort* můžou zvýšit velikost a sílu svalů tím, že redukují odpověď organismu na antigen, avšak často s nepříjemnými vedlejšími účinky.

Profesorka **Melissa Spencer** z University of California, v Los Angeles a její tým provádí experimenty, aby našli způsoby, jak nahradit steroidy jinými léky, které by působily proti zánětu bez nepříznivých vedlejších účinků steroidů.

Studie ukázaly, že některé buňky imunitního systému urychlují průběh onemocnění. Produkuje *cytokiny*, molekuly, které podporují zánět a vývoj fibrózy ve svalích jak u mdx myši tak u pacientů s DMD. U zdravých jedinců to je normální proces hojení zranění, které stabilizuje slabé tkáně a podporuje hojení. U chlapců s DMD se tento hojivý proces nikdy nezastaví, sval je ve stavu nepřetržitého hojení zranění. Proto se předpokládá, že inhibice imunitních buněk a aktivních cytokinů by mohla zpomalit degradaci a fibrózu dystrofického svalstva. Některé protizánětlivé léky schválené FDA již existují a mohly by možná také být účinné proti těmto imunním buňkám u DMD. Testováním léků již schválených FDA bude zkrácen čas nutný k započítání testů na klinikách v porovnání s nově vyvíjenými léky.

Čtyři z těchto léků užívaných proti dalším nemocem jsou testovány v laboratoři Dr. Spencera na mdx myších: *Galectin-1*, *Remicade®*, a *Enbrel®* - všechny proti revmatickému zánětu a *Anti asialo GMI*, protilátka používaná při Parkinsonově chorobě.

Osteopontin je bílkovina, která má mnoho funkcí v biologii kosti, imunitní regulaci, buňčném přežití, zánětu a rakovinových metastáz. Její koncentrace je zvýšená v krvi a svalstvech mdx myši. Dr. Spencer zkoušel osteopontin jako potenciální léčebný cíl pro Duchennovu dystrofii. Mdx myši bez osteopontinu mají lepší sílu svalů, sníženou CK hodnotu, a sníženou fibrózu. Dále se pracuje na tom, aby se našel lék, který by potlačoval osteopontin u chlapců s DMD a tak se stal se kandidátem na léčbu DMD.

Idebenone. Nepřítomnost dystrofinu oslabuje nejen buněčnou membránu, ale také negativně ovlivňuje mitochondrie ve svalových buňkách. V těchto buněčných "elektrárnách" se generuje oxidační fosforylací univerzální biologický energetický přepřevce adenosintrifosfát (ATP). Uměle vyrobená molekula *Idebenone*, vyvinutá společností *Santhera Pharmaceuticals* z Liestal blízko Basileje pod vedením Dr. **Thomase Meiera**, hlavního vědeckého vedoucího, je odvozená z přírodního koenzymu Q10. *Idebenone* je nejen silný antioxidant, ale co je ještě důležitější, usnadňuje výrobu buněčné energie. *Idebenone* byl chemicky optimalizován, aby snadno pronikal do buněk, včetně buněk svalových.

Účinnost *Idebenone* byla předtím demonstrována u pacientů s Friedreichovou ataxií. U této nervosvalové nemoci *Idebenone* vykazoval zlepšení neurologické funkce. Navíc *Idebenone* také zlepšoval hypertrofickou kardiomyopatii (zvětšení srdce), což je v tomto neuromuskulárním onemocnění komplikace ohrožující život.

V nedávné době vědci z University of Leuven v Belgii pod vedením profesora **Gunnar Buyse** ve spolupráci se *Santherou* začali zjišťovat, jestli by *Idebenone* byl prospěšný i

u pacientů s DMD. Nejprve po dobu 10 měsíců léčili mdx myši pomocí *Idebenone* a to od čerstvě narozených až po dospělé jedince. V tomto pokusu se srdeční dysfunkce dystrofických myši významně zlepšila, hlavně poklesla úmrtnost v experimentálně indukovaném srdečním stresu z 58% na 19%. Dále, u 15 mdx myši po léčbě pomocí *Idebenone* se významně a dlouhodobě zlepšil výkon spontánního běhu v kole (celkový funkční test svalů). Detailní vědecká zpráva o tomto novátorském pokusu bude brzy zveřejněna.

Tyto výsledky povzbudily vědce k tomu, aby provedli klinický pokus fáze-II kontrolovaný placebem na 21 chlapcích s DMD ve věku 8 až 16 let. Pokus byl proveden opět na univerzitě v Leuvenu na pokyn profesora Gunnara Buyseho. Třináct chlapců bylo léčeno po dobu 12 měsíců s denní dávkou 450mg *Idebenone*, podáváno ve 150mg tabletách, zatímco osm pacientů dostalo placebo. Primární cíl této studie bylo určit efekt *Idebenone* na srdeční svalovou funkci.

Pacienti na *Idebenone* se značně zlepšili v testu srdeční funkce ve srovnání s pacienty na placebo. Sekundární kritéria výsledku této studie zahrnovali testy dýchací funkce. Během 52 týdnů trvání testu se pacientům léčeným *Idebenone* zlepšily dýchací funkce, zatímco u pacientů na placebo se se nadále zhoršovaly.

