

Connect-Jahrestagung in Philadelphia, 12 - 14 Juli 2007

Gemeinsam werden wir mit Duchenne fertig werden.

Zur Jahrestagung des amerikanischen Parent Project Muscular Dystrophy, PPMD, kamen mehr als 400 Teilnehmer nach Philadelphia. Etwa 60 Vorträge über die therapeutische Forschung, die medizinische und soziale Betreuung und die legalen Angelegenheiten standen an den drei Tagen des Treffens auf dem Programm. Ich, *Günter Scheuerbrandt*, ein Biochemiker aus Deutschland, bin von *Patricia Furlong*, der Präsidentin des PPMD, gebeten worden, einen Bericht über dieses Treffen für Euch zu schreiben, für die Kinder und jungen Männer mit Duchenne-Muskeldystrophie und für Eure Familien, die wissen möchten, wie weit die Forscher und medizinischen Experten mit ihrer Arbeit auf dem Weg zu einer wirksamen Therapie gekommen sind.

Dieser Bericht ist der dritte über Tagungen des PPMD, die beiden ersten Berichte waren über Treffen des PPMD im Juli 2006 in Cincinnati und des britischen PPUK, das jetzt ActionDuchenne heißt, im Oktober 2006 in London. Ihr könnt diese früheren Berichte auf Deutsch, Englisch und Spanisch auf meinen Internetseiten www.duchenne-forschung.de sehen und als PDF-Dateien von dort herunterladen. Dieser deutsche Text, der Mitte Januar 2008 fertig wurde, ist eine z.T. aktualisierte Übersetzung des originalen englischen Textes, der die Überschrift "Working together to end Duchenne" hat. Beide Überschriften und auch das Wort „Connect“ werden am Schluß des Berichtes von Patricia Furlong kommentiert.

Am Anfang jeder Zusammenfassung nenne ich die Vortragenden nur mit ihrem Namen ohne ihre Titel. Die meisten sind Professoren und haben entweder einen wissenschaftlichen (PhD) oder einen medizinischen (MD) Dokortitel oder beide. Und fast alle sind Leiter von Laboratorien, das bedeutet, sie haben Kollegen und Assistenten und Studenten, die gemeinsam als Team an den Projekten arbeiten, über die ich hier berichte, aber es ist unmöglich, alle ihre Namen zu nennen. Alle Wissenschaftler, deren Vorträge Teil dieses Berichtes sind, hatten die Gelegenheit, den Entwurf meines Textes zu korrigieren, falls das notwendig war, und die meisten haben das getan.

Dieser Bericht enthält nur die Zusammenfassungen der wissenschaftlichen Vorträge. Er ist aber keine wissenschaftliche Veröffentlichung mit vielen Literaturhinweisen. Nur einige der für Euch wichtigen Publikationen sind erwähnt. Ich habe versucht, diesen Bericht so zu schreiben, daß Ihr verstehen werdet, was in den Laboratorien für Euch getan wird. Für die unvermeidlichen Fachwörter und speziellen englischen Ausdrücke steht meistens in Klammern eine deutsche Erklärung.

Die korrekte Übersetzung des hier oft vorkommenden englischen Ausdrucks *exon skipping* ist *Überspringen von Exons*. Aber die beiden englischen Worte sind kürzer und werden auch beim Deutschsprechen von den Wissenschaftlern gerne gebraucht, so daß ich sie einfach wie zwei verbundene deutsche Substantive benutze: *das Exon-Skipping*. Und selbst das englische Verb *to skip* (überspringen) konjugiere ich der Einfachheit halber wie ein deutsches Verb: z.B. *skippen* und *geskippt*.

Einleitung.

