

Duchenne Musküler Distrofi Terapisi için Araştırma Yaklaşımları

Prof. Dr. Günther Schuerbrandt'ın raporundan ve kişisel oluru ile özetlenerek alınmıştır. Kendisine müteşekkirimiz.

Çevirenler:

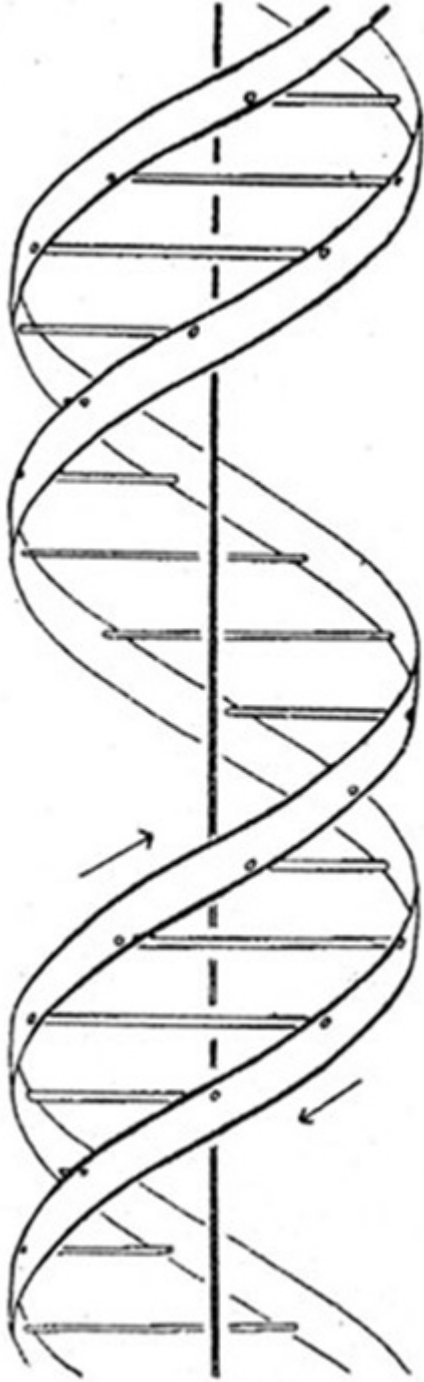
Şulenur Subaşı, Selen Serel, İpek Alemdaroğlu, Ayşe Karaduman, Haluk Topaloğlu, Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Genler nasıl protein yapar?

Genler, genetik materyal deoksiribonükleik asit (DNA)'in fonksiyonel birimidir. Yapısı **James Watson** ve **Francis Crick** tarafından 1953'te tanımlanmış iç içe iki çift sarmal iplik merdivene benzerdir (Sonraki sayfaya bakınız). Bu merdivenin her basamağı 4 farklı küçük molekül içerir, genetik harf olarak adlandırdığımız bazlar: adenin, guanin, timin ve sitozindir ve sırasıyla A,G,T ve C olarak kısaltılır. Basamaklar A-T ve G-C olmak üzere iki baz çiftini içerir, baz çiftleri, çünkü uyum ancak bu şekilde gerçekleşir. Mesela eğer GGCTTAATCGT DNA iplikçığının bir baz sırasıysa, karşı iplikçik sırası bunu tamamlayıcı olmalıdır. A her zaman T'nin karşısında ve G, C'nin karşısındadır.

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

Genetik harflerin (bazların) bu sırası gelişim ve yaşayan organizmayı korumak için bir **genetik bilgidir** ve nesilden nesile geçer.



Genlerin çoğu **proteinlerin** sentezi için bilgileri taşır. Hücre çekirdeğinde aktif genlerin genetik bilgisi yer alır, diğer genetik yapıya (*prematür mesajcı ribonükleik asit* veya **pre-mRNA**) kopya (**transkripsiyon**) edilir, ve *bu olay transkript* olarak adlandırılır. Genlerin çoğu proteinler için bilgi barındıran ekson denilen aktif/ kodlama bölgelerini ve gen aktivitelerinin kontrolü için bilgi barındıran daha uzun intronları içerir. Ribonükleik asitler (RNA'lar) DNA'nın benzer bazı T yerine urasil (U) bazı kullanır. Çünkü ekson atlama için RNA yapısı önemlidir, bu antisense oligo nükleotidlerin iki farklı çeşidi sayfa 6'da açıklanıyor.

Transkripsiyon/kopyalama sonrası ve hala hücre çekirdeği içindeyken, intronlar pre-RNA'dan ayrılır ve ekzonlar mesajcı RNA'yı oluşturmak için **birleşirler**. **mRNA (mesajcı RNA)** protein sentezi için sadece kodlanmış bölgeleri içerir. Daha sonra mRNA çekirdeği terk eder ve çekirdeğin dışında, sitoplazmada yer alan protein sentezleme yapısı olan **ribozomlara** doğru hareket eder. **Bağlantı bölgeleri** premRNA'dan kodlanmamış intron bölümlerinin doğru ayrılması için ekzonların içinde ve ekzonların intron sınırlarında yer alan özel bölümlerdir. Yapıştırma birçok protein ve küçük RNA kompleksinden oluşan **splisozomlar** tarafından kendi kendine başarılır.

Genetik kod. Protein sentezi için gerekli olan genetik bilgi mRNA'nın içinde her biri 3 ardışık baz içeren **genetik kelimelerle** ifade edilir. Bu genetik kelimeler 20 farklı amino asitten (proteinlerin yapı taşları) birini belirten, üç istisna ile, kodonlarla yazılır. Her 3 baz için 64 farklı kod kelimesi vardır burada birkaç örnek bulunmaktadır:

GUU = valine, AGC = serine, AUG = methionine, ACG = threonine, CAC = histidine, CCA = proline, UUU = phenylalanine, GCA = alanine, GCG = alanine.

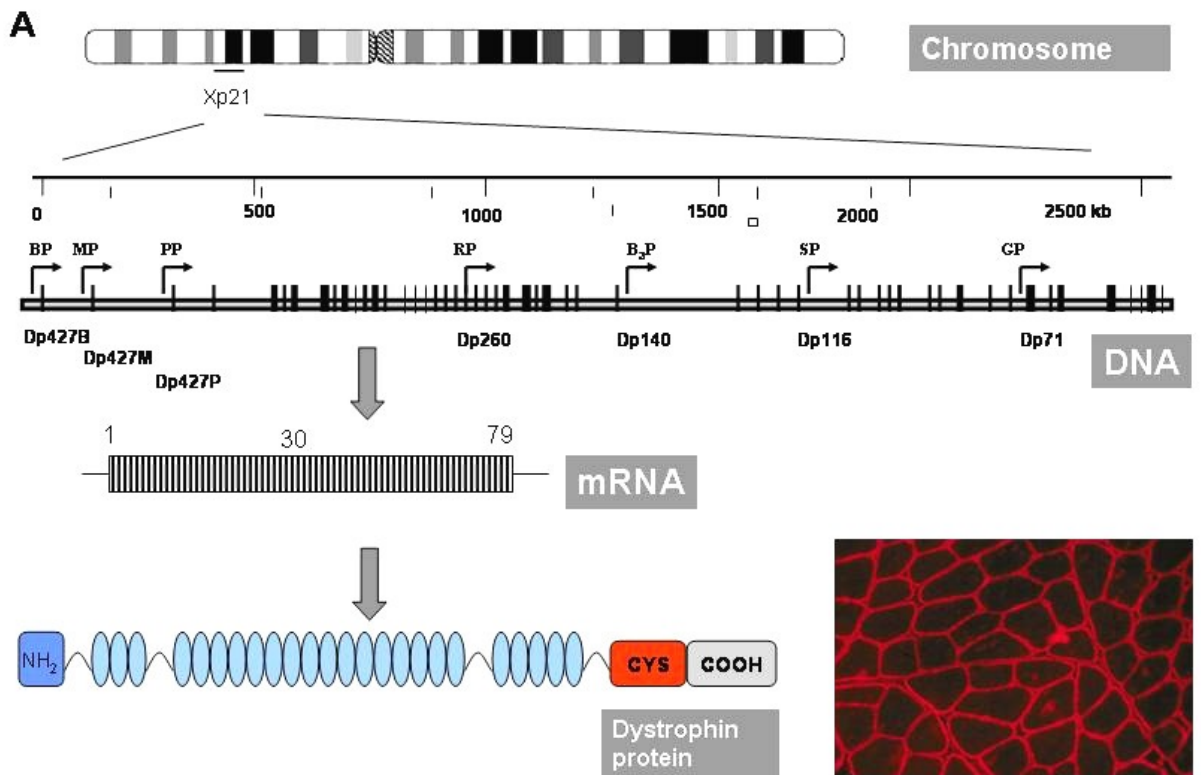
Birçok amino asit birden fazla RNA kod kelimesine sahiptir. Kodonlar arasında boşluk yoktur. Bu yüzden mesela bir genin başlangıcındaki kısa bölüm AUG-AGC-GCA-CCA şunu ifade eder; genin yaptığı protein methionine, serine, alanine, proline amino asitleri ile başlar. Böylece her zaman AUG olan ilk kod kelimesi ile bir okuma çerçevesi- aralarında boşluk olmadan bir üç harflik genetik kelime ardından diğeri- oluşturulur. Bu örnekteki tireler gerçekte yoktur, sadece okuma çerçevesini gösterirler. Eğer mesela kırmızıyla yazılmış olan bir harf **G** kazara ayrıldıysa (mutasyon oluştuysa) sıra AUG-ACG-CAC-CA... şeklinde değişir, okuma çerçevesi değişir ve kod kelimeleri anlamlarını değiştirir, böylece farklı amino asitler belirtirler. Burada en çok methionine, threonine, histidine yanlı amino asitler tarafından takip edilenlerdir.

Bu bilgi ekson atlamanın nasıl çalıştığını anlamak için çok önemlidir.

Ribozomlarda mesajcı RNA'daki genetik kod kelimeleri okunur ve birçok, çoğu zamanda binlerce amino asitten oluşan proteinlerin diline çevrilir. Önceden bahsedilen üç istisna ribozomlarda protein sentezinin durdurulmasını sağlayan **stop kodon** olan UAA, UAG ve UGA kelimeleridir.

Distrofin geni ve proteini. **Duchenne musküler distrofi** sadece erkek çocukları etkiler (ortalama her 3500 yenidoğan erkek). Çünkü cinsiyete bağlı geçiş gösteren hastalığın genetik taşıyıcısı olan kadınlarda bulunan iki X kromozomundan birinde distrofin geninde bir mutasyon yani bir hata vardır. Hala tedavi edilemeyen herediter hastalık Duchenne musküler distrofiye neden olan bu mutasyonu tek X kromozomuna sahip erkek çocuklarının yarısına taşırlar. Bazen mutasyon yeni bir ailede kendiliğinden ortaya çıkar, yani anne taşıyıcı değildir. **Distrofin geni** 20.488 adet genlerimiz içinde en büyük ikincisidir. (Kas hücresi esnekliğini sağlayan kas proteini titin için gerekli olan gen distrofinden yaklaşık 100 kat daha geniştir).

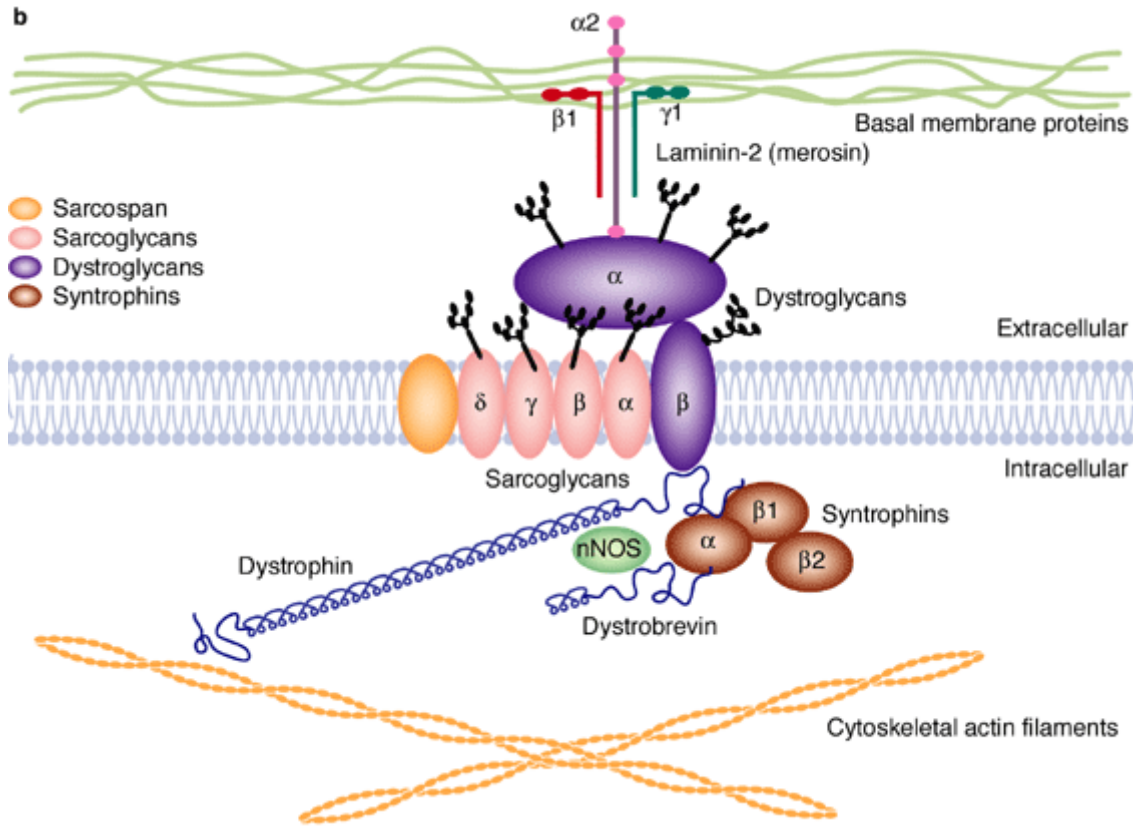
Sonraki örnek X kromozomunun kısa kolu üzerindeki genin yerini gösteriyor. DNA'sı 2.220.381 genetik harf içerir ve bunlar 79 ekson (aktif bölge) içinde gruplandırılmış biçimdedir. Proteinin tam uzunluklu ve 6 kısa versiyonunun üretimi için başlangıç bölgesinde 7 düzenleyici bulunmaktadır. Birleşmeden sonra mRNA sadece tüm genlerin %0.5'i olan 11.058 genetik harf içerir. Ribozomlar içinde mRNA'daki genetik bilgiye göre taşıyıcı RNA (**tRNA**) ile sentez bölgesine getirilen 3685 aminoasitten distrofin proteini oluşturulur. Tüm genlerin %99.5'ini oluşturan eksonların arasındaki aktif olmayan sıralar **intron** olarak adlandırılır. Şu an biliniyor ki bu sıraların bazıları gen aktivitelerinin düzenlemesi için önemlidir ve bazen eksonlarda aynı mutasyonu olan Duchenne hastalarının farklı semptomlarında payı olan hala bilinmeyen fonksiyonlara da sahiptirler.



Distrofin proteini 4 **menteşe** ile ayrılmış 24 tekrarlı aminoasit sıraları ile çubuk şekline sahiptir. İki sonlanma bölgesi N ve C terminalleri olarak adlandırılır. Bu sonlanma bölgelerinde ayrıca sistein ve kükürt içeren aminoasitlerin bulunduğu bir bölge vardır. Sağlıklı kas dokusunun enine kesitinde floresan antikorları ile hücre zarlarında distrofin molekülleri görülür hale gelir.

Distrofin gen ve protein büyüklüğü. Distrofin geninin çift sarmal yapısı 0.75 mm uzunluğundadır. Diğer 20.000 insan geni ile birlikte, yaklaşık 0.01 mm çapında bir hücre çekirdeğine sığar çünkü genetik materyal son derece sıkı paketlenmiştir. Tam uzunluklu

distrofin proteininin bir molekülü kendi geninden çok daha kısadır (125 nanometre=0.000125 mm uzunluğunda). 8000 tanesi düz bir sırada uç uca uzanır ve sadece bir milimetreyi kaplar. Kasın bir gramında 114 milyar distrofin molekülü vardır.