Tyto údaje jasně dokazují zlepšení srdeční a dýchací funkce za pomoci *Idebenone* jsou zvláště povzbuzující, jelikož právě tyto problémy působí velmi vážné komplikace u pacientů s Duchennovou dystropií. Výsledky této studie budou poprvé prezentovány na výročním sjezdu American Academy of Neurology.

V souhrnu, toto je první důkaz klinické účinnosti *Idebenone* na srdeční a dýchací funkce u Duchennových pacientů. Výsledky poskytují základy pro plánování dalších klinických testů s *Idebenone*. Po těchto kladných výsledcích se *Santhera* rozhodla pokračovat ve vývoji *Idebenone*.

Protandim zabraňuje oxidačnímu stresu: Přepřevce biologické energie, kterého potřebuje každá buňka včetně svalové, se jmenuje adenosintrifosfát (ATP). ATP je produkován ve velkém množství v mito-chondriích uvnitř buňky. Mitochondrie jsou asi tak malé jako bakterie a k výrobě energeticky bohatého ATP používají kyslík. Asi 1-2% spotřebovaného kyslíku je převedeno na velmi reaktivní *volný radikál peroxidu*. Normální buňka se sama brání proti tomuto toxickému produktu dvěma enzymy: *superoxid dismutázou*, (SOD), která jej přeměňuje na peroxidu vodíku, a *katalázou* (CAT), která přeměňuje peroxid vodíku na vodu a kyslík.

Svalové buňky bez dystrofinu produkují větší množství peroxidových radikálů než normální buňky, proto jsou vystaveny většímu *oxidačnímu stresu*, který přispívá k degeneraci vláken svalů. Je to proto, že enzymy SOD a CAT nejsou schopny zničit nadbytek radikálů dřív než způsobí chronický zánět, fibrózu, peroxidaci lipidů, zpomalení svalové regenerace, což jsou typické symptomy chlapců s DMD po třetím roku.

Pro terapii DMD by bylo důležité přerušit tyto procesy v tomto věku nebo již dříve. Ošetření antioxidantními vitamíny E a C nemá bohužel žádný efekt. Další možnost je zvýšit množství dvou enzymů superoxidodismutázy a katalázy.

Laboratorní experimenty ukázaly, že přidáním těchto enzymů do izolovaných srdcí mdx myši blokuje oxidační stres ničením nadbytku volných radikálů.

Profesor **Joe McCord** z University of Colorado společně se společností *Life Vantage Corp.* v Denveru vyvinul potravinový doplněk *Protandim*®, který redukuje oxidační stres upregulací dvou antioxidačních enzymů. Protandim obsahuje výtažky z pěti rostlinných druhů: *Bacopa monnieri* (Bakopa drobnolistá), *Silibum marianum* (Ostropestřec mariánský), *Withania somnifera* (ashwagandha), *Kurkuma longa* (Kurkuma dlouhá) a *Camelia sinensis* (čajovník čínský). Při klinickém pokusu v roce 2006 bylo léčeno 29 zdravých 20-78 let starých lidí denně po dobu 120 dnů. Dva nejdůležitější výsledky testu po skončení pokusu byly, že se průměrně zvětšila aktivita superoxid dismutázy o 30% a katalázy o 54%, a peroxidace lipidů byla významně potlačena. Nedávno bylo zjištěno, že Protandim vyvolává produkci ARE (antioxidant response element), což je genetický mechanismus, který ovládá nejen produkci superoxid dismutázy a katalázy, ale také asi dva tucty dalších důležitých antioxidačních enzymů. Mimoto extrakty z pěti rostlin obsažených Protandimu působí tak, že jejich kombinovaný efekt je mnohokrát větší než součet jejich jednotlivých efektů.

Nelson SK, Bose SK, et al. a McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase: A fundamental new approach to antioxidant therapy. *Free Radical Biol. & Med.* 2006; 40; 341-347.

Velmurugan K, Alam J, McCord JM, a Pugazhenth S. Synergistic induction of heme oxygenase-1 by the components of the dietary supplement Protandim. *Free radical Biol. & Med.* 2007; 43, Suppl. 1; S97.

Potlačení NFκB. Na University in Kirksville, Missouri, profesor **George Carlson** a jeho kolegové vyvinuli metodu, která testuje přísun vápníku do izolovaných dystrofických vláken z dýchacího svalu *triangularis sterni* (TS) mdx myši, aby tak mohli určit, zda předpokládané zvětšení množství vápníku je odpovědné za dystrofické symptomy. Avšak jejich výsledky ukázaly, že přísun vápníku se v těchto stresovaných vláknech nezvětšil v porovnání s přísunem do normálních svalových vláken za stejných podmínek. Protože další vědci prokázali, že pasivní napětí svalů aktivuje NFκB (vyslovuje se NFκB), signální cesta, tým Dr. Carlsona se pokusil zjistit, zda je tato aktivace odpovědná za poškození dystrofického TS svalu.

Bílkovina NFκB je přítomna v cytoplazmě všech buněk, ale je tam většinou vyražena další bílkovinou, inhibitorem κB (IκB). Zánětlivé procesy, které bojují proti infekcím a také degeneraci buňky aktivují signální cestu NFκB a to vede prostřednictvím signálové kaskády (řetěz reakcí) k upregulaci mnoha genů, jejichž proteiny obsahují protizánětlivý faktor. Tyto faktory zastaví zánět, když to už není potřeba.