Richard Finkel vom Children's Hospital in Philadelphia, *Dominic Wells* vom Imperial College in London, und *Steve Wilton* von der University of Western Australia in Perth erklärten zu Beginn des Treffens ausführlich das, was man über die Duchenne-Muskeldystrophie weiß, und die verschiedenen Forschungsstrategien auf dem Weg zu einer Therapie. Mein Bericht über das Treffen im letzten Jahr in Cincinnati begann mit einer ähnlichen Einleitung. Ich habe den damaligen Text gekürzt, mit neuen Informationen aktualisiert und hier wiederholt, um Euch zu helfen zu verstehen, wie die

Gene Proteine machen, warum Dystrophin so wichtig ist, auf welchen Forschungswegen aktiv gearbeitet wird und wie Exon-Skipping funktioniert.

Wie machen die Gene Proteine? Gene sind funktionelle Einheiten des genetischen Materials **Desoxyribonukleinsäure, DNA**. (Das A ist die Abkürzung für das englische Wort acid, Säure. Im Deutschen wird aber allgemein die Abkürzung DNA und für die ähnliche Ribonukleinsäure RNA verwendet.) Die Struktur der DNA sieht wie eine verdrehte Leiter aus, die *Doppelhe-*

lix. Jede Stufe dieser Leiter besteht aus jeweils zwei von vier verschiedenen kleinen Molekülen, den **Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin**, abgekürzt A, G, T, C, die man auch die *genetischen Buchstaben* nennt.

Aus Raumgründen können die Stufen der DNA nur zwei verschiedene Basenkombinationen enthalten, die **Basenpaare** A-T und G-C. Wenn zum Beispiel ein Ausschnitt aus der Sequenz (der Reihenfolge) dieser Basen auf einem Strang der Leiter -GGCTTAATCGT- ist, muß die Sequenz auf dem gegenüberliegenden Strang -CCGAATTAGCA- sein, so daß beide Sequenzen *komplementär* zueinander sind:

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

Solche Basensequenzen sind die genetischen Informationen für die Entwicklung und Funktion eines lebenden Organismus, sie wird von einer Generation an die nächste weitergegeben.

Die meisten Gene tragen die Instruktion für die Biosynthese der **Proteine**. Im Zellkern wird die genetische Instruktion der aktiven Gene **transkribiert**, das heißt, sie wird auf eine andere genetische Substanz kopiert, auf die pre-messenger-**Ribonukleinsäure**, auch **Transkript** oder abgekürzt **pre-mRNA** genannt. Die meisten Gene bestehen aus aktiven oder kodierenden Abschnitten, den **Exons**, die die Information für die Proteine enthalten, und den oft sehr viel längeren **Introns**, die nicht nur „genetic junk“ (genetischer Müll) sind, wie man früher glaubte, sondern auch Informationen für die Kontrolle der Genaktivität enthalten.

Nach der Transkription werden die Introns aus der pre-messenger-RNA entfernt und die Exons zur eigentlichen messenger-**RNA** oder **mRNA**, zusammengesetzt, **gespleißt**, die dann zu den **Ribosomen** wandert, den Protein-synthetisierenden Strukturen im Zytoplasma außerhalb des Zellkerns. (Auf Deutsch heißt die messenger RNA „Boten-RNA“, meistens verwenden wir aber auch dafür die englische Abkürzung mRNA.) Die Ribonukleinsäuren, **RNAs**, benutzen die Base U, Uracil, anstelle der sehr ähnlichen Base T der DNA. **Spleißstellen** sind bestimmte Sequenzen innerhalb der Exons und an den Exon-Intron-Grenzen, die für die präzise Entfernung der nicht-kodierenden Intronsequenzen aus der pre-mRNA notwendig sind. Das Spleißen selbst wird von den **Spleißosomen**, ausgeführt, das sind Komplexe aus vielen Proteinen und kurzen RNAs.