Distrofin-glukoprotein kompleksi

Distrofinin rolü. Distrofin kas hücrelerinin mekanik stabilitesi için gereklidir. Kas hücre membranı içinde yer alır. *C-terminal sonlanması* membran içinde **distrofin-glukoprotein kompleksi** gibi diğer protein gruplarına bağlıdır ve diğer sonlanma olan *N-terminali* kas hücresi içindeki kontraktıl yapılara bağlıdır. Distrofinin çubuk merkez alanı kendilerini defalarca geri katlayarak kıvrılmış aminoasit zincirleri içerir. Eğer kas hücresi kontraksiyon hareketi distrofin proteininin uzunluğunu değiştirmek için zorlarsa, katlanmış yapısı yay gibi, *şok emici gibi* davranmasına izin verir. Distrofin; aktin-myozin kontraksiyon mekanizmasıyla oluşturulan mekanik enerjiyi, dengeli bir şekilde ve aşırı zorlamadan kas hücre membranlarına ve bunların dışındaki yer alan konnektif doku ve tendonlara aktarır.

Distrofin-glukoprotein kompleksi. Distrofin birçok role sahiptir: Distrofin-glukoprotein kompleksinin karmaşık yapısını düzenler ve birçok diğer proteinin yerini organize eder. Kas büyümesi kontrolü ve hücrelerde doğru miktarda kalsiyumun sağlanması gibi biyolojik süreçleri de organize eder. Hücrelerin çeşitli bileşenleri arasındaki bu karışık etkileşimlerin birçok detayı hala bilinmemektedir. Duchenne'li çocukların kas liflerinde distrofin ya hiç yoktur ya da çok azdır. Distrofinin koruyucu ve düzenleyici etkileri kaybedilince, kas kasılması

kas membranda yırtılma ve delikler meydana gelir. Böylece kas liflerinin içine fazla miktarda kalsiyum girer. Fazla kalsiyum, kas proteinlerini yıkan ve hücre ölüm programlarını (apoptozis) başlatan *kalpain* ve diğer *proteazlar* gibi enzimleri aktive eder. Bunun sonucu inflamasyon ve kasın kendini yenilemesinde yavaşlama görülür. Bu olaylar DMD te tipik olarak görülen skar dokusu, fibrozise yol açan fibroblast aktivasyonudur.

Daha yavaş ilerleyen Becker musküler distrofili erkek çocuklar normalden daha kısa ve daha az ya da anormal distrofin proteinine sahiptirler. Bu proteinler görevlerini yerine getirirler ama normal kadar etkili çalışamaz. Distrofin yokluğunda sadece iskelet kasları zarar görmez, düz kaslar ve kalp kasları da zarar görür. Kalp kası hasarı **kardiyomyopati** oluşturur. Düz kas zayıflığında kan damarlarının gevşeme yeteneğinde azalma, solunum ve sindirim hareketinde azalma gibi problemler nedeni ile sindirim sistemin de aralarında olduğu birçok sistem etkilenebilir. *Böylece sadece bir genin hasarı vücudun geniş parçalarını etkiler.*

Ekson Atlama

Araştırmanın amacı. *Sağlıklı*, 30 kg ağırlığında 5 yaşında bir erkek çocuğu 1.5 katrilyon (1.5×10^{15}) distrofin molekülü içeren yaklaşık 12 kg kasa sahiptir. 5 yaşındaki Duchenne Musküler Distrofisi olan erkek çocuğu kaslarının %30'unu kaybeder, yani kas kütlesi 8 kg olarak kalır. Bu kalan kasların sadece izleri vardır veya distrofini hiç yoktur, çünkü hasarlı genin taşıdığı bilgi protein sentezi için doğru okuma yapamaz. Tüm kas liflerinin %3'ünden daha az olan ve **tersine çevrilmiş lifler** olarak adlandırılan az sayıda kas hücresi, kendiliğinden ekson atlama ile ortaya çıkan normal distrofin izleri içerir. Hastalığın ilerlemesini önlemek için ne kadar distrofin gerekiyor bilinmiyor ama hiç olmamasından iyidir(**1**). Yeni distrofin normal olan kadar uzun değildir, daha kısadır ama uygun şekilde çalışabilir.

Ekson atlama, Duchenne'in genetik tedavisi. 90ların ortasında bir tartışmada Hollanda'da Leiden Üniversitesinden **Gertjan van Ommen**, genetik tedaviyi uzun süre ciddi yan etkiler olmadan nasıl başardığını açıklamıştı. Şu an bu genetik tedavi ekson atlama olarak adlandırılıyor. Hollanda, Fransa, Japonya, Avustralya, İngiltere ve Amerika'da birçok araştırma grubu, kapsamı sadece laboratuvar hayvanları ile sınırlı olmayan ayrıca Duchenne hastaları üzerinde yapılan klinik çalışmalar ile de son 15 yıl boyunca geliştirilmiştir.

Ekson atlama "ekzonlar arasında atlama" anlamındadır. Ekzonlar bir genin aktif bölgeleridir. Duchenne'li erkek çocukların distrofin geninde mutasyonlar oluşur bu yüzden delesyonlar yani bir veya birçok ekzon kaybolur, duplikasyonlar yani tekrarlar veya nokta mutasyonları yani harflerin sırasında hatalar oluşur. Bu mutasyonlar hasta erkek çocuklarda bir veya iki genetik harf tarafından normal okuma çerçevesi içinde meydana gelerek çerçeve dışı anormal durumu oluştururlar. Okuma çerçevesini değiştirerek ve mutasyondan hemen sonra bir **prematür stop kodon** ortaya çıkar.

Protein biyosentezi için genetik bilginin okuma süreci "dur işareti" ile kesilir bu yüzden distrofin yapılamaz. Eğer pre mRNA içinde bir veya daha fazla komşu eksonların varlığı; birleşim yerleri, ekson atlama, hatalı eksonları mRNA içinde daha fazla tutulmalarını önleyen mekanizmalar gibi yollar ile bir şekilde bloklanırsa bu hatalar düzeltilebilir ve protein sentezi yeniden başlatılabilir. Bu bloklama için antisense oligolar veya sadece oligolar olarak kısaltılan antisense oligonukleotidler gereklidir. Bunlar ekzon içerisindeki veya atlanacak ekzonları içeren özel bir dizi ile yaklaşık 20- 30 genetik harf uzunluğunda genetik materyal

olan RNA'nın kısa parçalarıdır, bu yüzden birbirlerine Watson-Crick bağlayıcı ile tam olarak bağlanabilirler. Böylece, diğer ekzonlara bağlanmaları önlenmiş olur.

Ekzon atlama nerede oluşur? Önceden açıklandığı gibi kas hücre çekirdeği içinde distrofin geninin 2.2 milyon genetik harfi pre-mRNA'ya kopyalanır, **transkripsiyonu yapılır**. Çok uzun intron sıraları sonra kesip çıkarılır ve sadece 79 ekzon sırası (11.000 harf uzunluğunda) birbirine katılır, çok daha kısa mRNA'ya **eklenirler**. *Ekzon atlama bu eklenme sürecinde gerçekleşir*. Silinmiş ve atlanmış ekzon olmadan kısalmış olan mRNA hücre çekirdeğini terk eder ve sitoplazmadaki ribozomlara göç eder. Orada mRNA'nın genetik bilgisi okunur ve proteinlerin diline **çevrilir**, distrofin amino asit dizisi üretilir.

Duchenne Becker distrofiye dönüştürülür. Kayıp ekzonlar yüzünden - mutasyonlarla silinmiş ve ek olarak da atlanmış- amino asitler bu eksik ekzonlarla oluşuma giderler. Bu yüzden yeni distrofin 3685 amino asitten oluşan normal sayıdan daha az olan amino asit zincirine sahiptir. Ama buna rağmen kas kontraksiyonunun mekanik stresinden kas hücre membranını bir ölçüde koruyabilir. Bu yüzden hastalık semptomları daha hafif olur, kas dejenerasyonu daha yavaş ilerler ve bazı vakalarda yaşam süresi belirgin şekilde normale kadar yükselebilir. Böylece Duchenne distrofi kendinin daha hafif şekli olan **Becker musküler distrofiye** değişmiş olur.

Bir terapi ama hala tedavi değil. Ekzon atlamanın amacı hastalığı daha hafif bir şekle dönüştürmek ve hastalık ilerleyişini yavaşlatmaktır. Bu yüzden ekzon atlama *tedavi değil* ama *sadece bir terapidir*. Gen teknolojisinin bu metodu ile hasarlı gen ne yerine gelir ne de onarılır ama kendi bilgi işleme mekanizması düzelecektir.

Ekzon 51 atlamanın moleküler detayları

Ekzon atlamanın nasıl ve nerede çalıştığıın genel açıklamasından sonra bir örneğinin moleküler detayları şöyledir: Prosensa tarafından kullanılan antisense oligo PRO051, ekzon 51'i nasıl atlar ve böylece Duchenne'li erkek çocuğun distrofin geninde ekzon 50 delesyonuyla değişen okuma çerçevesi nasıl onarılır?

Bu raporda daha bilimsel kelime olan baz veya nükleotid için genetik harf ve triplet veya kodon yerine genetik kelime ifadelerini kullanıyoruz. Başlanıçta normal distrofin geninden kopyalanan mRNA'nın ekzon 50 ve 51'indeki harflerin sırasının bir kısmının yanı sıra, ekzon 49'un sonlanması ve ekzon 52'nin başlangıcının sırası var. Kodonların amino asitlere çevirisi distrofin proteinini oluşturmak için birbirine bağlandığı yer olan ribozomlarda oluşur. Kırmızı ile gösterilen üç harf sonradan gerçek durdurma sinyali olacak olan gizlenmiş durdurma sinyali UGA'dır. Ekzon 50 son kelimenin ilk harfinden sonra sona ermektedir ve devamında UCU'ya bağlanmaktadır. Ekzon 51'in ilk ve ikinci kelimeleri ile birlikte serine'i meydana getirmektedir.

| | | | |
|---------------------|--|---------------------------------|--------------------|
| End Ekson 49 | | Start Ekson 50 | End |
| Ekson 50 | | Start Ekson 51 | |
| ---CAG-CCA-GUG-AAG | | AGG-AAG-UUA-GAA---AUU-GGA-GCC-U | CU-CCU-ACU-CAG-ACU |

gln pro val lys | arg lys leu glu ile gly ala ser | pro thr gln thr

hidden stop sign

-GUU-ACU-CUG-**GUG-ACA**-CAA---AAA-CUA-GAA-AUG-CCA-UCU-UCC-UUG-AUG-UUG-GAG---
val thr leu val thr gln lys leu glu met pro ser ser leu met leu glu

End Ekson 51 | Start Ekson 52

---AUG-AUC-AUC-AAG-CAG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
met ile ile lys gln lys | ala thr met gln asp leu

Ekzon gen içinde silindiğinde ve eklendikten sonra, mRNA içinde de, ekson 49 ekson 51 tarafından takip edilir. Bu, ekson 51'deki okuma çerçevesinin, sağ tarafa tek harf eklenmesi ile değişmesine neden olmaktadır. Sonunda okuma çerçevesinin değişimi, saklı stop sinyalinin 3 kelimelik kodon'a yani prematüre stop sinyali UGA'ya çevrilmesine neden olacak 8 yanlış kelimeyi meydana getirir.

Değişen kelimeler ve bunların şimdiki yanlış amino asitleri kırmızı ile gösterilmiştir. Bu 8 yanlış kelime proteinin büyüyen amino asit zincirinin içinde 8 yanlış amino asitin uymasına yol açar. Yeni dur işaretinde ribozomlarda distrofin sentezi prematür olarak kesintiye uğrar, eksik kalır, hasarlanır ve Duchenne musküler distrofi gelişir.

End Ekson 49 |

Start Ekson 51

---CAG-CCA-GUG-AAG | **CUC-CUA-CUC-AGA-CUG-UUA**gln
pro val lys | **leu leu leu arg leu leu**
antisense oligo

active stop sign

UC-UUU-ACG-GUA-GAA-GGA-ACU

-**CUC-UGG-UGA-CAC** AAG---AAC-UAG-AAA-UGC-CAU-CUU-CCU-UGA-UGU-UGG--
leu trp STOP!

ESE

sequence

End Ekson 51 | Start Ekson 52

---**AU-GAU-CAU-CAA-GCA-GAA-G** | **GC-AAC-AAU-GCA-GGA-UUU**---

Ekzon 51'i atlamak için, antisense oligo PRO051, mavi renkte gösterilen okuma çerçevesini onarmak için eklenir. Onun 20 genetik harf sırası ekzon 51 içinde 20 harfi tamamlayıcı bir yolla düzenlenir, kırmızıyla çizilmiş olan *ekzonik yapıştırma güçlendirici dizisi*, ESE, normal eklenme işlemi için önemlidir.

PRO051 başka bir yere değil, kendiliğinden bu ESE sırasına özellikle yapışır ve ekzon 51'in *mutasyona uğramış genin* mRNA'sının içine girmesini engeller. Bu ekzon eklenme işlemi sırasında *atlanır*. Artık ekzon 51 orada değilken ve ekzon 50 önceden orada değilken, ekzon 52 direk ekzon 49'u takip eder. Okuma çerçevesi daha fazla zarar görmez çünkü ekzon 49 sonlanır ve ekzon 52 tamamlanmış bir genetik kelime ile başlar:

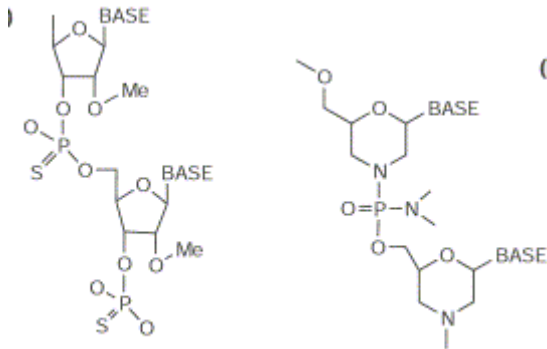
End Ekson 49 | Start Ekson 52

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

Ekzon 52'de veya sonra prematür dur işareti oluşmaz, ama normal, "sağlıklı" mRNA'da ekzon 50 ve 51'in 77 genetik kelimesi atlanmış, "kurtarılmış" mRNA'da kaybolur ve 77 amino asit bu distrofin proteininde kaybolmuş kelimelerle karar verir. 3.685 amino asit yerine, sadece 3.608'ine sahiptir, normal distrofinden %2 daha azdır. Bunlar kısalmış distrofinin merkez bölümünden kaybolur ve orada önemli fonksiyonu yoktur. Daha kısa distrofin hala kas membranını koruyan ve böylece Duchenne'in hızlı kas yıkımını yavaşlatan ve daha yavaş formu olan Becker musküler distrofiye indiren şok emici rolünü yerine getirebilir.

Antisense-oligo-ribonucleotidler, potansiyel ekzon atlama ilaçları.

Farklı tip antisense oligolar. Prosensa ve Sarepta tarafından yapılan hayvan deneyleri ve ilk ekzon atlama klinik çalışmaları için iki çeşit antisense oligo kullanıldı. DNA dışında ikinci önemli, doğal nükleik asit olan ribonükleik asidin(RNA) temel yapısına sahiptirler. RNA alternatif şeker benzeri madde üniteleri riboz ve fosforik asitin uzun zincirlerinden oluşmaktadır. Her riboz ünitesi 4 genetik harfin birini taşır, adenin (A), guanin (G), sitozin (C) ve bu vakada DNA'daki harf timin (T)'nin benzeri olan urasil (U)dir. Bu harflerin sırası çeşitli uzun ve kısa RNA'lar için önemlidir, çünkü birbirlerine Watson-Crick bağlayıcı kuralı ile DNA'ların ve diğer RNA'ların tamamlayıcı sıraları için eklenirler: G C'ye ve A U'ya (veya DNA'da T). Bu mekanizma 4 farklı çeşit dışı olan bir fermuar gibi çalışır. Potansiyel ekzon atlama ilaçları, **antisense oligolar**, sadece yaklaşık 20-30 genetik harf ile kısa RNA parçalarıdır. Bu kısa diziler kendilerini sadece kapatmaya niyet ettikleri RNA dizilerine eklenirler. Bu kısa diziler, sadece RNA dizilerine kendilerini eklemeyi garanti ederler. Buna rağmen her hücremizde bulunan 46 kromozomumuzun oluşturduğu tüm DNA'mız, 20.000 genimize ait olan %1'lik veya 3 milyondan fazla kelimededen oluşan DNA dizisine sahiptir. Böylece ihtiyaç duyulduğunda RNA'ya kopyalanabilir. Bu çok önemlidir, çünkü Duchenne'e karşı antisense oligolar sadece hasta çocuğun X kromozomu üzerindeki distrofinin genetik bilgisi ile mücadele eder, başka diğer genle değil. Duchenne'li bir çocuğa ekzon atlama ilacı verildiğinde, başka bir genetik yapıya hedef dışı bir bağlanma ciddi yan etkilere neden olabilir.