Avšak pokud je upregulace těchto faktorů zablokována genetickou změnou nebo stresovou situací, zánět pokračuje a mohou se rozvinout chronická onemocnění jako kornatění cév, plicní fibróza, astma, kloubní revmatismus, a pravděpodobně také Duchennova svalová dystrofie.

Je dostupná řada léků, které mohou předejít aktivaci NFκB na začátku této signálové kaskády. Jeden z těchto léků je *pyrrolidone dithiocarbamate*. Dr. Carlson a jeho

spolupracovníci testovali tento lék v izolovaných vláknech TS svalu u mdx myši a zjistili, že jejich průměr se zvětšil a významně se zlepšila jejich funkce. Existují další léky, které potlačují NFκB signálovou cestu, které již byly schváleny k léčbě jiných nemocí než je DMD. Jeden z nich je *sulfasalazine*. Tento lék a další jsou ověřovány v předklinických testech, které mají dát výsledky nutné pro provádění dalších klinických pokusů.

Blokování TNFα. Buněčné membrány svalů chlapců s DMD, které nejsou stabilizovány dystrofinovým bílkovinným komplexem se dají snadno poškodit mechanickým napětím svalové kontrakce. Tumor necrosis factor-alpha (TNFα) je bílkovina, která zvyšuje poškození dystrofického svalu podporou zánětu, který vede k odumření svalových vláken dokonce ještě v nepoškozené svalové tkáni. Takže blokáda TNF-α by snižovala proces degenerace způsobený absencí dystrofinu.

Profesorka **Miranda Grounds** a její spolupracovníci z University of Western Australia v Perthu užívali protilátku cV1q k blokování TNFα při dlouhodobých pokusech s mdx myšmi. Starší mdx myši mají jen asi 5% nekrotických svalových vláken a toto procento nešlo snížit léčením protilátkou proti TNFα. Vědci proto nechali myši běhat v cvičebních kolech, tím se zdvojnásobilo množství odumřelých svalových vláken. Dlouhodobým léčením pomocí cV1q, které trvalo až tři měsíce, přičemž myši mohly běžet tolik kolik chtěly, se předešlo dodatečnému poškození, které způsobovalo toto cvičení. Z toho plyne, že blokáda TNFα redukuje poškození svalu a zvýšení hladiny CK, které se normálně vyskytují u cvičících mdx myši. Také myši léčené cV1q, které dobrovolně cvičily, běžaly podstatně více než neléčené mdx myši, a bylo zřejmé, že se cítí dobře a že jejich svalstvo zlepšilo funkci. Měly by být zvažovány klinické pokusy s touto protilátkou nebo s ostatními známými léky, které blokují TNFα.

Upregulace IGF-1. Růstový faktor podobný inzulínu (IGF-1) je bílkovina s asi 70 aminokyselinami v jednom řetězci s třemi stabilizujícími mosty a s podobným tvarem jako inzulín. Existuje ve vícenásobných formách s mírně rozdílnými strukturami. Jeden z nich, izoforma IGF-1A, je svalu velmi prospěšný jelikož podporuje růst a sílení svalstva, proto je zajímavý pro potenciální léčebné využití u dětí s DMD.

Výzkumný tým profesorky **Elisabeth Barton** z University of Pennsylvania ve Filadelfii pracuje s mdx myšmi, které byly geneticky zkonstruované tak, aby produkovaly velké množství IGF-1 ve svých svalstvech po celý svůj život.

Tyto *mdx-IGF-plus* myši vykazovaly zvětšený svalový růst s docela zdravě vypadajícími svaly a mnohem méně fibrotické než "normální" myši s mdx.

Ale protože se tento růstový faktor střetává s mnoha jinými procesy v jiných než svalových buňkách, nemohou být vyloučeny potenciálně vážné vedlejší účinky pokud bude užíváno vyšší dávkování pro optimální účinek na svalstvo. Proto byl IGF-1 spojen s jednou z jeho vazebních bílkovin (IGFBP3) čímž vznikl IPLEX™, již schválený lék, který stabilizuje IGF-1 v krvi, a uvolňuje ho jen když je to někde potřeba. První klinický pokus s lékem IPLEX byl proveden na

Rochesterově Univerzitě na patnácti dospělých pacientech s myotonickou dystrofií. Tato strategie by mohla být velmi účinná pro dopravu IGF-1 do svalů bez vedlejších účinků v dalších tkáních.

Další způsob jak dosáhnout vyšších hodnot IGF-1 ve svalové tkáni by bylo přenést jeho gen do svalstva pomocí AAV vektorů, kde by podnítily buňky k větší tvorbě IGF-1. Práce s touto technikou v laboratoři Dr. *Bartona* měla úspěch, vedla ke zvýšení úrovně neaktivnější isoformy IGF-1A 30x až 40x po jediné injekci do svalů. Nově syntetizovaný IGF-1 zůstával ve svalové tkáni, podporoval hypertrofii (zvětšení vláken svalů) a zabránilo se vedlejším účinkům způsobeným aktivací nesvalových tkání. Bohužel, bude trvat několik let než takováto virová genová terapie bude moci být zkoušena u chlapců s DMD.