2'O-Metil antisense oligo Morpholino antisense oligo

Antisense oligoların farklı özellikleri. Antisense oligoların molekülleri proteinler ve nükleik asitler kadar büyük değildir, bu nedenle böbrekler yoluyla vücuttan oldukça hızlı uzaklaştırılırlar. 2'O-metil elektrik yükü taşır ve bunlar elektriksel olarak nötral olan morpholinos kadar hızlı idrarla atılmadığı için kanda değişik proteinlere bağlanırlar. Farelerle yapılan denemelerde gösterildiği gibi, serumun yarı ömrü mesela oligoların serumdan uzaklaştırılmak için yarılanma zamanı; morpholinos için yalnızca yaklaşık 2-3 saat iken, 2'O-metil için yaklaşık 4-5 haftadır. Bu nedenle 2'O-metilin terapötik aktivitelerini gösterdikleri yer olan kas hücreleri tarafından alınması için morpholinoso göre daha fazla zamana ihtiyacı vardır. Durum insanlarda muhtemelen aynıdır. Çünkü hastalarda bu iki tip antisense oligolarla yapılan ilk klinik çalışmalarda, sonra anlatacağı gibi, 2'O-metil kullanılarak aynı sonucun elde edilmesi için morpholinosların daha fazla doz ve uzun tedavi süresine ihtiyaç vardır. Ekzon atlama tedavisi kuvvetle muhtemel çocuğun tüm yaşamı boyunca verilmesi gerekecektir. *Subkutanöz enjeksiyon* (deri altından) intravenöz enjeksiyondan daha pratiktir. Çünkü damardan yapılan enjeksiyon medikal ortam gerektirirken, subkutanöz enjeksiyon evde normal kişiler veya hasta tarafından kendi kendine yapılabilir. Bu sebeple suda çözünür 2'O-metil klinik denemelerde subkutan olarak uygulanıyor ama morpholinos yüksek dozlarda suda çözülemez ve bu yüzden kan damarları içine enjeksiyon veya infüzyon gerekir.

Bilindiği üzere, Duchenne'li erkek çocukların hücre membranları altında hiç distrofin yoktur veya çok az distrofin vardır. Bu yüzden distrofin ile ilişkili birçok farklı protein de kaybolur. Böylece kuvvetli kas kontraksiyonları sırasında kas hücresi membranlarını mekanik streslerden koruyan "şok emici" görevlerini yerine getiremezler. Bunun anlamı zamanla membranlar yıkılır, oluşan yırtık ve deliklerden kan akımı içine bazı hücre içeriği geçer. Mesela önemli ölçüde kan içinde konsantrasyonu artan ve çocuğun kas distrofiye sahip olduğunun ilk belirtisini veren kreatin kinaz enzimi (CK) gibi. Diğer taraftan hücre dışından maddeler hasarlanmış kas hücre membranlarına hasarlanmamış membrandan daha kolay ve hızlı geçerler. Böylece ekzon atlama gibi bir tekniğin aktif içerikleri kas hücresi içine mümkün olduğunca hızlı ve etkili biçimde girebilir, bu membran defekti bir avantaja dönüşür.

Olası bir Duchenne ilacının terapötik etkisi nasıl ölçülür. Ekzon atlama klinik denemeleri, antisense oligolar Duchenne'li erkek çocuklarda yıllar boyunca distrofik kasın dejenerasyonunu yavaşlatabildiğini kanıtlamaktadır. Bunu yapmanın tek yolu tedavinin kas fonksiyonu üzerinde etkisini ölçmek için FDA ve EMA tarafından kabul edilen *sonuç ölçümü* olarak da adlandırılan **altı dakika yürüme testi**, 6MWT kullanmaktır.

Yürüeyebilen Duchenne'li erkek çocuklardan yardımsız 6 dakika boyunca koşmadan yapabildikleri kadar hızlı yürümesi istenir, mesela hastane koridoru boyunca ileri ve geri.

Enjeksiyon öncesi farklı günlerdeki ortalama yürüme mesafesi *ortalama 6MWT temelidir*. 10 yaşında bir erkek çocuk 6 dakikada yaklaşık 300-400 metre yürür. Denemeler sırasında farklı zamanlarda mesela her 6 haftada bir, test tekrar edilir ve genellikle ilerleyici kas zayıflamasına bağlı yürüme mesafesinin düştüğü görülür. Farklı zamanlarda metredeki düşüş kas fonksiyonundaki düşüşü ve böylece hastalığın ilerleyişini gösteren diğrama çizilir. Çok sayıda hastada kombine sonuçları göstermek için, gruptaki ortalama 6MWT farklı dozlar ve plasebo grubunun sonuçlardan elde edilen eğrinin başladığı yer sıfır olarak ayarlanır. Eğrideki noktalar farklı zamanlarda bir gruptaki tüm erkek çocukların ortalama değişimini gösterir.

Böyle bir grafik sunumun amacı klinik denemede tedavi istenen etkiyi gösterdi mi göstermedi mi belirlemek ve görülebilir yapmaktır. Ama bunu herhangi bir "insan" etkisinde olmadan güvenilir ve objektif olarak yapmak için deneme, hastaların üçte biri veya bazen yarısının aktif ilaç almadığı ama mesela süt, şeker gibi ilaç olmayan ve herhangi bir ilaç etkisi olmayan *placebo* denen materyal aldığı anlamına gelen *çift kör* olarak yapılmalıdır. Hastanın ilaç veya placebo alması kararı şansa bağlı yapılır- çocuk randomize bir grupta olur- ne aile veya hasta ne de klinik veya laboratuvar personeli deneme tamamlanmadan ve analiz edilmeden hastanın hangi gruba ait olduğunu bilmez.

Plasebo grubuna ait bilgileri içeren bir grafik sunumunun olduğu ekzon atlamaya ait klinik çalışmalar henüz mevcut değildir. Ekzon 51 atlamaya ait geniş çaptaki faz 3 çalışmasının bitmesi ve yorumlanması gerekmektedir. Bu 2013'ün sonundan önce olmayacaktır.

Öte yandan plasebo grubuna ait bilginin sunulduğu Faz 2b PTC124 olarak da bilinen Ataluren klinik çalışmasına Mart 2010'da ara verildi çünkü belirlenen primer sonuç ölçümü bekleneni karşılamadı. 48 hafta takipli, 2 değişik dozla tedavi ve plasebo grubunun olduğu 174 hastaya ait altı dakika yürüyüş testine verileri Nisan 2010'da açıklandı. Buna dayanarak size klinik bir çalışmanın nasıl sunulacağını açıklayabiliriz.

Plasebo grubundaki erkek çocuklardan 6 dakika yürüme süresi için bir ortalama elde edildi. Düşük dozaj (40mg/kg/hafta Ataluren) alan çocuklardan bu ortalamanın üstüne çıkan sonuçlar elde edilirken, 80mg/kg/hafta şeklinde yüksek doz alan çocukların ortalamaları bu ortalamanın altında kaldı. Plasebo ve yüksek dozda ilaç alanların sonuçları benzerken, düşük dozda 6 dakika boyunca yürünen uzaklıktaki azalma diğer iki gruptaki kadar hızlı değildi. Bu da göstermektedir ki düşük dozda tedavi, tedavi almayan gruba göre bir yılda hastalık ilerleyişini yavaşlatmakta, yüksek doz ise hastalık seyrine etki etmemektedir.

Distrofin genindeki mutasyonlar

2006 yılında Annemieke Aartsma-Rus ve arkadaşlarının yayınlarına göre, bir ya da birden fazla ekzondaki delesyon tüm mutasyonların %72'sini oluşturmaktadır. Bir ya da birden fazla ekzondaki duplikasyon tüm hastaların %7'sini oluşturmaktadır. Küçük delesyonlar ya da bir ya da birden fazla genetik harfin insersiyonu ile olan nokta mutasyonuna sahip grup %20 oranındayken, kalan %1lik kesim bağlantı alanlarında kesilme

ya da genin yapısındaki büyük alanlarından yeniden düzenlenmeden oluşan nadir mutasyonlardan oluşur.

Okuma çerçevesi kuralı

Yazarlara göre hastaların %91'inde okuma çerçevesi kuralı geçerlidir, bu durumda çerçeve dışı mutasyonlar DMD'ye neden olurken, çerçeve içindikiler BMD'ye neden olur. Ayrıca okuma çerçevesi kuralının dışında kalan hastaların çoğunda mRNA yapıları bu kuralı takip edebilir. Öte yandan çoğu durumda genetik analiz yapıldığında mRNA sırası belirlenmez. Ekzon atlama tedavisine başlamadan önce, bu tedavinin doku kültür incelemesi ile çerçeve içindeki mRNA'ya katkıda bulunup bulunmayacağı incelenmelidir.

Ekzon atlamanın uygulanabilirliği

Tüm DMD'li hastalar çok ya da az şekilde benzer klinik semptomlara sahip olmalarına rağmen, büyük distrofin genindeki mutasyonlara bağlı olarak genin değişik bölgeleri etkilenebilir ve hastalığın nedeni çok çeşitli olabilir. Bu yüzden ekzon atlama mutasyona özeldir. Kişiye özel bir terapidir. Her hastanın özel bir antisense oligoya ihtiyacı varken, her antisense oligo değişik mutasyonlara sahip, bir ya da birden fazla ekzon atlama ihtiyacı olan hasta grupları için kullanılabilir.

Annemieke Aartsma-Rus ve arkadaşları, Leiden Duchenne Musküler Distrofi sayfalarında delesyonu olan, nokta mutasyonları olan ve duplikasyonları belirlenen hastalarda bir ya da daha fazla ekzon atlamanın uygun olduğu durumları listelemiştir. Yazarlar, tüm Duchenne'li hastaların %83'nin ekzon atlama ile tedavi edilme olasılığına sahip olduklarını bulmuşlardır. Geri kalan %17, ekzon atlama ile tedavi edilmesi mümkün olmayan grubu oluşturmaktadır. Fakat bu geri kalan kısım hala mutasyona özel olmayan ve tüm hastalara uygun olan farmakolojik veya diğer tedavi seçeneklerinden faydalanabilirler.

130 hasta grubu listesinin ilk 11'ini oluşturan aşağıdaki gruplar arasında ekzon atlama ilaçlarının gelecek yıllarda GSK Prosensa ve Sarepta tarafından geliştirilecektir.

| Sıra | Atlanacak ekzon | Hastaların yüzdesi |
|------|-----------------|--------------------|
| 1 | 51 51 51 | 13.0 |
| 2 | 45 45 45 | 8.1 |
| 3 | 53 53 53 | 7.7 |
| 4 | 44 44 | 6.2 |
| 5 | 46 | 4.3 |
| 6 | 52 52 | 4.1 |
| 7 | 50 50 | 4.0 |
| 8 | 43 | 3.8 |
| 9 | 6+7 | 3.0 |
| 10 | 8 | 2.3 |
| 11 | 55 55 | 2.0 |

Kırmızı: Prosensa/GSK'nın öncelik listesinde %41.1

Mavi: Sarepta'nın öncelik listesinde %32.8

Listede gösterildiği gibi tüm hastaların %13'ünün 51. ekzonda atlamaya ihtiyacı vardır. 51 antisense oligo ilacı tüm DMD'li hastaların büyük bir grubu için potansiyel atlama ilacıdır. Bu nedenle ilk tamamlanan ve hala devam eden ekzon atlama çalışmaları bu büyük grup hastaya bir an önce yardım etmeyi amaçlamaktadır.

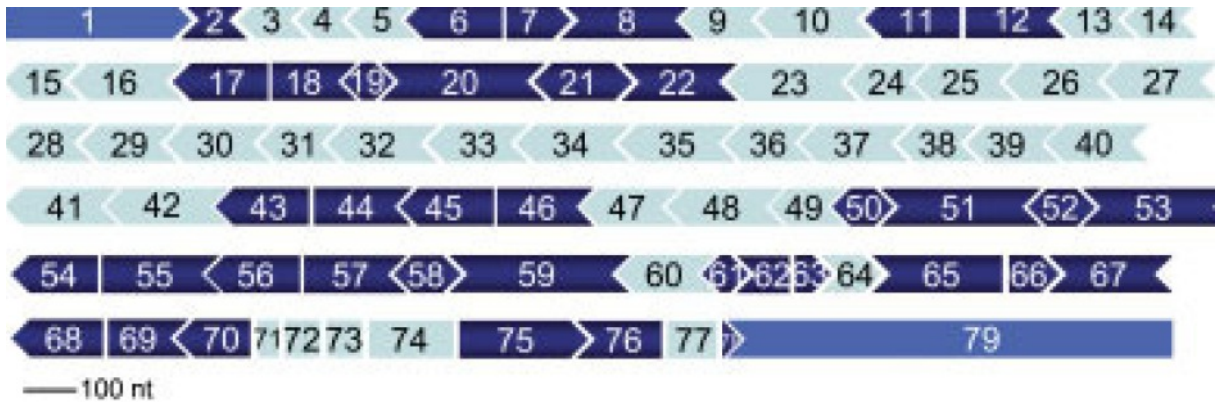
Ekzon atlama ile çocuğum için tedavi olacak mı?

Dünyanın birçok yerinden birçok DMD'li çocuğu olan aile bu soruyu sormaktadır. Bunun için size kendi başınıza potansiyel ekzon atlama ilacınızı nasıl bulacağınızı anlatacağız.

Fakat ekzon atlama, mutasyona özel bir teknik olduğu için ilk adım çocuğunuzun distrofin genindeki mutasyonu net olarak bilmektir. Mutasyon, en iyi şekilde modern genetik laboratuvarlarda MLPA metodu ile (multiplex ligasyon dependent probe amplification) ile

DMD'li çocuğun, annesinin ve diğer kadın akrabaların 79 ekzonunun incelenmesini içerir. Mutasyonun tam olarak bilinmesi ile- genelde delesyon, duplikasyon ya da nokta mutasyonu- siz kendiniz normal distrofin proteinine ait 3685 amino asidin bilgilerini içeren distrofinin mRNA'sına ait 79 ekzondan oluşan 11040 adet genetik harfin sıralamasını inceleyebilirsiniz. İnternetten, Leiden Musküler Distrofi sayfalarına ait www.dmd.nl/seqs/murefDMD.html adresinden sıralamayı içeren 15 sayfayı indirebilirsiniz. Bu sıralamadan çocuğunuzun mutasyonu değişebilir mi ya da mutasyon sonrasında okuma çerçevesi kalır mı ve bu genetik bilgiyle çocuğunuzun DMD ya da BMD mi sorularının sonucu tahmin edilebilir. Ekzonların uçlarındaki dizilimlere bakarak, çerçeve dışı okuma çerçevesinden tekrar çerçeve içi hale getirmek için geri getirmek için hangi ekzon ya da ekzonların atlanması gerektiğini belirleyebilirsiniz.

Eğer distrofin genindeki mutasyon biliniyorsa atlanması gereken ekzon veya ekzonları belirlemenin kolay bir yolu vardır. Annemieke Aartsma Rus'tan aldığımız resimde mRNA'daki 79 ekzonun düzeni görülebilir.



Hangi ekzonun atlanacağını bulmak için, silinmiş ekzon ya da ekzonları çıkarın ve delesyon öncesi ve sonrasındaki atlanarak çıkarılacak ekzonları görün, böylece silinmiş ve atlanmış ekzonların sağ tarafındaki ucu, eksik olanlardan sonra başlayan sol taraftaki uca uysun.

Örneğin, 45-52 arasındaki 8 ekzonun silinmiş olması durumunda 44 ve 53 ekzonlarının birleştirilmesi durumunda eşleşme olmayacaktır. Fakat 53 ekzonunun atlanması ile 44 ün sonu ve 54 başının birbiriyle eşleşmesi mümkün olduğundan normal bir eşleşme meydana

gelecektir. Hemen ardından fark edeceksiniz ki, 44-50 ekzonlarının delesyonunda 43 ve 51 ekzonları atlanarak 42 ve 52 birbirine denk gelerek tamir edilebilir. 44. ekzonun delesyonu eşleşmeyen ekzon uçlarına sahip olduğu için kaymış okuma çerçevesi anlamına gelir ve DMD'ye yol açarken, 48-51 arasındaki bir delesyon okuma çerçevesinde kayma yapmaz ve eşleşme yapan ekzonlar bulunmaktadır ki bu da BMD demektir. Bu süreç duplikasyon ve nokta mutasyonları için de geçerlidir.

Bu resim göreceli olarak ekzonların büyüklüğünü gösterir, sol alttaki çizgi 100 nükleotid demektir ve genetik harflerin genişliğini belirtmektedir. Çerçevdeki açık mavi ekzonlar, silindiğini ya da atlanması gerektiğini işaret ederken, nokta mutasyonları varsa bu durum okuma çerçevesini değiştirmeyecektir. Çerçeve dışında olan koyu mavi ekzonlardır, bu ekzonlardaki delesyonda bir ya da daha fazla komşu ekzonun atlanarak kalan uçların eşleşmesi sağlanabilir

Örnek olarak, delesyon listesinden 10 adet örnek aşağıda gösterilmektedir:

| Silinmiş Ekzonlar | Atlanacak Ekzon(lar) |
|-------------------|----------------------|
| 40 – 43 | 44 |
| 43 – 45 | 46 |
| 43 – 50 | 51 |
| 43 – 52 | 53 |
| 44 | 43 or 45 |
| 44 – 50 | 43+51 |
| 46 – 47 | 45 |
| 46 – 52 | 45+53 or 53+54 |
| 48 – 50 | 51 |
| 51 – 53 | 50 |

Çocuğunuzun distrofin genindeki mutasyonu net olarak biliyorsanız, mRNA'sında hangi ekzon ya da ekzonların atlanacağını bulduysanız, bu kişiye özel ekzon atlama ilacı ile çocuğunuzun tedavisi durumunda ciddi Duchenne semptomlarının daha hafif Becker semptomlarına dönüşmesinin garantisiz olmayacağını bilmelisiniz. Doğru şekilde

tanımladığınız uygun ekson atlama ile mRNA'nın genetik mesajı okuma çerçevesinin içine geçerek değişecektir. Çerçeve içindeki genetik mesajın her durumda Becker distrofin seviyesi yaratacağını söylemek doğru değildir çünkü okuma çerçevesi kuralı bir çok istisna içerir.

Bu istisnaların nedenleri her durum için tamamen anlaşılmış değildir. Örneğin, distrofin genindeki delesyonların sınırları çoğu durumda ekzonların sınırları ile aynı değildir ve genellikle ekzonlar arasındaki geniş intronlar arasında uzanır. Bu delesyon sınırları normalde alışıldık genetik yöntemlerle belirlenemez ve aynı delesyonu olan hastalarda farklı olabilirler. Genlerin düzenlenmesinde önemli olan sıralamaları içeren intronların varlıkları ya da yoklukları durumunda farklı hastalık semptomları görülebilir. Öte yandan distrofin geni farklı bir yapıya sahiptir. Ekzon atlamaya izin veren bazı delesyonlar, bazı durumlarda normal ya da daha az fonksiyon göstermeye neden olacak kısa distrofini üretmek için yeterli olmaz.

Bu nedenle, ekzon atlama birçok vakada distrofinik semptomları azaltan protein üretimine neden olmasına rağmen, klinik çalışmalar ve gerçek tedavi sırasında beklenmedik sürprizler olabilir.

Önceden de belirttiğimiz üzere, mutasyonu olan Duchenne'li tüm çocukların %17'si ekzon atlama ile tedavi edilemezler. Örneğin, ilk ya da son ekzon silindiğinde, mutasyonlar proteinin sisteinden zengin kısmına ihtiyacın olduğu 64-70 ekzonlar arasındaysa, delesyonlar çok geniş ve aktin bağlayan ya da proteinin merkezindeki önemli bir bölümünü içeriyorsa, genetik mesajın kontrol edilemez şekilde karıştığı geniş tekrarların olduğu inversiyonlar ve sıralamada translokasyonlar gibi durumlarda geçerlidir.

Ne tür klinik çalışmalar yapılmalıdır?

Amerika Birleşik Devletlerinde, FDA, Londra da EMA, ve diğer düzenleme kuruluşlarına göre bir ilacın normal geliştirilmesi süreci şu aşamaları takip etmelidir:

- Laboratuvar ve hayvan çalışmalarını içeren, muhtemel ilacın güvenilirliğini, biyolojik aktivitesini ve hastaya verilecek en iyi yöntemi değerlendiren, klinik öncesi faz,
- İnsanlardaki güvenilirliğine karar veren 20-100 sağlıklı gönüllü üzerinde denenen klinik faz 1,

- Optimal dozu, güvenlik ve etkisini inceleyen 100-500 hastada denenen klinik faz 2,
- 1000-5000 hastada uzun süre kullanımda ilacın etkinlik ve güvenilirliğini inceleyen klinik faz 3.

Araştırma amaçlı bu 3 klinik faza ait denemelerin tutarı bir ilaç için 500 milyon dolar olabileceği gibi, fikrin oluşmasından ilacın pazarlama onayı alması 15 yıl kadar sürebilir.

Ekzon atlama gibi hastaya özel tipte araştırma yaklaşımları henüz yapılmamışken, düzenleyici kurallar konulmuştur. Bu süreçler boyunca kişiye özel Duchenne ilacı elde etmek için üstesinden gelinmesi gereken bazı zorluklar vardır.

Örneğin, antisense oligolarla yapılan faz 1 güvenlik çalışmasında eğer yeteri derecede etkiliyse, sağlıklı gönüllülerde normal distrofin mRNA'sında okuma çerçevesinde kayma gözlenebilirken, Duchenneli gönüllülere verildiğinde ciddi yan etkiler görülebilir. Diğer önemli endişe ise hedeflerden uzaklaşma olabilir. Ekzon atlama sonucunda distrofin geni haricinde etkilenim görülüp ciddi ve bilinmeyen hastalıklar yaratılabilir.

Normal ilaç gelişiminde karşılaşılmayan diğer bir problem ise, distrofin eksikliği nedeniyle hücre membranında yırtıklar ve delikler olması böylece ekzon atlama ilaçlarının hücrelerin sitoplazmalarına ve etki yapacakları yer olan nükleusa geçmeleridir. Bu nedenle, bazı yan etkiler sadece Duchenneli hastalarda görülürken bu hastalığa sahip olmayan bireylerde gözlenmeyebilir.

Bu nedenle sağlıklı gönüllülerle yapılan faz 1 klinik denemeleri potansiyel ekzon atlama ilaçlarıyla yapılamaz.

Klinik çalışmalara katılım

Ekzon atlama tedavisinin tam gelişiminde klinik çalışmalar vazgeçilmez basamaklardır. Ailelerin hasta çocuklarının çalışmalara katılmasını sağlamaya çalışmaları, onların kişisel ilacın onaylanarak pazara sunulması için beklemek yerine daha erken tedaviyi elde etmelerini ummaları açısından anlaşılabilir. Fakat klinik çalışmalar insan deneyleridir ve yanlış

gidebilir. Bu yüzden aileler onam formunu vermeden önceden, çalışma öncesinde klinisyenler tarafından verilen bilgiyi dikkatlice dinlemelidir. Katılımın dezavantajları da bulunabilir. Uzak yerlerden çalışmaya katılmak çok pratik olmayabilir. Çünkü enjeksiyonlar için her hafta merkezlerde olmak ve çok fazla kan örneklerinin alınması yakın yerlerde yaşayanlar için daha kolay uygulanabilir. Ayrıca yakında otursalar bile aileler tüm hayatlarını beklemeye almak zorundadır. Aileler bunun sadece deneme olduğunun farkında olmalıdır. Sonraki etkililik çalışmalarında, çocukları plasebo grubunda bile olabilir. Bu çalışma süresince ona yardımcı olmayabilir ve hatta beklenmeyen yan etkiler görülebilir. Çalışmalar gerçekten zorlayıcı işlerdir.

Öte yandan katılımcıların sahip olduğu potansiyel bir avantajı da vardır: eğer faz 2 veya 3 denemelerinin herhangi bir açıdan etkili olduğu gösterilirse, open label extension halinde çalışmalar plasebo grubunu da dahil ederek tüm çocuklarda devam edebilir ve ülkelerinde ilaç onaylanana kadar çalışma sürecinde en etkili dozu alabilirler.

Kas tamiri hakkında genel bilgi

Duchenne musküler distrofininde içinde olduğu musküler distrofiler, kas dokusunun devamlı hasarı ile, kas dokusu ve fonksiyonun kaybıyla karakterizedir. Çoğu doku gibi kas dokusu da zarar gördüğünde kendini yenileyebilir. Ama diğer dokulardan farklı olarak kaslar tek bir hücreden oluşmazken, tek hücrelerden köken alan lifler birleşirler. Bu farklılaşma sürecinden sonra, kas lifleri artık bölünme ve rejenere olma yeteneğine sahip değildirler. Öte yandan tek hücreler, satelit hücreler, kas liflerinin tepesinde bulunur ve kası bölme ve tamir yeteneğine sahiptirler. Kas lifi hasara uğradığında, hasarla ilgili salgılanan faktörler satelit hücreleri aktive eder ve sonrasında bölünme başlar, hasarlı bölgeye taşınır ve kas lifleriyle birleşerek tamir ederler. Ya da çok fazla hasar varsa birleşerek yeni bir lif oluşturur. Yeni bir hasar durumunda kası tamir etmek için bu hücrelerden biri inaktif satelit hücre olur ve yeni ya da tamir edilmiş kas lifinin tepesine yerleşir.

Herkeste dönem dönem kas hasarı olur ama tamir sistemleri, hasarın giderilmesini ve kasın daha güçlü olmasını sağlayarak, gelecekteki hasarları engeller. Duchenne musküler distrofili bireylerde, hastalık nedeniyle kasılma sırasında lifleri stabilize eden zorunlu

proteinlerin kaybı nedeniyle kas lifleri hasara daha hassastır. Bu proteinler distrofin ve distrofinle ilgili proteinlerdir. Bu nedenle Duchenne’li hastalarda kas lifleri sağlıklı kişilere göre daha kolay ve sık hasar görürler. Bu durumda tamir sistemi üzerinde kronik bir stres yaratarak inflamasyona neden olur. Normalde inflamatuvar hücreler kas hasarında etkin bir rol oynarken (hasar gören dokuları yıkarlar, atık atma sistemi gibidir) yeni kas liflerine yer açarlar. Öte yandan hastalığın kronik doğası nedeniyle, süregelen inflamasyon sonucunda fibrozis oluşarak yeni kas hücresi yerine konnektif doku birikir. Bunun nedeni inflamatuvar hücrelerin yaydıkları sinyal peptidlerinin, satelit hücrelerinin kas hücreleri yerine fibroblasta dönüşmesine neden olmasıdır. Fibroblastlar, küçük protein parçalarından oluşan sinyal peptidleri üreterek, fibrozis oluşumu ve devamına katkıda bulunurlar. Kısır döngü sonucunda daha fazla fibrozis oluşur ve kas tamiri daha az olur. Kas hücresi hasara uğramaya devam ettikçe, çoğu kas hücresi fibrotik doku ile yer değiştirerek kas fonksiyonu kaybına neden olur.’

Sonuç olarak ekzon atlama tedavisinin en önemli etkisi stabilizatör protein distrofinin ve distrofin kompleksindeki proteinlerin kas liflerinde tekrar görülmesini sağlamaktır. Bu da fibrotik süreci yavaşlatıp hatta durduracak fakat önceki konnektif doku mevcudiyetine etki edemeyecektir. Buna göre, ekzon atlama Duchenne’li çocukta, fibrozis başlamadan ve çoğu kas lifi hala mevcutken erken yaşlarda başlamalıdır.

Ekzon atlama klinik çalışmaları

Kişiyeye özel genetik ekzon atlama ilaçlarının geliştirilmesi, , insan geninin kendisiyle değil de genetik mesajına müdahale etmek için tasarlanmış yeni türdeki bu ilaçlar yeterli finansal kaynağı olan, teknik etik problemlerin üstesinden gelebilecek şirketlerce yapılmalıdır.

DMD için şimdiye kadar ki en ilerlemiş tedavi tekniğine sahip olan ve ekzon atlama metodunu kullanan 3 büyük grup vardır. Dünya çapında yaklaşık 400.000 hastayla DMD, kistik fibrozisle birlikte çocukluk çağının en sık görülen herediter hastalığıdır. Bu şirketleri kendim tarif etmek yerine, isimlerini ve web adreslerini sizin bakmanız için veriyoruz.

Prosensa Therapeutics BV , Leiden, Hollanda

www.prosensa.com.

GlaxoSmithKline PLC (GSK) merkez Londra

, www.gsk.com, sağ üstteki boşluğa Duchenne yazın ve 'git'e tıklayın.

Sarepta Therapeutics (önceden AVI Biopharma)

Cambridge, MA, USA,

www.sareptatherapeutics.com.

Ekzon 23'lerinde prematüre stop kodon olan distrofik mdx fareleri ve hatta insanlaştırılmış yani normal distrofin geni olan fareler ile laboratuvarlarda kas kültürleri üzerinde antisense oligolarla klinik öncesinde yapılan yıllarca süren çalışmalardan sonra Duchenneli çocuklarda ekzon 51 atlama için ilk dört deneme 2006 yılında başladı. İki çalışma önemli olmayan lokal bir kasın tedavi edildiği ve katılan çocuklara klinik bir fayda sağlamadığı çalışmalardı. Potansiyel ilaç olan sistematik tedavi sağlayan diğer iki çalışmada ise, ekzon 51 antisense oligoları kan dolaşımına enjekte edildi ve tüm kaslara ulaşımı amaçlandı.

Bu dört denemenin ana sorusu bu tedavi ile kas fonksiyonunda gelişme olup olmayacağıydı ve bu potansiyel yeni ilaçlar güvenli mi ve distrofine ait izlerin çıkmasını neden oluyor mu sorularını cevaplamaktı. Tüm bunların sonunda eğer işe yararlarsa çocuklara uzun yıllar boyunca verilerek hayatlarını uzatması umut ediliyordu ve bir yandan da önemli yan etkileri olmaması gerekiyordu. Tüm bunlarla bu ilaçların sadece distrofin geninin genetik mesajını tamir etmesi ve insana ait 20.000'den fazla diğer gene etki etmemesi gerekiyordu.

Hollanda'da yapılan yerel open label faz 2 ekzon 51 atlama çalışması

Ekzon atlama tekniği ile insanda yapılan ilk deneme Judith van Deutekom, Jan Verschuuren ve Prosensa Therapeutics ve Leiden Üniversitesi Medical Merkezi'nde 2006 Ocak ve 2007 Mart ayında yapıldı. Bu çalışma kanıt sağlanması için tasarlandı. Tibialis anterior kasındaki küçük alanda ekzon 51 e karşı 2'O-metil antisense oligo- PRO051 ile lokal olarak yapıldı.

10-13 yaşları arasındaki plasebo olmayan 4 ambule olmayan çocukla yapılan bu çalışmada 50,52,48-50 ya da 49-50 ekzonlarında delesyon vardı. Her çocukta 0.8 mg PRO051 direk olarak kasına enjekte edildi. 4 hafta sonra enjeksiyon bölgesinden alınan biyopsiyle yeni distrofin genine ait atlanan mRNA test edildi. %94'e kadar elde edilen kas liflerinden alınan biyopsi örneklerinde sağlıklı dokuya göre %33, %35, %17 ve %25 oranında yeni

distrofin gözlendi. mRNA'lar izole edildi ve genetik harflerin oluşturduğu bazlara ait sıralamada silinmiş ekzonlar ve atlanmış ekzon 51 normal sıradan çıkmıştı. Bu da ekzon atlamanın insan kasında hedeflenen ekzonu atlayabildiğini kanıtladı. Ekzon atlama tekniğinin Duchenne'li çocuklarda ilk uygulamasına dair yayın 27 Aralık 2007'de New England Journal of Medicine'de basıldı (6).