Beta-agonisté. Beta agonisté jsou látky podobné hormonům, které se vážou k receptorovým bílkovinám na vnější straně buněčných membrán a tím odstartují řetězec chemických reakcí, *beta-adrenergní signální cestu* nebo *kaskádu*, aby doručili signál k biologickým cílům uvnitř buňky, které jsou důležité pro kontrolu syntézy a degradace bílkovin.

Někteří beta-agonisté jsou schválené léky, jako například *bronchodilators*, které uvolňují dýchací svalstva pacientů s astmatem, taky jsou užívány jako *anabolika* ke zlepšení velikosti a síly kosterních svalů, někdy jsou používány nezákonně atlety ("doping").

V laboratoři profesora *Gordona Lynche* z University of Melbourne byl testován beta-agonista *formoterol* a to s vynikajícími výsledky pro jeho schopnost odvrátit odumírání svalů u starších krys, což je poznaček s klinickým potenciálem k léčení starších lidí. Tyto kladné výsledky naznačovaly, že by takové "anti stárnoucí léky" mohly být užívány pro potenciální terapii DMD.

Ve skutečnosti jeden malý klinický pokus s pacienty s DMD a BMD byl již proveden. Účastníci byli léčeni po dobu 28 týdnů *albuterolem* (8mg/den), což je další beta-agonista, který je schválen pro astma. Tato nízká dávka byla vybrána poté co jiný 1 rok trvající pokus s dospělými pacienty s FSH dystrofií ukázal, že albuterol v dávkách 16mg a 32mg na den vedl k několika nepříjemným srdečním problémům jako palpitace (bušení srdce). Snížená dávka u pokusu u pacientů s DMD a BMD nezpůsobila žádné vedlejší účinky, ale vyprodukovala jen mírné zvýšení síly svalů, které bylo nedostatečné pro účinnou terapii proti poškozování svalů a slabosti.

Pro přípravu dalšího klinického pokusu se silnějším beta-agonistou, profesor Lynch a jeho kolegové zkoušeli léčit mdx myši velmi nízkými (klinicky významnými) dávkami *formoterolu* (25µg/kg). Tato nízká dávka zvýšila velikost a sílu rychlého a pomalého svalstva mdx myši a, co je důležité, nezpůsobovala snadnější unavení svalstva. Účinky na velikost srdce byly také sníženy podáváním nízké dávky.

Jelikož pacienti s DMD nepotřebují zvětšit srdce, musí být vyloučen efekt těchto léků na srdeční svaly, ale zároveň zachovat pozitivní účinky na kosterní svaly. Oddělování těchto dvou efektů je ještě důležitým vědeckým úkolem a výzkum profesora Lynche se zaměřuje právě na tyto látky.

Další vedlejší účinek downregulace receptorů pro beta agonisty v buněčných membránách svalů, který redukuje jejich účinek na kosterní svalstvo, musí být také vyloučen než se začne s klinickými pokusy pro dlouhodobé léčení chlapců s DMD.

Lynch GS, Ryall JG. Role of β -adrenergic signaling in skeletal muscle structure and function: implications for muscle wasting and disease. *Physiological Reviews* 2008; 88: 729 767.

Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscular Disorders* 2007; 17; 47 55.

BBIC potlačuje proteázy. Degradace svalových bílkovin u DMD je způsobena několika různými proteázami (bílkoviny ničící enzymy), patří k nim enzym *calpain* a velký bílkovinný komplex, nazývaný *proteazomy*. U DMD se buněčné membrány svalů stanou propustné tak, že ionty vápníku (nabité atomy) mohou vstoupit do buněk a aktivovat calpain a také proteazomy. Vědci zkoušejí potlačit aktivaci calpainu a dalších proteáz a tak pozdržet degradaci svalové buňky.

Profesor *Lee Sweeney* a jeho spolupracovníci z University of Pennsylvania ve Filadelfii experimentují s jedním z proteázových inhibitorů, BBIC (*Bowman-Birk inhibitor concentrate*), přírodní bílkovina složená ze 71 aminokyselin, které se dají extrahovat ze sójových bobů. To je substance rozpustná ve vodě, kterou lze podávat orálně. Jelikož je tato molekula příliš velká, aby prostoupila do svalových buněk, blokuje několik proteáz jako například trávící enzymy tripsin a chymotrypsin vně buněk a přerušuje signální cesty, které mohou podporovat zánětlivé procesy u DMD. Dlouhodobé léčení pomocí BBIC zvyšuje svalovou hmotu a sílu u mdx myši. Hladina CK a fibróza jsou značně sníženy. Z léčby pacientů s nádory je známo, že BBIC je velmi bezpečný lék. Nyní se připravuje klinický pokus fáze-I společně s Dr. *Kenneth Fishbeck* v Národním institutu zdraví (NIH) v Bethesda blízko Washingtonu. Pokud pokus prokáže podobné účinky u chlapců s DMD jakých bylo dosaženo u mdx myši, může tento lék zpomalit degradaci svalů.

Sójové boby obsahují také další proteázy, proto musí být BBIC od nich izolován a očištěn. Jediní fazolů přímo nemá žádný efekt.

GAMT a AGAT. Ačkoli mdx myš nemá žádný dystrofin ve svalech, neprojevuje se u ní DMD tak závažnými klinickými symptomy jako u lidí. Profesor *Brian Tseng*, dříve z University of Colorado v Denveru a právě teď pracující v Harvard Massachusetts General Hospital v Bostonu a jeho tým pokračují v hledání způsobů jak zpomalit svalovou dystrofii.