İsveç ve Belçika'da Duchenne'li çocuklarda ekzon 51'i atlama amaçlı yapılan sistemik faz 2a denemesi

Bu tekniğin tamamen gelişmesi için yapılan ileri adımlarda, bilim adamları antisense oligo PRO051'in kan dolaşımına sistemik katılım için enjeksiyonla uygulanabileceğini ve böylece tüm kas hücrelerine erişip tedavi edeceğini göstermek zorundaydılar. Temmuz 2008 ve Ocak 2009 arasında Prosensa 5-13 yaş arasında 12 DMD'li çocukla ilk sistemik klinik çalışmayı deri altına PRO051'i enjekte ederek yaptı. Enjeksiyonlar Belçika'daki Leuven Üniversitesi'nin Pediatrik Nöroloji bölümünden Nathalie Goemans'ın takımı ve İsveç'te Gothenburg'daki Queen Silvia Çocuk Hastanesi'den Mar Tulinus'un ekipleri tarafından yapıldı. Bu açık uçlu (open label) doz yükseltme çalışmasında, çocuklar 51 antisense oligoları bir haftadan beş haftaya 0.5,2,4 ve 6 mg/kg şeklinde aldılar. Bu çalışma sonraki bölümde bahsedilecek olan devam (open extension) bir çalışma ile takip edilmektedir. Tedavi öncesi ve sonrasında ilk ve ikinci gruptan yüksek dozajla tedavi edilen gruptan ise yeni oluşan distrofinin korunduğuna bakmak için yedi hafta sonra kas biyopsileri alındı. Tüm biyopsi örneklerinde lokal çalışma için tanımlanan mRNA yapıları ve yeni distrofin gözlemi yapıldı. Bu da ekzon atlama antisense oligo ile hedeflenen ekzonların atlanıp beklendiği üzere normalinden daha hafif ve küçük yeni distrofin gözlendi.

Çalışmanın sonlanmasından 2 hafta sonra kas liflerinin %56-100'ünde en yüksek iki dozajı alan 2 çocukta yeni distrofin en fazla oranda gözlendi. İlacın uygulandığı kısa süre yüzünen kas fonksiyonunda iyileşme beklenmedi. Fakat bu deneme gösterdi ki, ilk defa deri altına uygulanan PRO051, ekzon 51'in atlanmasını ve yeni distrofin üretimini dozla ilişkili olarak sağladı. Bu demektir ki, en yüksek doz en fazla miktarda distrofini oluşturdu. Duchenne'de ekzon atlama ilaçları ile olan ilk sistemik deneme en önemli soruyu cevaplamak için planlandı: Bu genetik tedavi güvenli mi? Tüm vücudun dahil olduğu bu

tedavi iyi tolere edildi, yeni proteine immün bir reaksiyon oluşmadı ve 12 çocukta klinik olarak önemli bir problem gözlenmedi. Tüm detaylar, New England Journal of Medicine’de Mart 2001’de yayınlandı (7).

Ekzon 51 atlama için morpholino antisense oligo ile ilk klinik çalışmalar

Prosensa ve GSK tarafından yapılan bu çalışmaları tanımlamaya başlamadan önce, Prosensa’ın yaptığına benzer olan ama başka bir çeşit Seattle-Bothell’de önceleri AVI BioPharma olarak bilinen ama artık Sarepta Therapeutics adı altında çalışan şirket tarafından geliştirilen antisense ilacı, morpholinoları kullanan iki ekzon atlama çalışmasını ve extension çalışmasını özetleyeceğiz. Bu iki çalışma Amerika’da değil Birleşik Krallık’ta yapıldı. Çünkü FDA’ya göre EMA’dan başlama izni almak daha kolay ve hızlıydı. Morpholino 51 antisense oligo ile olan ilk yerel deneme Birleşik Krallık’ta yapıldı. Faz 2a ekzon atlama denemesi 2007 sonbaharı ile 2008 sonuna kadar Kate Bushby yönetiminde TREAT-NMD ve Londra’daki Imperial College’dan Francesco Muntoni ile yapıldı. Deneme öncesi deneylerde, Steve Wilton tarafından Perth (Avustralya’da) geliştirilen Londra’da Dominic Wells tarafından tanıtılan morpholino antisense oligonun, AVI-4658; uzun süreli tedavi süresince etkili şekilde stabil olduğu gösterildi. Bu çalışma ayaktaki küçük ve çok fazla önemli olmayan ekstansör digitorum brevis kasına yapılan bir seferlik enjeksiyon sonrasındaki morpholinonun ekzon 51 atlama açısından güvenilirlik ve biyokimyasal etkinliğini değerlendirmek amaçlı yapılan lokal bir çalışmadır.

7 adet 11-16 yaşları arasındaki bazıları ambule olmayan Duchenne’li çocuk çalışmaya katıldı. Yedi hastanın her biri için tedavi öncesinde kas biyopsisi ile kas liflerinin %5’inden azının ters mutasyon gösterdiği belirlendi. Çoğu Duchenne’li çocukta değişik düşük miktarlarda distrofin pozitif kas lifleri bulunabilir. Bu durum spontan ekzon atlama ile ortaya çıkmaktadır. Kas örneklerini inceleyen araştırmacıların örneklerinin kontrol grubu ya da tedavi grubundan gelip gelmediğinin bilinmediği bu çalışma tek taraflı kördü. 2 çocuk 0.09mg morpholino alırken, diğer 5 çocuk on kat daha fazla olan 0.9 mg doz aldı. Enjeksiyonlar sonrasında 3-4 hafta içerisinde EDB kasının neredeyse tamamı çıkarıldı. Yüksek doz, tüm tedavi edilen kaslarda distrofin üretimini sağlıklı bireylerin kaslarındaki yoğunluğun %22-32

oranında arttırırken, ters mutasyon gösteren kastaki önceki distrofin kontrol grubunda diğer ayaktakine göre %11-21 daha fazlaydı. Ek testlerde anlaşıldı ki elde edilen distrofin, Becker tipi kısa distrofinden moleküler olarak daha hafifti. Düşük doz ilaç alanlarda ise, ekzon atlamaya dair mRNA tespit edilirken, distrofin proteininde bir artış gözlenmedi, çünkü testler çok küçük protein farklılıklarını tespit etmek için hassas değillerdi. Bu in vivo çalışma sonucunda AVI-4658 antisense ilacının ekzon 51 atlamayı sağladığı ve yeni üretilen distrofinin kas membranı içerisinde yerine yerleştiği ve doğru şekilde distroglikoprotein kompleksinde yer aldığı gösterildi. Bu tedavi sonucunda hiçbir sistemik ya da lokal yan etkiler ya da distrofine karşı hiçbir immün cevap reaksiyon gözlenmedi. Tüm bu lokal uygulamalar ile katılan çocuklarda terapatik bir etki beklenmedi. Hem Hollanda, hem de İngiltere çalışmalarındaki amaç ekzon atlamanın insanlarda gösterimiydi ve her iki çalışmada bunu kanıtladı. Bazı teknik farklılıklar yüzünden bu iki çalışmanın sonuçları tamamen karşılaştırılmaz. Bu yerel çalışmanın detayları 2009'da The Lancet Neurology'de basıldı (8).

Birleşik Krallık'ta morpholino 51 antisense ilacı ile yapılan ilk sistemik çalışma

Kate Bushby ve Francesco Muntoni yönetiminde Londra ve Newcastle Upon Tyne'da 2009 yılı boyunca yürütülen faz 2 open label çalışmasında, 6-13 yaşlarında ekzon 51 atlamaya uygun 19 ambulasyonu olan hasta alındı. 0.5-20 mg/kg AVI-4658 antisense oligo 12 hafta intravenöz olarak hastalarda uygulandı. Amaçları, güvenlik ve tolerasyonken kas fonksiyonu ve gücü değildi. Tedavi öncesi ve sonrasında her çocuktan biceps kasından 2 biyopsi, tedavi sonrasında distrofinde değişim olup olmadığı gözlemlendi. 2-20 mg/kg yüksek dozda ilaç alan 7 hastada, yeni distrofin normal miktarın %9-16 oranında ters mutasyon gösteren kaslarda gözlemlendi. 20mg/kg alan 4 hastanın üçünde %21, %15 ve %55 distrofin gözlemlendi. Ayrıca Duchenne'li hastalarda distrofinle ilişkili bazı proteinler (distrofinle birlikte olmayan) tedavi sonrasında kas hücre membranında doğru yerlerde gözlemlendi. Çalışma süresince ilaçla ilgili bir yan etki görülmedi. Kas performansında değişimi sağlayacak kadar uzun bir çalışma olmadığı için kas fonksiyonunda değişim beklenmedi.

Sonuç olarak yazarlar, AVI-4658'in güvenilir bir tedavi olduğunu ve sistematik olarak uygulanabilirliğinin kanıtlandığını ve DMD için ekzon 51 atlama açısından potansiyel bir ilaç olduğu sonucuna vardılar (9).

Sarepta'nın morpholino 51 antisense oligo, NCT01396239 için extension çalışması

4658-US -201 olarak anılan bu çalışma Sarepta tarafından önceki sistemik çalışmaların devamı olarak yapılan, fakat 30 ve 50 mg/kg olarak daha yüksek dozda Eteplirsen verilen ve 24 hafta boyunca devam eden tedavi ve plasebo grubunun olduğu çalışma sonunda yapılacak biyopsilerle yeni distrofinin araştırılacağı çift taraflı kör bir çalışmadır. Çalışmanın sonuçları ve organizasyonuna ait özetlediğimiz bilgiler, en son 7 Aralık 2012'de Sarepta tarafından açıklandı (10). Columbus, Ohio'da Nationwide Children Hastanesi'nde Jerry Mendel yönetimindeki çalışma 2012 Şubat ayında başladı. İlk 24 hafta , 3 gruba ayrılan 12 Duchenne'li çocuk intravenöz olarak; 4 kişi 30 mg/kg, 4 kişi 50 mg/kg olarak ilaç alan ve 4 kişi plasebo grubuydu. İlk enjeksiyon öncesinde distrofini gözlemlemek için ve 50 mg/kg dozu için 12.hafta ve 30 mg/kg dozu için 24.hafta ve 48 hafta sonunda üçüncü biyopsiler yapıldı. Klinik semptomların bu tedaviyle düzeliş düzelmediğine karar vermek için, çeşitli kas testleri yapıldı. 30 ve 50 mg/kg /hafta dozlarında çift taraflı kör bu çalışmanın sonunda, en önemli test olan altı dakika yürüyüş testi 12. ve 24. haftalarda önemli bir değişim göstermedi. 24. hafta sonunda çalışma zaman limiti kaldırılarak open label extension olarak 4658-US-202 adı altında devam etti. Kas fonksiyonundaki gelişme altı dakika yürüyüş testi ile değerlendirildi. Plasebo grubundaki iki hasta, 50 mg/kg doz ilaç alan gruba eklenirken, diğer ikisi de 30 mg/kg alan gruba eklendi. Bu arada 30 mg/kg grubundaki 2 çocuk ambulasyon yeteneğini kaybettikleri için altı dakika yürüyüş testini yapamadılar. Bu yüzden şu an olan 4 grupta: 4 çocuk en başından beri 50 mg/kg/hafta, 4 çocuk en başından beri 30 mg/kg/hafta ve sadece ikisi yürüme testini yapabiliyor, 4 plasebo grubundaki çocuk 24 hafta sonunda 50 ve 30 mg/kg/hafta alan gruplara ayrıldılar. Sonuç olarak sonuçlarda büyük ve önemli farklılıklar yoktu. Bu durum hastalık sürecinde çocuklardaki hastalığın etkisinin çeşitliliği ile ilgili olabilir. Ayrıca 2 çocuğun ambulasyon yeteneğini kaybettiğini de belirtmek gerekir. Biyopsilerle alanın kas dokularındaki distrofine ait pozitif bulgular bu tarz ekzon atlama çalışmasının etkisinin diğer bir işaretidir. Morpholino 51 antisense oligo Eteplirsen, 30 mg/kg/hafta dozunda 24 hafta sonunda %16-29 arasında yeni distrofin gözlenmesini sağladı. 50mg/kg/hafta dozunda olmasına rağmen 12 hafta süren daha kısa süreli tedavi yeni distrofin üretiminde etkili olmadı. Bu çalışma göstermektedir ki yarım

yıldan daha uzun süren tedaviler Eteplirsen'nin anlamlı seviyelerde yeni distrofin üretimi açısından gereklidir. Her iki dozla 48 hafta takip edilen çocuklarda kas liflerinde yeni distrofin normaldekine oranla %5-47 oranında daha azken, plasebo grubunda ilk 24 hafta sadece %38 oranında yeni distrofin gözlemlendi. Eteplirsenin hem 30, hem de 50 mg/kg/hafta toplam 62 haftalık takip sürecinde güvenli olduğu kanıtlandı. Sarepta, FDA ile sonuçları değerlendirdiklerini ve faz 3 çift kör bir çalışmanın 2014 yılında başlamasının hazırlıklarını belirttiler.

Prosensa ve GSK tarafından ekzon 51 atlama klinik çalışmaları

Bu raporun yazımı esnasında ekzon 51 atlamaya ait ilk 4 klinik çalışma sonuçları basılmıştı. Ekzon 51 atlamaya ait ek çalışmalar ise sürmektedir. GSK, artık Drisapersen ve GSK2402968 adını alan Prosensa'nın 51-antisense oligo PRO051'sunu uygulamaktadır. Her bir çalışma DMD ile başlayan bir GSK numarasına sahipken, "clinicaltrials.gov identifier" isimleri ise NCT ile başlamaktadır. US Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından detaylar sıkça yenilenmekte ve internette yayınlanmaktadır. Belirli bir çalışma hakkında bilgi almak için www.clinicaltrials.gov adresine gidin, 'search for study' boşluğunda numara yerine NCT numarasını girin ve 'search' e ve sonrasında da çalışmanın başlığına tıklayın.

Prosensa open label extension çalışması PRO051-02. Prosensa'nın tek başına gerçekleştirdiği sayfa 12'de de anlatılan bir yerel ve diğeri sistemik iki açık 51-deneyinden sonra, sistemik çalışmaya dahil edilen 12 çocuğun tamamı 3 yıldan uzun bir süredir devam eden bir uzatma çalışmasında subkutanöz olarak Drisapersen'in en yüksek dozunu (6 mg/kg/hafta) almaktadırlar. Henüz herhangi ciddi bir güvenlik endişesi oluşmamıştır.

Haziran 2012'de Amerika, PPMD, Fort-Lauderdale, Florida'daki Parent Project Muscular Dystrophy'nin yıllık toplantısında, 96 haftadan (22 ay) sonra 6-dakika yürüme testinin ilk ön sonuçları rapor edildi. Bu sırada, 7 çocuk yürüme mesafelerini korudular veya geliştirdiler. Extension çalışmasının başlangıcında 6-dakika yürüme testini tamamlayabilen 10 çocuktan ikisi yürüme yeteneğini kaybetmiştir. Bu iki çocuk, deneye alındıklarında bağımsız yürümenin çoktan sonlarında olan çocuklar idi. Bu da, çalışmanın başlangıcında daha iyi

performans gösteren çocukların çalışmadan en çok fayda gören çocuklar olduğu anlamına gelmektedir.

Bu, ekzon atlamanın uzun süreli pozitif etkinliğini gösteren bir işarettir, ancak sonuçlar dikkatlice yorumlanmalıdır. Çünkü tüm çocuklar tedavi edilmiştir ve hiçbirisi plasebo almamıştır, bu yüzden hastalığın normal seyri ile bir karşılaştırma yapılması mümkün değildir.

Faz-III ekzon-51 GSK deneyi DMD 114044.NCT 01254019. Bu pivot, karar verdirici çalışma; Duchenne'li çocuklarda 6 dakika yürüme testi ile ölçülen, hastalığın progresyon hızının ekzon 51 atlaması ile azaldığını kesin olarak kanıtlamak amacıyla yapılan bir çift-kör faz III çalışmasıdır. Böylece, Drisapersen olarak adlandırılan 2'O-methyl tipinin 51-antisense oligosu, Amerika'da FDA ve Avrupa'da EMA gibi düzenleyici ajanslar tarafından satış için onaylanmış olacaktır. Bu geniş deney 21 ülkede 45 klinik merkezde gerçekleştirilmektedir: Arjantin, Belçika, Brezilya, Kanada, Şili, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Fransa, Almanya, Bulgaristan, İtalya, Japonya, Güney Kore, Hollanda, Norveç, Polonya, Rusya, Sırbistan, İspanya, Tayvan ve Türkiye.

Amerika, FDA'nın farklı şartları nedeniyle bu listede yer almamaktadır. Bu yüzden, aşağıda iki farklı dozaj kullanılarak gerçekleştirilen benzer bir çalışma tanımlanmıştır.

Faz III deneyinin ilaç enjeksiyonu Aralık 2010'da başlamıştır, son çocuklar 2012'nin üçüncü çeyreğinde dahil edilmiştir. Bu yüzden deney, son çocuklarda 1 yıllık tedavilerini aldıktan sonra, 2013'ün sonlarında tamamlanacaktır. Çalışma sonuçlarının 2014'de açıklanması beklenmektedir. Daha sonra uygun ilk tıbbi konferansta sunulacak ve önemli bir bilimsel dergide yayınlanacaktır.

Bu pivot çalışmaya, en az 5 yaşında olan ve çalışmaya alınmadan en az 6 ay öncesinde steroid almış olan 186 Duchenne'li çocuk dahil edilmiştir. Çocuklar 48 hafta boyunca, subkutanöz enjeksiyon yoluyla her hafta 6mg/kg ilaç yada plasebo almışlardır.

Çalışmaya en az 180 çocuğun dahil edilmesinin nedeni, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğundan emin olmaktır. Bunun için çalışma, tedavi edilen ve plasebo alan çocuklar arasındaki en az 30 metre yürüme mesafesi farkını gösterebilir özellikle olacaktır.

Temel sonuç ölçümü, kas fonksiyonlarındaki farkları tespit etmek için yapılan ve diğer birçok ekzon atlama çalışmalarında da kullanılan 6-dakika yürüme testidir. Kas kuvvet testi ve solunum performans testleri gibi diğer testler de yapılmaktadır. Tedavinin sonunda yeni kısalmış distrofinleri tespit etmek için kas biyopsisi yapılacaktır ve güvenliği değerlendirmek amacıyla deney boyunca klinik analiz için kan örneği alınmaktadır. Anketler doldurularak yaşam kalitesinde meydana gelen değişiklikler takip edilmektedir.

Tedavi edilen hastaların kaslarında yeni kısalmış distrofinlerin varlığı, ilacın gerçekten işe yaradığını, etkinliğini kanıtlamak için yeterli değildir. Distrofin orada bulunabilir fakat normal yerinde yer almayabilir ve böylece kasların daha stabil veya daha iyi fonksiyon gösterir olmasını sağlayamayabilir. 6 dakika yürüme testi gelişen fonksiyonu kanıtlamak için en iyi yöntemdir çünkü eğer tedavi edilen çocuklar 6 dakikada plasebo alan çocuklardan daha uzun mesafe yürüyebilirlerse ilaç pozitif etkiye sahiptir. 6 dakika yürüme testi FDA ve EMA tarafından, kas hastalıklarında yeni bir ilacın etkinliğini göstermede güvenilir bir kanıt olarak kabul edilmiştir.

(Çevirenlerin notu: Bu çalışma şimdilik kaydı ile durdurulmuştur, zira 6 dakika yürüme testinden yeterli sonuç alınamamıştır).

Open label uzatma çalışması, GSK trial DMD 114349, NCT 01480245. Prosensa tarafından gerçekleştirilen faz II sistemik çalışmasından sonra benzer bir uzatma çalışması, GSK 114044 faz III deneyinde ve gelecek sayfadaki intermittant dozaj ile GSK 114117 deneyinde 48 haftalık enjeksiyonu tamamlayan hastalar için yapılan bir devam çalışmasıdır. Daha önceki deneyde plasebo almış olanlarda dahil olmak üzere tüm hastalar 6mg/kg/hafta dozaj almaktadır. Steroid alımı da kesintisiz olarak devam etmektedir. Bu deney Eylül 2011'de başlamıştır ve Aralık 2014'te tamamlanacaktır..

ABD'de 2 doz ile Faz II deneyi, GSK deneyi DMD 114876. NCT01462292. Bu çalışma uluslararası Faz III çalışmasına benzemektedir, fakat 3 ve 6 mg/kg/hafta olmak üzere 2 doz kullanılmaktadır. Çalışma yalnızca Amerika'da; Sacramento CA, Stanford CA, Gulf Breeze FL, Iowa City IA, Kansas City KS, Baltimore MD, Minneapolis MN, St. Louis MO, New York NY, Durham NC, Cincinnati OH, Columbus OH, Portland OR, Dallas TX'de uygulanmaktadır.

En az 5 yaşında olan ve hala ambule olan 54 hasta katılacaktır. Her hasta 24 hafta boyunca haftada bir kez ya ilacı ya da plaseboyu almakta ve 24 haftalık bir takip süreci olmaktadır. Çalışma aynı zamanda GSK deneyi DMD 114501 uzatma çalışması olarak da adlandırılmaktadır. Enjeksiyonlar Ekim 2011'de başlamıştır ve son çocuk 1 yıllık deneyi 2013'ün sonuna doğru tamamlayacaktır.

Sonuç ölçümleri 6 dakika yürüme testi, biyopsi sonrası distrofin determinantları, güvenliği değerlendiren diğer testler ve ilacın kasa hangi hızda, hangi yolla girdiğini, hangi hızla bozulduğunu ve sonra vücuttan atıldığını ölçen farmakokinetikleri içermektedir. Ek olarak, ekstremiteler, kalp ve diafram kaslarının durumunu kontrol etmek için ve 51-antisense oligonun etkisini detaylıca izlemek için yeni ve pahalı manyetik rezonans görüntüleme (MRI) araştırmaları yapılmaktadır.

İntermittant tedavi periyotları ile ekzon 51 atlama, GSK deneyi DMD 114117, NCT01153932. Bu faz II çalışmasının amacı GSK'nın anti-51 2402968 ilacının intermittant tedavisinin, haftalık doz ile karşılaştırıldığında terapötik etkisine eş değerde daha iyi uzun süreli güvenliği olup olmadığını belirlemektir. Çalışma 9 ülkede 13 klinik merkezde gerçekleştirilmiştir: Avustralya, Belçika, Fransa, Almanya, İsrail, Hollanda, İspanya, Türkiye, İngiltere. Deney Eylül 2010'da başlamıştır ve 2012'nin sonunda tamamlanmıştır.

Çalışmaya en az 5 yaşında olan ve bağımsız yürüyebilen 53 Duchenne'li çocuk katıldı. Çocukların en az 6 ay öncesinde ve sonra deney boyunca steroid kullanıyor olması gerekmekte idi. Çocukların yaklaşık üçte biri 48 hafta boyunca her hafta 6mg/kg ilacı deri altına enjeksiyon yoluyla aldılar. Diğer üçte biri, beş 10-haftalık periyotlar ile tedavi edildi: 1, 3, ve 5. haftalarda haftada 2 doz 6mg/kg; 2, 4, 6. haftalarda haftada 1 doz aldılar ve 7-10. haftalarda tedavi almadılar. Son üçte birlik grup aynı şartlar altında plasebo aldı. Bu yüzden, çalışma çift-kör bir deneydi. Bu araştırma çalışmasında primer son nokta, 24 haftalık tedavinin etkinliği idi.

Deneyin sonuçlarına, kas fonksiyonlarındaki değişiklikleri tekrarlı olarak ölçen 6 dakika yürüme testi, farmakokinetiklerin sonuçları ve bir grup kan ve idrar analizi ile elde edilen güvenlik sonuçları ile karar verildi. Deneyin öncesinde ve sonrasında, atlama

prosedürünün etkisini belirlemek ve yeni ve kısalmış distrofin miktarına karar vermek için kas biyopsisi uygulandı. Sonuçlar tamamen analiz edildikten ve değerlendirildikten sonra yayınlanacaktır.

Tekerlekli sandalyedeki hastalar için ekzon 51 atlama, GSK deneyi DMD114118, NCT01128855. Bu sistemik deneyin amacı, yürüyemeyen ve 9 yaşından büyük olan, en az 1 yıl en fazla 4 yıldır tekerlekli sandalye kullanmak zorunda kalan 20 çocukta ekzon 51 atlamanın tolere edilebilirliğini ve güvenliğini belirlemektir.

Yürüyen çocuklarla yapılan deneylerde güvenlik problemleri gösterilememiş olduğu için, bu çalışmanın temel amacı tekerlekli sandalye kullanan çocuklar için ek güvenlik problemlerinin olmadığından emin olmaktır.

Bu çocuklar yürüyen diğer çocuklara göre daha az aktif olduğu için ve vücut kompozisyonundaki değişiklikler (daha az kas) ilacın kastaki davranışlarını değiştirebileceği ve ilacın vücuttan atılma şekli değişik olabileceği için bu çocuklara gerekli olan doz da daha farklı olacaktır. Bu deneyin sonuçları daha büyük Duchenne'li çocuklar ve gençlerle yapılacak ileriki klinik deneyler için önemli bilgiler sağlayacaktır.

19 katılımcı 8 kişilik 2 gruba ayrıldı; 6 çocuk 3 veya 6 mg/kg tek doz GSK anti-51 ilaç 2402968 subkutanöz enjeksiyonunu aldı. Her gruptaki 2 çocuk plasebo isimli inaktif bir madde aldı ve böylece bu çalışma çift-kör olarak gerçekleştirildi. 3 çocuktan oluşan 3. grupta çocukların iki tanesi 9 mg/kg ve biri plasebo aldı. Enjeksiyondan sonraki birinci ve 4. Hafta geniş klinik testler uygulandı. Ciddi bir yan etkiye rastlanmadı.

Deney Columbus/Ohio'da ve Paris'te gerçekleştirildi. 2010 Temmuz'da başladı ve Şubat 2012'de sonlandırıldı. Sonuçlar, tamamen analiz edildikten sonra yayınlanacaktır.

Ekzon 51 deneyleri ekzon atlamanın etkili olduğunu kanıtlamak zorundadır. Ekzon 51 atlaması için yapılan deneyler, antisense oligoların Duchenne musküler distrofiye karşı onaylanarak Avrupa ve Amerika'da satışının olması için en önemli deneylerdendir. Eğer tüm ekzon 51 çalışmalarının sonuçları, FDA ve EMA gibi iki en önemli düzenleyici ajansı ikna etmeyi başarır, uzun yıllar için hastaların tedavisinde ekzon 51 atlamanın etkili ve güvenli

olduğu anlamına gelir. Aynı zamanda birkaç yıl içinde ciddi bir genetik hastalık için izni alınan ilk genetik ilaç olacaktır.

Fakat ekzon 51 atlama tüm Duchenne'li hastaların ancak % 13'üne yardımcı olabilecektir. Geri kalan, daha az sıklıkta veya nadir mutasyonlar görülen % 70 hasta için 100'den fazla farklı antisense oligolar geliştirilmelidir. Bu süreç ekzon 51 atlama ilacının onaylanması için gerekli prelinik çalışmalar ve klinik deneylerin 3 fazı için milyonlarca Euro ve dolar ile 10 yıldan fazla bir zamana ihtiyaç duymaktadır. Bu süre ve bu harcamalar Duchenne hastalarının büyük çoğunluğu için birçok diğer atlama ilaçlarının üretimi için azaltılmalıdır.

TREAT-NMD, PPMD ve diğer hasta organizasyonları tarafından, ekzon 51 oligonun ve test edilen ikinci bir oligonun etkinliği ve güvenliği geniş çerçevede gösterilirse bireysel oligolar için hızlı bir gelişme yolu için FDA ve EMA ile tartışmalar ve görüşmeler devam etmektedir. Ekzon 44'e karşı olan oligo, ikinci potansiyel ekzon-atlama ilacı olarak seçilmiştir ve tüm hastaların % 6,2'si için bir terapi sağlayacaktır.

51 dışındaki diğer ekzonları atlamak için yapılan klinik çalışmalar

Ekzon 44 atlama için Faz-II klinik deneyi. NCT01037309. Prosensa bu open label çalışmayı PRO044-CLIN-01 ile Leuven, Belçika; Leiden, Hollanda; Gothenburg, İsviçre; ve Ferrara, İtalya'daki 4 klinik merkezde gerçekleştirmektedir. Deney Aralık 2009'da başlamıştır ve 2013'ün ikinci yarısında bitirilecektir.

Her doz grubunda 3 çocuk ile 18 Duchenne'li katılımcı çocuk 5 ile 16 yaşları arasındadır. Bu gruplar, farklı haftalık artan dozlarda 0.5, 1.5, 5, 8, 10, 12 mg/kg'lık subkutanöz enjeksiyonlar almaktadır. Bazı çocuklar 5 hafta boyunca 1.5, 5 ve 12 mg/kg intravenöz enjeksiyonlar ile yeniden ilaç aldılar.

Tedaviden 13 hafta sonra, kas hücrelerinde ne kadar yeni distrofin görüldüğünü belirlemek için biyopsiler gerçekleştirilecektir. Güvenlik, olası yan etkiler ve farmakokinetikler ile diğer testler yapılacaktır.

Eğer bu faz-II çalışmasının sonuçları ekzon 44'ün atlamasının ekzon 51 gibi etkili ve güvenli olduğunu gösterirse, FDA ve EMA bu ekzonlar için ilaçları onaylama konusunda zaman harcamasına neden olan ve pahalı olan faz-III deneyini istemeyebilir.

Diğer ekzonların atlanması. Birçok yayın organında Prosensa ekzon 51 ve 44'ün yanında ekzon 45, 52, 53 ve 55'i içeren 4 ekzon atlaması için prelinik çalışmaların öncelik listelerinde olduğunu ve kısa sürede tamamlanacağını duyurmuştur. Benzer şekilde Sarepta, ekzon 45, 50 ve 53 için deneyler planlamaktadır.

Yenidoğan taraması ve pre-semptomatik hastalar ile klinik deneyler. GSK 2013'de 5 yaşın altındaki hiç klinik işareti olmayan veya çok azına sahip olan Duchenne distrofili çocuklar üzerinde ekzon 51 atlama klinik deneyine başlamayı planlamaktadır. Çünkü ekzon atlama yalnızca hala var olan ve distrofik süreçte çok fazla hasara uğramamış kas fibrillerini tedavi etmektedir. Kaybedilen fibriller yeniden büyüyemezler.

Bu nedenle, bu tedavi 3 yaş civarında hastalığın gözle görülür olduğu dönemden önce yeterli kas dokusu bulunan presemptomatik çocuklarda daha etkili olabilir.

En iyi çözüm doğum sonrası 1 yıl içinde tedaviye başlamaktır. Bu çocukları bulmak için, filtre kağıdında bir damla kanda bulunan önemli derecede artmış kreatin kinaz enzim aktivitesi CK için yenidoğan taraması gereklidir. Yenidoğan bir çocuğun kanında 1000 U/L üzerinde çok yüksek CK aktivitesi muhtemelen Duchenne distrofisine sahip olduğunu ya da limbicirdle distrofilerinden biri gibi başka bir kas hastalığına sahip olduğu anlamına gelir.

Columbus/Ohio'da Jerry Mendell'in grubu tarafından gerçekleştirilen pilot bir yenidoğan tarama programında gösterildiği gibi, yüksek CK aktivitesinin tespit edildiği kan damlasında beyaz kan hücreleri olan lökositlerden elde edilen DNA'da distrofin gen taraması bile mümkün olmaktadır (11).

Bu yalnızca doğumdan hemen sonra Duchenne'li çocukları bulmakla kalmayıp aynı zamanda gen mutasyonlarını da öğrenip ilk bir ay içinde tanı konmasını sağlamaktadır. Kaslarda dejenerasyonun başlamasını muhtemelen önleme özelliği olan etkili bir ekzon atlama terapisi terapisinin hemen başlamasını sağlayabilir. Bu Duchenne'li çocuklar Duchenne musküler distrofi'li olmaya devam etmeyeceklerdir!