Vědci použili screeningové techniky, aby našli modifikované geny, které jsou upregulovány u mdx myši a downregulovány u chlapců s DMD. Identifikovali dva takové geny pro enzymy *arginine*: AGAT (*glycine amidotransferase*), a GAMT (*guanidinoacetate methyltransferase*). Oba jsou důležité pro syntézu kreatinu, který je v kosterním svalstvu zdrojem energie. Narozdíl od chlapců s DMD, mdx myš může upregulovat oba enzymy, takže může vytvářet svůj vlastní kreatin ve svalových buňkách. Je známo, že chlapci s DMD

mají jen 20% normálního množství kreatinu, který se nachází v zdravém svalu. Naproti tomu mdx myš má 80- 90% kreatinu ve svalstvech ve srovnání se zdravými kontrolními myšmi. Byla vytvořena mdx myš, jejíž GAMT gen byl geneticky vyřazen. Tato myš nemůže dobře chodit, umírá brzy, a její svalstvo se zdá být vážněji ovlivněno, podobně jako je tomu u chlapců s DMD.

Nyní vědci v laboratoři Dr. Tsenga pracují na vytvoření mdx myši bez enzymu AGAT, která může být také velmi postižená. Zkoumají jak nepřítomnost dystrofinu ovlivňuje dopravu kreatinu z krevního řečiště do svalových buněk. Tento problém s transportem kreatinu se nedá tak efektivně léčit pouze doplněním stravy o kreatin. Tým Dr. Tsenga také zkoumá dva geny GAMT a AGAT u lidí, kteří nemají dystrofin a přesto mají symptomy BMD a skoro normální svalovou výkonnost.

Výkonnými screeningovými metodami by se daly identifikovat sloučeniny, schválené léky, nebo potravinové doplňky, které by mohly být schopny upregulovat geny pro GAMT a AGAT u chlapců s DMD. To by mohlo snížit jejich velmi vážné symptomy na úroveň ne tak moc postižené mdx myši a získat tak čas než bude vyvinuta "skutečná léčba".

Některé závěrečné myšlenky o tom kde jsme a co by mělo být uděláno.

Jak jsem řekl na začátku, napsal jsem tuto výzkumnou zprávu stejně jako ty předešlé zvláště pro vás, chlapce a mladé muže s Duchennovou svalovou dystrofií a vaše rodiny, abyste lépe porozuměli tomu co se vše dělá pro zastavení tohoto onemocnění, aby se *ukončilo* jednou provždy. Vybral jsem 33 výzkumných projektů pro mou zprávu, protože jsou v nich podle mého mínění obsaženy nejdůležitější fakta o tom jak vědci v mnoha zemích zkouší najít efektivní a bezpečné způsoby, jak zastavit nebo přinejmenším zpomalit trvalé zmizení vašich svalstev.

Dobré a špatné změny. DMD není nová choroba jako AIDS protože byla pozorována u myši, krys, koček, a psů a tak pravděpodobně existuje u všech zvířat se svalstvy. Takže to začalo dávno před tím, než jsme se odlišili od našich zvířecích předků. Tudíž to není nic jiného než nehoda, vedlejší efekt evoluce. Beze změn, náhodných změn genetické informace, bychom tady nebyli a zbytek přírody také ne. Některé změny jsou "dobré", protože zlepšují život, ale některé jsou "špatné" a nebezpečné, protože způsobí smrt a onemocnění před narozením nebo později.

Změny, které způsobují DMD, netrestají vás nebo někoho jiného kvůli něčemu, oni se jen stávají. Toto není místo k diskusi o náboženských otázkách, což snadno může přijít na mysl. Jen mi dovoluňte přidat jednu myšlenku: Příroda se zdá, že jedná slepě bez ohledu na to koho zraňuje, na druhé straně, její dobré změny nám daly mozky k tomu, aby našly cestu pro nápravu tohoto hrozného vedlejšího efektu vývoje.

Vědecký výzkum. Pokud jste četli kompletní zprávu, uvědomíte si, že mnoho vědců a jejich týmy dělají co mohou tak rychle jak je to jen možné, aby našli účinnou léčbu. V roce 1986-87, kdy byl nalezen dystrofinový gen a bílkovina, která se podle něj vytváří, všichni jsme mysleli, že způsob léčby, která by mohla velmi brzy opravit molekulárně-genetickou příčinu onemocnění, se konečně odhaluje. Ale

McClure WC, Rabon R, Ogawa H, Tseng BS. Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice. *Neuromusc. Dis.* 2007; 17; 639-650.

L-arginin a nNOS. Další následek chybějícího dystrofinu je snížené množství jednoho specifického komponentu dystrofin-glykoprotein komplexu, enzymu *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS). Tento enzym produkuje oxid dusnatý (NO) z aminokyseliny L-arginin. Ačkoli NO je plyn, chová se jako hormon a řídí, mimo jiné, roztažení krevních cest, které je důležité pro normální zásobu krve a energie pro svalstvo. Pokud nNOS chybí, začne se vyvíjet fibróza srdce jak u mdx myši tak i u pacientů s DMD.