Yakın gelecekte, benzer Duchenne tarama programları muhtemelen, birçok ülkede tedavi edilebilen diğer hastalıklar için çoktan kurulmuş olan yenidoğan taramalarına eklenecektir. Avrupa Nöromusküler Merkezi (European Neuromuscular Center), ENMC'nin Duchenne taraması üzerine uluslararası workshopu Amsterdam yakınında Naarden'da 14-16 Aralık 2012'de gerçekleşmiştir ve Prosensa/GSK'nın ekzon 51'i atlamak için ürettiği ilaç Drisapersen'in güvenlik ve etkinliği kesin olarak kanıtlandıktan sonra bu tip erken taramaların kabul edilebilirliğini artıracaktır.

Gen transferi ile ekzon atlama. University of Versailles ve University of Oxford'daki araştırmacılar, Luis Garcia, Aurelie Goyenvalle, Kay Davies ve onların meslektaşları, kas hücrelerinin kendi antisense oligolarını üretmeleri amacıyla ekzon atlama ve gen terapisinin bir kombinasyonu üzerinde çalışmaktadırlar. Araştırmacılar antisense oligoları devamlı üretmek için genetik yapıyı taşıyan tek bir virüs enjeksiyonuna ihtiyaç duymayı umuyorlar, böylece hastaların muhtemel uzamış yaşam süreleri boyunca serbest oligoların tekrarlı enjeksiyonunun yapılmasına gerek kalmayacaktır.

2004'te bilim adamları, RNA antisense dizilerini küçük nuklear RNA ailesinin üyeleri olan, distrofin proteininin sentezi için aktif mRNA üretimini sağlamak için nukleusdaki 79 ekzonu biraraya getiren biyokimyasal makinenin parçası olan **U7-snRNA**'lara (sn= small nuclear) bağlayarak, bu tekniğin gen terapatik parçasını yaratmışlardır. Bu modifiye U7-snRNA'lar vektörler-zararsız adeno ilişkili virüsler-AAV-ile splicing süreci boyunca ekzon atlamayı gerçekleştirmek için çekirdeklerini içine bıraktıkları kas hücrelerinin içine taşınırlar.

Bu yüklü virüsler musküler distrofil farelerin (mdx) ilk olarak tek kasına lokal olarak enjekte edilmiş, daha sonra sistemik olarak kan dolaşımına katılmıştır. Kas hücrelerinde, ekzon 23'ün olağan restorasyonu okuma çerçevesini restore etmiştir. Yeni, fakat bir şekilde kısalmış distrofin, tedavi edilen kas fibrillerinin % 80'inde, hücre membranının altında normal pozisyonunda ve 1 yıldan uzun süre herhangi bir immün reaksiyona neden olmadan stabil kaldığı görülmüştür.

Mdx kaslarındaki distrofik süreç, yani hızlandırılmış dejenerasyon ve rejenerasyon tamamen durdurulmuştur. Sistemik olarak tedavi edilen mdx-farelerde, tedavi edilmeyen mdx-farelerdeki gibi alışılmış kas hasarı görülmemiştir (13).

5 yıl önce, bu U7-gen transfer tekniği, gerçek bir Duchenne'li çocuk gibi hasta olan golden retriever cinsi köpeği tedavi etmek için uygulandı. Bu köpeklerde ekzon 6 ve 8'in atlanarak tedavi edilebileceği, ekzon 7 bölgesinde bir mutasyona sahiptirler. Bir köpeğe-özel ekzon 6 ve 8'e karşı antisense dizileri içeren modifiye U7-snRNA kullanılarak, lokal enjeksiyonlar sonrası birçok kasta ve kısıtlı dolaşım ile bacağı sistemik enjeksiyonlar bölgesel olarak, neredeyse normal seviyelerde kısalmış distrofin elde edilmiştir.

Şimdi, bu denemelerden 5 yıl sonra, bu tedavinin uzun-sürelili sonuçları Adeline Vulin, Aurelie Goyenvalle, Luis Garcia ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (14). Bu zamandan sonra atlanarak elde edilen distrofin tedavi edilen 6 köpekte hala bulunmakta, fakat bu yeni distrofini içeren fibril sayıları yavaşça düşmüştür. Bu düşüşün sebebi bir immün cevaptan değil, muhtemelen insanlardaki Becker musküler distrofideki gibi oluşan ve devam eden distrofik süreçtendir. Asıl neden, muhtemelen kurtulan atlanmış distrofinlerin yalnızca silinen ekzon 7 eksikliğini değil, ekzon 6 ve 8; hatta bilinmeyen nedenlerle ekzon 9 eksikliğini de içermesi fakat, okuma çerçevesini etkilememesindedir. Böylece, kaybolan ekzon 6-9 tarafından üretilen 158 aminoasit, proteinde yer almamaktadır. Bu aminoasitler, kas hücrelerinin içinde proteini stabilize eden (aktin ağını bağlayan) proteinin bir ucundaki aktin-bağlayan temel yapının bir parçasıdır. Bu bağlantı mükemmel olmadığı zaman, hala var olan fakat daha yavaş seyreden kas bozulma sürecine katkı sağlamaktadır.

Yazarlar, bu genetik ekzon-atlamanın, birkaç yıl sonra normal ekzon-atlama enjeksiyonları ile takip eden uzun-sürelili bir terapinin başlangıcında kullanılabileceğini önermektedir.

Bu teknik, gerçekten hasta olmayan mdx farelerde ekzon 23'ü atlamak için 2004'te gösterildikten sonra, araştırmacılar aynı tekniği günümüzde, distrofin veya utrophin içermeyen ve bu yüzden Duchenne'li çocuklar kadar hasta olan double-KO fareler olarak adlandırılan fareler için uygulamaktadırlar (15). Farelerin ekzon 23'lerine karşı U7-snRNA'ya

ekli antisense dizilerini taşıyan AAV virüslerinin tek bir intravenöz enjeksiyonundan sonra, incelenen tüm kaslarda, kalp kası da dahil olmak üzere normal seviyelere yakın distrofin depolandığı görülmüştür. Bu durum kas fonksiyonlarında önemli bir gelişme, yaşam sürelerinde 10 haftadan 1 yıla kadar uzayan kayda değer bir artış ve kas yapısının normalizasyonu ile sonuçlanmıştır.

Bilim adamları günümüzde bu tekniği DMD'li hastalara uygulamak için insan distrofin geninin ekzonlarını atlamaya yönelik spesifik U7snRNA'lar geliştirmektedir (16). Aynı zamanda bilim adamları, tek seferde birçok ekzonun atlanmasına izin vermek için, birden fazla U7snRNA'ların bu modifiye AAV virüsleri ile transfer edilebileceğini göstermiştir.

Bu çalışma, 2015'te Genethon, Institut de Myologie ve Nantes'deki araştırma takımları ile beraber planlanan, hastalar üzerinde klinik uygulamaya önemli bir hazırlık basamağı sunmaktadır.

Multi-ekzon atlama.

Prosensa/GSK ve Sarepta'nın ekzon 44, 45, 50, 51, 52, 53 ve 55'i içeren öncelikli listesinde yer alan 7 atlama gelişmesinden, tüm hastaların % 45,1'in yararlanabilme olasılığı vardır. İki komşu veya ayrı ekzonu atlayan, çift atlama ilaçları üzerinde sadece birkaç çalışma yapılmıştır, fakat hiçbiri henüz klinik deney aşamasında değildir-çünkü tüm Duchenne çalışmaları ve bu üç şirketin geniş finansal harcamaları ilk olarak öncelikli ilaçların geliştirilmesi için yapılmaktadır.

İlaçların güvenli ve etkili olduğu belirlendiğinde ve gecikmeden satışları onaylandığında, daha nadir görülen, daha komplike mutasyonlar için bir seri deney yapılmasına gerek kalmayacağı, daha az zaman ve para harcamasına ihtiyaç duyulacağı ümit edilmektedir.

2'O-metiller ile ekzon 45-55 atlamasının ilk denemeleri. 2007'de, güney Fransa'da Montpellier üniversitesinden Christophe Beroud ve çalışma arkadaşları, ekzon 45-55 arası 11 ekzonun atlamasının; tüm Duchenne'li hastaların % 63'ünde Becker musküler distrofideki

gibi hafif distrofik belirtilerin olduğu veya hiç distrofik belirtilerin olmadığı kısalmış distrofin üretimine neden olacağı tahminlerini yayınlamışlardır (17). Şiddetli engeli olan ve ekzon 45-55 arasında doğal delesyonu olan birçok Becker hastası tanımlanmıştır.

2008'de, Annemieke Aartsma-Rus ve çalışma arkadaşları, sağlıklı bir insanın ve 2 Duchenne'li hastanın distrofin mRNA'sından, bu 11 ekzonun hücre kültüründe çıkartılmasını denedi. Fakat tüm 11 ekzona karşı 2'O-metil oligo kokteylleri, kısmi atlanmış karışımlar üreten veya küçük bir miktar tam atlanmış mRNA'lar üreten düzensiz yapıştırma (splicing) süreçlerine neden olmuştur. Yazarlar, bu tekniğin bu zaman için multi ekzon 45-55 atlamasının klinik gelişimini yeterince desteklemediği sonucuna varmışlardır (18).

Distrofik köpeklerde multiekzon atlama. Bir sonraki adım, iki veya daha fazla ekzonun, bir oligo kokteyli ile atlanmasını denemek idi. 2008/09'da, Washington'dan Eric Hoffman ve Terence Partridge, Tokyo'dan Shin'ichi Takeda ve arkadaşları, distrofik CXMD taşı köpeklerinde multiekzon atlama için 2'O-metil ve morpholino antisense oligo kokteylleri geliştirdiler (19). Hafif distrofik semptomları olan mdx farelerin aksine, bu köpekler Duchenne-benzeri semptomlara sahiptiler.

Bu distrofik köpeklerin, mRNA'dan ekzon 7'nin kaybına ve hemen sonra prematüre stop-kodonlar ile bir okuma çerçevesi değişikliğine neden olan, distrofik genlerinde ekzon 7'nin yapışma alanında bir mutasyonları vardır. İki komşu ekzon 6 ve 8'in atlanması okuma çerçevesini restore edecektir.

2'O-metillerin ve morpholinoların farklı karışımlarının bir miktarı, ekzon 6'ya karşı 2 oligo ve ekzon 8'e karşı bi oligo içeren en etkili karışım bulunana kadar doku kültürlerinde test edilmiştir.

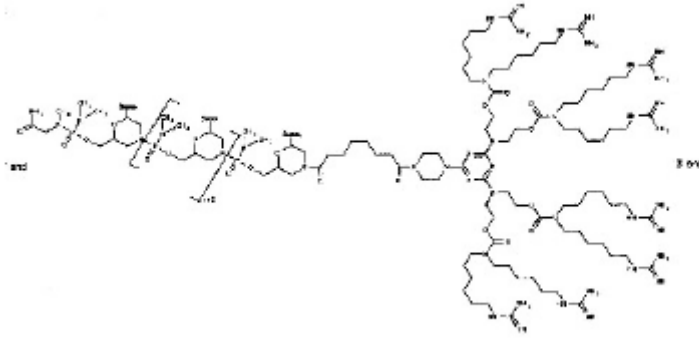
Oligo kokteyllerinin her iki tipi, bir kas içine lokal enjeksiyonlardan sonra, % 80'e varan atlanmış mRNA ve neredeyse normal seviyelerde kısalmış distrofin üretmişlerdir. Fakat, sadece hedeflenen ekzon 6 ve 8 değil, delesyonu okuma çerçevesini bozmayan çerçeve içi bir ekzon olan ekzon 9 da bilinmeyen nedenlerle atlanmıştır.

Tokyo'da gerçekleştirilen sistemik bir tedavi için, 2 aylık 3 köpek; 5, 7 ve 50 hafta boyunca bacak venlerine haftalık olarak 3-morpholino antisense kokteyli enjeksiyonu ile

tedavi edildiler. Test edilen tüm iskelet kaslarında, kalp kası hariç, normal seviyenin % 50'sine varan yeni distrofin bulundu. Önceki gibi, ekzon 9 yine atlandı. Köpeklerin fiziksel durumu, tedavinin başladığı zamandan öncesi gibi stabilize idi.

Bu tedavinin köpeklerin kas dejenerasyonunu durduğu görülmüştür. Bu yüzden, morpholino antisense oligoların insanlara benzeyen vücut yapısına sahip geniş bir memeli grubunda iyi çalıştığı, toksik olmadığı belirlendi.

Vivo-morpholinolar ile ekzon atlama. 2009'da Washington ve Tokyo'daki aynı araştırmacı grupları daha önce Qi Long Lu ve arkadaşları tarafından Kuzay Karolina, Charlotte'daki Carolinas Medical Center'da geliştirilen antisense oligoların farklı bir tipi ile çalışmaya başladılar. Normal bir morpholino oligonun bir sonuna, 8 guanidine grubunun dallı yapısını eklediler.



Bu octo-guanidine morpholino vivo-morpholino olarak adlandırılmaktadır. Yapısı, yüksek bir etkinlikle kalp kası da dahil olmak üzere iskelet kaslarına girmeye izin vermektedir.

Mdx-fareler, prematüre stop sinyali içeren ekzon 23'lerine karşı vivo-morpholinolar ile tedavi edilmiştir. 10 hafta boyunca, sistemik, iki haftada bir yapılan tedavi ile iskelet kaslarının tüm fibrillerinde % 50, kalp kasında % 10 ve kan damarları ve barsakların yumuşak kaslarında yeni distrofin üretildi. Kas fonksiyonları önemli ölçüde gelişti ve herhangi bir yan etki görülmedi (20).

Vivo-morpholinolar ile köpeklerde multiekzon atlama. Mdx farelerin vivo-morpholinolar ile tedavisinin pozitif sonuçlarından sonra araştırmacılar, 3 köpek ekzonunun atlamasını vivo-

morpholinoların bir kokteyli ile tekrarladılar (21). Hafif distrofik semptomlar gösteren 3-5 aylık tazı köpekleri kullanarak 4 farklı vivo-morpholino oligonun 120 mg'lık bir karışımını içeren bir kokteyl solüsyonunun 1 mililitresini 5 farklı kasa enjekte ettiler. Bu 4 farklı vivo-morpholino oligoların 2'si ekzon 6'ya karşı, ikisi de ekzon 8'e karşı yönlendirilmiştir. Enjeksiyondan 2 ve 8 hafta sonra kas biyopsisi yapıldı.

2 hafta sonra kas fibrillerinin % 70'i ve 2 ay sonra % 60'ı yeni distrofin içermekte idi. Antisense oligolar ile yalnızca ekzon 6 ve 8 hedeflense de, erken denemelerde ekon 9'un da atlandığı görülmüştür.

Bunun neden böyle olduğuna ilişkin Annemieke'nin açıklaması şöyledir: 'Neden basittir: intron 7, 110.000 harf uzunlukta, intron 8 ise sadece 1.100 harf uzunluğundadır. Bu yüzden sıklıkla, ekzon 7 ve 8 yapışmadan önce ekzon 8 ve 9 birlikte yapışmaktadır. Bu yüzden ekzon 8'in ekzon 7'ye katılmasını önlerken ekzon 9'u da atlıyorsunuz, çünkü ekzon 9 çoktan ekzon 8'e bağlıdır.'

Toksisite, farmakokinetikler ve biyodağıtım çalışmaları, bu köpek denemelerinden sonra yapılmamıştır. Onlar, Duchenne hastalarında benzer vivo-morpholinolar ile klinik çalışmalar yapılmadan önce gerçekleştirilmelidir.

Vivo-morpholinolar ile mdx52 farelerde multiekzon 45-55 atlama. Vivo-morpholinolar ile köpek çalışmalarından hemen sonra, Tokyo ve Washington'daki aynı araştırmacılar Duchenne hastalarında ekzon 45-55 arasındaki tüm 11 ekzon bloğunu atlamak için hazırlık çalışması başlattılar. Bu çalışma, daha önce açıkladığım gibi tüm hastaların % 63'ü için bir terapi oluşturacaktır (22).

Açıkçası, araştırmacılar Annemieke'nin aynı 2'O-metil oligolar ile multi-atlama denemelerinin hayal kırıklığı yaratan sonuçlarının farkındaydılar. Japon-Amerikan araştırmacılar bu yüzden farklı oligolar arasındaki reaksiyonlardan ve aynı oligonun iki sonu arasındaki reaksiyonlardan kaçınan diziler ile vivo-oligoları seçtiler.

İlk olarak, fareler ile denemeler yapılmak zorunda idi. Fakat bu fareler ekzon 23 atlamasına ihtiyacı olan alışıldık mdx fareler değil, ekzon 52'lerinde delesyon olan özel

yetiştirilmiş mdx fareler idi. Kesintiye uğramış distrofin üretimleri, multiekzon yaklaşımları ile atlanacak olan ekzonların biri olan ekzon 52'nin atlanması ile yeniden başlayacaktır.

Denemeler, bu farelerin myotüpleri üzerinden laboratuvar testleri ile başladı. Ekzon 45-51 arasındaki 10 ekzonun ve ekzon 53'ün (ekzon 52 değil) ESE-ekzonik yapıyı arttırıcılar-dizilerine karşı 10 vivo-oligonun bir karışımı hedeflenen tüm 11 ekzonluk bloğun atlaması için kullanıldı. Ve kısmen atlanmış hiçbir mRNA'ya rastlanmaması şaşırtıcı idi.

Bir sonraki deneyler 45 haftalık mdx52 fareler üzerinde, 10-oligo vivo kokteylin 1,5 microgram (miligramın 1,5 yüz katı)'ının bir ince kasa verilmesi ile yapılmıştır. 2 hafta sonra, genetik kod kelimeleri 10 atlanmış ekzon ve bir delesyona uğramış ekzon (52)'da bulunan aminoasitsiz, doğru şekilde kısaltılmış distrofin, kas fibrillerinin % 70'inde bulunmakta idi. Tekrar, ne mRNA ne de protein gibi kısmen atlanmış ürüne rastlanmadı. Ve distrofin kompleksinin tüm proteinleri, çok da önemli olmayan NOS-nitrik oksit sentezi- hariç normal seviyelerinin % 100'üne geri döndü.

Daha sonra bu fareler sistemik enjeksiyon aldı. Her biri 12 mg/kg'lık 5 tane iki haftalık enjeksiyon yapılarak, iskelet kaslarının % 8-15'lik ve kalp kasının % 2'lik Becker distrofini sonucuna ulaşıldı. Bu tedavi edilen fareler daha iyi kas fonksiyonu ve daha uzun süre kas dayanıklılığı gösterdiler. Kan testlerinde herhangi bir toksisite gözlenmedi ve CK aktivitesi daha azalmıştı.

Ekzon 45-55 olmayan hastalarda hafif Becker distrofisinin nedeni bilinmemektedir. Fakat, bu hastaların distrofinleri bazı ayrılmış aminoasit zincirlerinin bir kısmına sahiptirler. Bu, kas kontraksiyonlarının mekanik stresinden hücre membranını korumada normal fonksiyon göstermesi için bir neden olabilir.

Bu 45-55 atlamasının avantajları. Duchenne hastalarının % 63'ü bu multi-atlamadan yarar görecektir. Sonuçta meydana gelen Becker musküler distrofi, artmış CK aktivitesi ile hafif olabilir veya hiç semptomsuz olabilir. Bu atlama, aynı zamanda daha şiddetli etkilenmiş Becker hastalarını da iyileştirebilir. Bu karışımdan vivo oligoların bir kısmını veya sadece birini kullanarak, bu bölgede bir veya birden fazla ekzon atlamasına ihtiyaç duyan hastalara bir

atlama terapisi olarak önerilebilir. Bir sonraki ve en önemli adım, hastalarla klinik deneylerin başlaması olacaktır.

Annemieke'nin yorumu: 'Multiekzon atlama için birçok seçenek bulunmaktadır: Vivo morpholinolar toksiktir. Bu 11 AO karışımını geliştirmek (vivo morpholinolardan başka bir kimyasal kullanılsa bile) çok maliyetli olacaktır. Güvenlik testlerinin nasıl yapılması gerektiği bilinmemektedir. Eğer bazen sadece karışımın 2 veya 3 oligosunu kullanmak isterseniz, her şeyi birebir test etmeniz gerekecektir, böylece multiple insan için tek bir karışımdan yararlanma şansı olmayacaktır. Eğer bir karışım geliştirmek istiyorsanız, karışımı test edip edemeyeceğiniz veya farklı komponentler ile güvenlik testleri yapmak zorunda kalıp kalmayacağınız bilinmemektedir.'

Duplikasyonlar, nokta ve nadir mutasyonlar için ekzon atlama

Duplikasyonları tamir etmek için ekzon atlama. Bir ya da daha fazla ekzonun kopyalanarak okuma çerçevesinde kaymaya neden olması tüm duchenne hastalarının yaklaşık %7'sinde meydana gelmiştir.

Prensip, bunlar ekzon atlama ile onarılabilir; eğer kopyalanmış ekzonların ek olan setini ilk olana, orijinal ekzon setine dokunmadan ayırmak mümkün ise yeni distrofin proteini normal boyutlara sahip olacaktır. Eğer kastaki bozulmayı durdurmaya yetecek kadar yeni ve normal distrofin üretilebilirse bu işlem sadece terapi değil aynı zamanda iyileşme de sağlayacaktır.

Problem, antisense oligoların tamamen aynı olan ekzon setlerinin her ikisini de tanıyacak olmasıdır. Yani eğer birini atlamayı denerse her ikisini de atlamış olacaktır. Tekli ekzon kopyaları (tek-ekzon-duplikasyon) için çıkar bir yol olabilir çünkü bazı durumlarda biri, üçüncü ekzonu kopya olanlardan önce ya da sonra atlayabilir ve böylece okuma çerçevesini onarır. Fakat daha büyük kopyalar için bu olay çok karmaşık hale gelir ve bu nedenle çok zorlu olacak ve belki de mümkün bile olamayacaktır.

Kopyaları düzeltmek amacıyla Kevin Flanigan ve ekibi tarafından Columbus/Ohio 'daki Nationwide Children's Hospital'da yeni bir proje başlatılmıştır.

Ekzon 2'nin kopyası, Duchenne hastalarındaki tekli-ekzon duplikasyonlarının en yaygın olanıdır; distrofin geninde, şiddetli kas hastalığı semptomlarına neden olan bu tarz bir ekzon-2 kopyası bulunan yeni bir laboratuvar faresi üretilmiştir. Bu farelerden yeterli sayıda üretildiklerinde, bu kopyayı onarmak için in-vivo deneyler ile çözüm yolu bulmak mümkün olacaktır.

Araştırmacılar, farklı kopyalara sahip hastaların hücre dizilimleriyle laboratuvar deneylerinde kullanılmak üzere hücre kültürleri geliştirmişlerdir. Şuan, her zamanki ekzon atlama antisense oligoların yanı sıra AAV U7-snRNA tekniği ile de bu kopyaları onarmaya çalışmaktadırlar.

Nokta mutasyonlarını tamir etmek için ekzon atlama. Nokta mutasyonlar, genin kendisindeki bir ya da birkaç genetik harfin küçük değişimleridir. Eğer mutasyon tek bir genetik harf eklediye ya da sildiye, okuma çerçevesinde kayma meydana gelir. Eğer bir harf bir diğeri ile değiştirilirse, okuma çerçevesinde kayma olmaz ancak kod kelimesi artık farklı bir aminoasidi ifade etmektedir.

Eğer bu değişim distrofinin yapısını bozmasa, hiçbir olay meydana gelmez. Ancak 3 stop kodondan biri, TGA, TAG yada TAA, ortaya çıkarsa –okuma çerçevesinde kayma olmamasına rağmen- protein sentezi 'premature stop sign' da durdurulur ve sonuç olarak Duchenne distrofisi meydana gelir.

Stop kodonu içeren ekzon, eğer tüm kodonlar arasında sınıra sahip çerçeve içi bir ekzon ise ve böylece silinmesi halinde okuma çerçevesinde kayma olmayacaksa, atlanarak bu olay düzeltilebilir. Ya da eğer bu olay çerçeve kaymasına neden oluyorsa, bazı vakalarda, ek olarak komşu ekzonun da atlanması gerekir.

Eskiden PTC124 olarak adlandırılan *Ataluren* ilacı, New Jersey, ABD'deki PTC Therapeutics firması tarafından geliştirilmiştir, çünkü bu ilaç ekzon içindeki nokta mutasyonlardan kaynaklanan prematüre stop kodonlar arasından okuyabiliyor gibi gözükmektedir. Fakat büyük bir klinik çalışma esnasındaki zorluklar tamamlanabilmesini geciktirmiştir.

(Cevirenlerin notu: Bu molekül için ülkemizin de içinde bulunduğu yeni bir klinik çalışma başlamıştır)

Nadir mutasyonları tamir etmek için ekzon atlama. Elimizdeki moleküller sık mutasyonlara sahip ilk 11 grubun şu anda sadece 7'si için geliştirilmiştir. Bu öncelikli atlama ilaçları, tüm Duchenne hastalarının %45'i için terapi sağlayacaktır. Tüm hastaların kalan %38'i, yani ekzon atlamadan fayda görebilecek diğer 123 hasta grubuna dahil olan hastalar için şu anda hiçbir atlama ilacı geliştirilmemektedir. Bunların büyük bir çoğunluğu, yani 114 grup, tüm hastaların sadece %1'ini içermektedir, en küçük 30 grup ise %0.02'sinden fazla değildir!

Eğer şuan dünya genelinde yaklaşık olarak 400.000 Duchenne'li çocuk ve genç yaşıyorsa, %1 4.000 ve %0.02 ise 80 hasta demektir. Bu hastaların ekzon atlama ilaçlarının onların yaşam süreleri içerisinde geliştirilme ihtimalleri çok düşüktür!

Daha ileri yaştaki hastalar için ekzon atlama

Önceden açıkladığım gibi ekzon atlama tedavisi, eğer Duchenne'li çocuğun yaşamının en başlarında yani kaslarının çoğu halen mevcut iken başlanırsa en etkili olacaktır. Bu teknik büyük ihtimalle hayatta kalan kas liflerindeki bozulmayı yavaşlatacak ve hatta durduracaktır ancak kaybolmuş kas liflerini yeniden üretemeyecektir. Ancak, Gertjan van Ommen ve Annemieke Aartsma-Rus 'un röportajlarında açıkladıkları üzere yaşlı hastalar, hastalıkları ilerlemiş bile olsa, engellerine rağmen anlamlı bir hayat sürebilmelerini sağlayacak olan kalan kaslarının sağlam olmalarını isteyeceklerdir.

Gertjan şöyle demiştir: " Ekzon atlama, çocuklar için önemli bir gelişmedir ancak bu çocukların hayatı tamamen engelsiz olmayacaktır. Ve Duchenne'li çocuklarla konuşursanız, sıklıkla 10-16 yaşlarında iken neler olduğunu anlayabilirler ve doktorlar onların tek istedikleri şeyin uzun yaşamak olduğunu düşünürler.

Ancak onların asıl arzusu etrafta daha iyi gezinebilmek, kaslarını daha iyi hareket ettirebilmek, bilgisayar kullanabilmek için ellerini masanın üstüne koyabilmek ve bilgisayarı daha uzun süre kullanabilmektir. Steroid alıyor olsalar bile bilgisayarın klavyesini kullanabilmek için ellerini masanın üzerine koyamayacak kadar yorgun Duchenne'li daha

büyük çocuklar gördüm. Bunu kaybediyor olmaları onlar için gerçekten büyük bir kayıptır. Ve eğer siz bunu yavaşlatabilirsanız, onlara oldukça fazla yardım etmiş olacaksınız.

Teknik okullarda ve şirketlerde kendi hareketlerini yapamayacak kadar güçsüz olan Duchenne'li çocuklar ve genç insanlara yardım edecek "bio-robot" cihazların geliştirildiği projelerin olduğunu biliyorum"

Annemieke'ye "yaşlı ve oldukça engelli Duchenne hastalarının bütün modern tedavi metotlarını kullanarak yaşamlarını uzatmak bu zahmete gerçekten değer mi?" diye sorduğumuzda şöyle cevapladı:" Bence bu güzel bir soru. Ve bu soruyu sorabileceğin sadece bir kişi var: hastanın kendisi. Tedavi ve bakımı isteyip istemediğine hasta kendisi karar vermek zorundadır. Bizim açımızdan bakarsak, sadece parmağını hareket ettirebilmek ya da parmağını kaldırabilmek ya da gözlerini hareket ettirebilmek korkunç bir durum gibi gözüktür. Ancak o durumda olan hastalar biliyorum ve şunu söylüyorlar: "Hayatım benim için çok değerli, hayatımı seviyorum, bilgisayarım var, tiyatroya gidebiliyorum, sinemaya gidebiliyorum, futbol maçlarına gidebiliyorum ve ben mutluyum".

Guenter Scheuerbrandt, PhD.

Im Talgrund 2, 79874 Breitnau, Almanya

e-mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Internet: www.duchenne-information.eu

1 Şubat 2013

KAYNAKLAR

- (1) Li D, Yue Y, Duan D. Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PLoS One* 2010; 5; e15286
- (2) van Ommen GJ, van Deutekom JT, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10; 140-149.
- (3) Sarepta Therapeutics Announces Significant Clinical Benefit With Eteplirsen After 36 Weeks in Phase IIb Study for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. News Release, 24 July 2012.
- (4) Aartsma-Rus A, van Deutekom JCT, van Ommen GJB, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that conform the reading-frame rule. *Muscle & Nerve* 2006; 34; 135-144.
- (5) Aartsma-Rus A, et al. and van Deutekom J, van Ommen G-J, den Dunnen JT. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations; *Human Mutation* 2009; 30; 293-299.
- (6) Van Deutekom JC, et al. and van Ommen GJB. 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.
- (7) Goemans NM, Tulinius M, et al. and van Deutekom JC. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011; 364; 1513-22.
- (8) Kinali M, Arechavala-Gomez V, et al. and Bushby K and Muntoni F. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *The Lancet Neurology* 2009; 8; 918-928.
- with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation* 2007; 28; 196-202.
- (18) Van Vliet L, et al. and van Deutekom JCT, van Ommen G-JB, Aartsma-Rus A. Assessment of the feasibility of exon 45-55 multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Medical Genetics* 2008; 9; 105
- (19) Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, and Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Annals of Neurology* 2009; 65; 667-676.
- (20) Wu B, et al., and Lu QL. Octa-guanidine morpholino (9) Cirak S, Arechavala-Gomez V, et al. and Bushby K, Muntoni F. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose escalation study. *Lancet* 2011; 378; 595-605.
- (10) Sarepta Therapeutics announces a continued benefit on walking test through 62 weeks in phase IIb open-label extension study of Eteplirsen in Duchenne muscular dystrophy. News Release, 7 December 2012.
- (11) Mendell JR, et al. and Weiss RB. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2012; 71; 304-313.
- (12) Scheuerbrandt G, Lundin A, Lövgren T, Mortier W. Screening for Duchenne muscular dystrophy: An improved screening test for creatine kinase and its application in an infant screening program. *Muscle & Nerve*, 1986; 9;11-23.
- (13) Goyenvalle, A, et al. and García L: Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 2004, 306, 1796-1799.
- (14) Vulin A, et al, and Goyenvalle A, García L: Muscular function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping, *Molecular Therapy*, 2012, 20, 2120-2133.
- (15) Goyenvalle A, et al. and García L, Davies K.E.: Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping, *Hum. Mol. Genetics*, 2012, 21, 2559-2571.
- (16) Goyenvalle A, et al. and Garcia L, Davies KE. "Engineering multiple U7snRNA constructs to induce single and multiexon-skipping for Duchenne muscular dystrophy". *Mol Ther* 2012; 20;1212-21.
- (17) Bérout C, Matsuo M, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Molecular Therapy* 2009; 17; 864-71.
- (21) Yokota T, et al., and Partridge T, Hoffman EP, Takeda S. Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther.* 2012; 22;306-15.
- (22) Yoshitsugu A, Yokata T, et al. and Hoffman EP, Partridge T, Takeda S. Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109;13763-8.