Profesor **Andrew Hoey** a jeho kolegové ze Southern Queensland University v Austrálii aplikovali L-arginin denně po dobu 6 měsíců 6ti měsíčním mdx myším. To redukovalo fibrózu v jejich srdcích, zvýšil se koronární krevní tok a zlepšila se jejich srdeční funkce. V probíhajících experimentech se musí zjistit mechanismus působení L-argininu než se bude moci pokračovat v další práci a než bude jasné zda se L-arginin může stát lékem pro chlapce s Duchennem.

dnes, víc než o 20 let později, stále ještě čekáme na léčbu, na sebemenší lék jenž by zpomalil ničení svalstva. Ale nejen boj proti *tomuto* onemocnění se ukázal být mnohem obtížnější, než si kdokoli mohl představit, pokrok pro další genetické nemoci jako cystická fibróza nebo mnoho forem rakoviny je také velmi pomalý. Ve skutečnosti, "naše onemocnění", Duchennova svalová dystrofie, by se mohla stát prvním vzácným dědičným onemocněním, které bude mít genetickou terapii již v blízké budoucnosti.

Krok za krokem. Veškeré výzkumné přístupy, vysvětlené v této zprávě, jsou založeny na spolehlivých vědeckých výsledcích, většina povede k metodám, které se zhmotní v léčích, které se budou dát koupit. Ale bude to trvat spoustu času, protože jejich vývoj bude muset postupovat krok za krokem a každý z nich bude muset být opatrně plánován, testován na zvířatech a potom musí být dokázáno klinickými pokusy, že se osvědčil i u lidí. Ve zkratce, dokonce i když se některé metody zdají být teoreticky bez problémů použitelné, nejsou zatím povoleny. Naše děti budou muset brát léky na DMD po zbytek jejich, doufejme, dlouhého života. Léky nemohou mít vedlejší účinky, které se hromadí a stávají se časem nebezpečné. Musí být *naprosto bezpečné*. Vědci toto vědí, a vědí také, že regulační agentury jako FDA a EMEA, ačkoli se často zdá, že ztěžují a zpomalují práci, jsou tu pro to, aby vás chránili. Proces krok za krokem je pomalý, ale omyly s nehodami, které by zranily vás nebo jiné s ostatními nemocemi, by jen zpomalily vývoj našich a jejich léků.

Exon skipping. Jedna z genetických technik diskutovaných v této zprávě je zvláště slibná: *Exon skipping*. V klinickém pokusu v Nizozemí byla prokázána účinnost jednoho druhu potenciálních léků antisense oligonukleotidů, AONů, v jednom svalu u čtyř chlapců s DMD. Podobný pokus s dalším druhem těchto léků je nyní prováděn v UK. Zde je oprávněná naděje, že výsledky budou stejně pozitivní. Jsou už

naplánovány systematické pokusy s aplikací AONů do krevního oběhu tak, aby mohl zasáhnout všechna svalstva. Osvědčilo se to u zvířat, a my všichni doufáme, že stejné výsledky budou i u dětí. Chlapcům, kteří potřebují přeskočení exonu 51 a kteří se účastní těchto pokusů, bude exon 51 odstraněn z velké části poškozených nosičů genetické informace - jejich dystrofinové mRNA. Jejich svalstva by již na konci pokusu mohla pracovat lépe. Doufáme, že se tento přístup stane *účinnou léčbou*, i když to nepovede k celkovému vyléčení. To nebude trvat dalších 20 let, to bude mnohem dříve. Léčení metodou exon skipping bude muset být opakováno po nějaké době, po týdnech nebo měsících. Ale má to výhodu, že může být zastaveno pokud nastanou problémy a nahrazeno nějakou další efektivnější nebo stálejší metodou. Exon skipping bude ohromnou pomocí pro mnoho chlapců s DMD, avšak jen zpomalí postup onemocnění, bude to účinné léčení, *ale ne vyléčení*.

Farmakologické přístupy. Pro mnoho z vás, kteří jste ještě mladí a tak máte ještě velkou část vaší svalové tkáně, exon skipping nepřijde pozdě. Ale ztracené svalstvo nemůže být nahrazeno metodou exon skipping. Proto ti starší z vás budou mít možná větší prospěch z farmakologických přístupů než z těch genetických. Některé z těchto budoucích léků mohou být zneužity pro doping atletů, ale pro vás, kteří máte svalovou dystrofií, by měly být schváleny k léčení. Seznam těchto potenciálních léků je dlouhý, asi 30 jich je zmíněno v této zprávě a další se objeví v pozdějších aktualizacích. Některé z nich jsou již klinicky testovány s dobrými výsledky jako *Idebenone*.

Farmakologické metody mohou být vyvinuty rychleji než genetické metody. Tyto léky buď samotné nebo společně s ostatními, v *koktejlích*, mohou udržovat a posílit svalstva, podobně jako steroidy ale s menším množstvím vedlejších účinků, tím získáváte čas, zatímco čekáte na základní genetické léčení

Klinické pokusy jsou nezbytně nutné kroky k důkladnému vývoji léčby. Ale jsou to jen experimenty, které nemusejí vyjít. Některé již měly negativní výsledky, jako například Myodur, který nezastavil proteázy a Myo 029, který měl pozastavit myostatin, ale nevedl k pozitivním klinickým výsledkům. Ani v první sérii klinických pokusů, fázi-I, se neočekává nějaký klinický efekt. Většina těchto pokusů se snaží léčit jen jeden nedůležitý sval a to nemůže zlepšit funkci všeho svalstva.

Jsou potenciální nové léky bezpečné? To je hlavní otázka, kterou mají tyto pokusy zodpovědět. Účast je důležitá, ale nemá cenu přijít s velkým vydáním z daleka do experimentálních center.

Diagnostika mutace. Některé potenciální terapie jsou mutačně specifické, což znamená, že musí být známa přesná mutace pacienta k tomu, aby mohl být léčen vhodným lékem. Platí to například pro exon skipping a PTC124. Jiné metody, jako například nahrazení dystrofinového genu virovými vektory nebo upregulace utrophinu, jsou nezávislé na mutaci.

Metoda MLPA je nyní velmi rozšířená technika pro rozpoznání delecí a duplikací u chlapců a také u žen přenašeček. Očekává se ale, že nové techniky (např. microarray) brzy nahradí dosud užívané metody genetických testů.

Diagnostika přenašeček. Pro matky pacientů s DMD a jejich ženské příbuzné je důležitá genetická analýza jejich dystrofinové DNA. Vhodným genetickým poradenstvím se totiž dá vyhnout narození dalších chlapců s DMD v širší rodině pacienta. Ale pokud riziková žena může být ujištěna, že není přenašečka, může ji to povzbudit k tomu, aby měla zdravé děti beze strachu z opakování výše uvedených rizik.

Testování novorozenců. Novorozence lze testovat na vysoké hodnoty CK, nabízí to např. v Německu (Freiburg), Walesu (Cardiff), a Belgii (Antverpy). Dá se tak včas zjistit, zda chlapci mají DMD a prostřednictvím genetického poradenství je možno se vyhnout narození dalších dětí s DMD ve stejné rodině. Dva pilotní CK-screening programy se nyní připravují v US v Columbu v Ohio a v Atlantě v Georgii.

Registrace. Všichni chlapci a mladí muži s DMD by měli zaregistrovat svá osobní lékařská data do datové banky své země, která by měla být součástí mezinárodní registrační sítě, kterou vytváří celoevropská organizace TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu/registry) a britská Duchenne Connect (www.duchenneconnect.org). To by umožnilo najít vhodné účastníky pro klinické testy léků pro neobvyklé mutace, to by zaručilo, že pacienti a jejich rodiny by měli přístup k nejaktuálnějším informacím o výsledcích výzkumu.

Spojte se. Vy, rodiny s chlapci a mladými muži s DMD byste se měli stát součástí celosvětového DMD společenství a aktivně tam pracovat. Měli byste se setkávat s dalšími rodinami a pacienty ve sdruženích vaší vlastní země a také na mezinárodní úrovni. EAMDA, evropská Alliance Asociací svalové dystrofie, je jeden příklad. Společně můžete dělat mnoho věcí pro to, abyste urychlili vývoj léků. Zde jsou některé podněty:

Rychlejší schvalování. FDA a další regulační agentury potřebují měsíce k tomu, aby schválily klinické pokusy nových léčebných technik. Nakonec schválili pokus s exon-51-skipping technikou, ale schválení Britského pokusu trvalo asi rok. To byl důvod, proč Holanďané mohli skončit jejich pokus dokonce dříve než Britové měli dovoleno začít. Teď se zdá, že tyto agentury trvají na schválení každého typu AONů pro různé delece a duplikace zvlášť. Vědci se je pokusí přesvědčit, že pořadí AONů bude různé, ale všechno ostatní včetně chemických vlastností bude stejné jako pro exon 51 skipping. Měli byste pracovat společně s PPMD a dalšími organizacemi a zahajovat veřejné diskuse s regulačními agenturami. Takové diskuze již začali s FDA a probíhají celkem dobře. Pokud budou úspěšné léky pro další exony budou k dispozici během několika měsíců a ne let od okamžiku kdy bude lék pro exon skipping 51 hotov.

Vzdělávejte vaše doktory. Vzdělávací materiály jsou dostupné v DuchenneConnect, TREAT-NMD, PPMD, UPPMD, ActionDuchenne a dalších organizacích. Je důležité využít materiály, které jsou dostupné on-line a jsou pravidelně aktualizované, když hovoříte s vašimi lékaři. Mnoho místních nebo praktických doktorů ví velmi málo, pokud vůbec něco, o DMD. Je důležité je vzdělávat, aby vám pomohli se co nejlépe starat o vaše dítě.

Dějte pozor na zázračné léky a léčení. Po přečtení této zprávy, z účasti na prezentacích, z diskusí "našich" vědců, z mnoha schůzek organizací zabývajících se DMD by mělo být rodičům jasné, že léky, které jsou bezpečné a efektivní, mohou být vyrobeny pouze po pečlivém vývoji pomocí striktně

vědeckých metod. Pokud se setkáte se "zázračnými" léky na internetu nebo dostanete nabídku zázračného vyléčení, a rozhodnete se je koupit a podat vašemu dítěti zeptejte se, prosím, dodavatelů zázraku kolik chlapců s DMD již vyléčili, jakých výsledků chlapci dosáhli, kolik nového dystrofínu zjistili ve svalstvech, a jak se zlepšila funkce svalu.

Pokud to, co nabízeli opravdu mělo nějakou účinnost, zeptejte se sami sebe proč tam nejdou tisíce rodin s jejich nemocnými dětmi. Dejte pozor, mohli byste ztratit spoustu peněz a možná vážně zranit vašeho chlapce.

Podporujte povědomí. Měli byste aktivně pracovat s vašimi organizacemi pro svalové dystrofie a DMD ve vašich zemích a měli byste se setkávat v mezinárodních organizacích jako TREAT-NMD v Evropě a PPMD v USA a v několika dalších zemích. Všichni společně budeme schopni zaujmout pozornost vašich vlád a široké veřejnosti, kteří nemají

představu o tom, co DMD znamená, přiblížit jim vaše každodenní problémy a naděje na vyléčení. To by mohlo být učiněno politickou agitací, pomocí médií, novin, rádia a televize. Otevřelo by to oči grantovým agenturám a charitě, jejichž peníze jsou potřebné pro výzkum a také by to přineslo peněžité dary od privátních zdrojů odpovídající z daňového základu.

Dary pro výzkum, i malé jsou důležité. Mohli by přispívat pouhý zlomek skutečných cen vývoje léků, které jdou do milionů dolarů, liber nebo eur. Tyto penny a centy jsou připomínkou ne tak bohatých lidí těm skutečně bohatým, kteří se o vás zajímají a chtějí, abyste i vy, jako každý jiný, mohli mít dlouhý a šťastný život.

Tato kapitola byla napsaná s paní Patricií Furlong PPMD a profesorkou Kate Bushby TREAT-NMD.

Odkazy na jiné důležité články v dřívějších zprávách.

V mých dřívějších zprávách o třech schůzkách Parent Projectu z roku 2006 a 2008, bylo popisováno mnohem víc témat o výzkumných přístupech, které nejsou zmíněny v této zprávě. Jsou uvedeny zde s udáním, kde je můžete nalézt. Mé dřívější zprávy můžete vidět na mých internetových stránkách www.duchenne-information.eu v angličtině po kliknutí na "Reports on the research for a therapy of Duchenne muscular dystrophy". Krátké názvy zpráv "2006 Cincinnati English" (C06), "2006 London English" (L06), and "2007 Philadelphia English" (P07) jsou dále zestručněné v následujícím seznamu v závorkách následovaných číslem stránek (například P07-20) pro uvedený článek.

Nick Catlin: Standing on the shoulders of giants (L06-1).

Louis Kunkel: Twenty-year anniversary of finding the dystrophin gene and its protein (L06-2).

Robert Weis: Why do we need to know the exact mutation (P07-19)?

Stephen Abbs: Why should one test for the in the dystrophin gene (L06-17)?

Kevin Flanigan: If there is still no cure, why do we need to know the exact mutation (C06-13)?

Jennifer Morgan: Viral vectors and muscle stem cells (L06-7).

Terence Partridge: The promise of stem cells (C06-7).

Kate Bushby: Why do we need clinical trials (P07-3,L06-3)?

Diana Escolar: International clinical trials (P07-16).

Kate Bushby: North Star Project, international clinical trial with steroids (L06-12).

Tan Nguyen: How does the FDA approve a Duchenne drug (P07-18)

Robin Sharp: Duchenne registry (L06-18).

Serge Braun, Kate Bushby: TREAT-NMD, a network of excellence of the European Union (P07-18).

Madhuri Hedge: CETT, collaboration, education and test translation program (P07-20).

Kyle Brown: DuchenneConnect will encourage collaboration and genetic testing for Duchenne muscular dystrophy (P07-21).

Patricia Furlong: What does "Connect..." mean (P07-22)?

Francesco Muntoni: Do not miss the wood for the trees (L06-19).

Steve Wilton: How exon skipping works (L06-4).

Steve Wilton: An interview on exon skipping (C06-14).

Gertjan van Ommen, Francesco Muntoni: When will there be an exon-skipping drug for Duchenne boys (P07-8)?

Děkuji TREAT-NMD, PPMD, a ActionDuchenne za finanční podporu. Zde jsou jejich kompletní adresy a kontaktní informace:

TREAT-NMD

Prof. Kate Bushby

Institute of Human Genetics

University of Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK

Tel.: *44-191-241-8621, Internet: www.treat-nmd.eu

Parent Project Muscular Dystrophy

Patricia Furlong

1012 North University Blvd. Middletown, Ohio 45042, USA

Tel.: *1-513-424-0696, Internet: www.parentprojectmd.org

ActionDuchenne

Nick Catlin

Epicentre, 41 West Street

London E11 4LJ, UK

Tel.: *44-208-556-9955, Internet: www.actionduchenne.org

Jestliže kromě chybějícího exonu 50 je odstraněn i exon 51, pak exon 52 je přímo připojen k exonu 49. Čtecí rámec není narušen, protože exon 49 končí a exon 52 začíná kompletním kodonem tří bází.

Konec exonu 49 | Začátek exonu 52
- - - CAG-CCA-GUG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG - - -
gln pro val lys | ala thr met gln asp leu

Předčasný stop kodon se v exonu 52 ani později neobjeví, ale v bílkovině dystrofinu chybí 77 aminokyselin jejichž genetická informace byla přenášena exony 50 a 51. Chybí v centrální části zkráceného dystrofinu, který však bude pravděpodobně ještě částečně funkční a tak vznikne mírná Beckerská dystrofie namísto maligní Duchennovy dystrofie.