In der Sequenz der mRNA bilden drei aufeinanderfolgende Basen ein **Codon** (ein *genetisches Wort*), das, mit drei Ausnahmen, eine der 20 verschiedenen Bausteine der Proteine (Eiweißkörper), den **Aminosäuren**, determiniert (bestimmt). Es gibt keine Zwischenräume zwischen den Codons. In den Ribosomen werden die genetischen Codewörter abgelesen, in die Sprache der Proteine übersetzt, und diese aus vielen, oft Tausenden, ihrer Aminosäuren-Bausteine, zu einer langen Kette zusammengesetzt. Die drei erwähnten Ausnahmen sind die Codons UAA, UAG und UGA, die **Stoppcodons** sind, an denen die Biosynthese (die biologische Produktion) eines Proteins aufhört.

Das Dystrophin-Gen und -Protein: Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie werden durch **Mutationen**, Schädi-

gungen, des **Dystrophin-Gens** verursacht, das die Information für die verschiedenen Formen des Proteins **Dystrophin** trägt. Mit einer Sequenz von 2.220.223 Basenpaaren ist es das bei weitem längste der bisher bekannten menschlichen Gene. Nur 11.058 Basen, 0,5%, in den 79 Exons des Dystrophin-Gens bestimmen die Sequenz der 3.685 Aminosäuren des normalen Dystrophin-Proteins in den Muskelzellen. Das Gen hat sieben oder möglicherweise acht verschiedene **Promoter**, Basensequenzen, an denen sich regulierende Proteine anlagern und dadurch das Gen aktivieren, indem sie die Weitergabe seiner Information ermöglichen, um schließlich das Dystrophin zu produzieren. Wegen der vielen Promoter und der Möglichkeit, den Spleißprozeß anders zu steuern, sog. *alternatives Spleißen*, gibt es eine Reihe von anderen Dystrophin-Proteinen, die alle kürzer als das normale Dystrophin der Muskeln sind. Sie kommen in verschiedenen Organen vor, eines davon auch im Gehirn. Es ist nur 32% so lang als das normale, und es kann auch durch Mutationen ausgefallen oder verändert sein. Dies kann der Grund für die geistigen Probleme mancher Duchenne-Jungen sein.

Wie groß sind das Dystrophin-Gen und sein Protein?

Die Doppelhelix-Struktur des Dystrophin-Gens ist 0,75 mm lang. Zusammen mit den nach letzter Zählung 20.488 menschlichen Genen paßt sie in einen Zellkern von etwa 0,01 mm Durchmesser hinein, nur weil das genetische Material extrem kompakt gefaltet ist. Ein Molekül des normalen Dystrophin-Proteins ist viel kürzer als sein Gen, es ist 125 Nanometer oder 0,000125 mm lang. Auf einen Zentimeter passen 80.000 aneinandergereihte Dystrophin-Proteine. In einem Gramm Muskelgewebe gibt es 114 Milliarden Dystrophin-Moleküle. Dies macht deutlich, welche Aufgabe die Wissenschaftler haben: Um die Krankheit mit einer genetischen Therapie aufzuhalten und die Muskeln wieder funktionsfähig zu machen, muß das geschädigte Gen in jeder Muskelzelle ersetzt oder repariert werden, damit mindestens 30% der normalen Zahl an neuen Dystrophin-Molekülen gebildet wird. Die neuen Moleküle müssen nicht genau gleiche Struktur wie das normale Dystrophin haben, sie können kürzer sein, aber sie müssen richtig funktionieren. Und das bedeutet, daß viele Milliarden neue Dystrophin-Moleküle in jedem Gramm Muskel wiedererscheinen müssen, und ein Kind hat viele Kilogramm Muskelgewebe.

Die Aufgaben des Dystrophins: Dystrophin wird für die mechanische Stabilität der Muskelzellen gebraucht. Es befindet sich auf der Innenseite der Muskelzellmembranen. Eines seiner Enden, der C-Terminus, ist durch eine Gruppe anderer Proteine, durch den **Dystrophin-Glykoprotein-Komplex**, in der Zellmembran verankert, und das andere Ende, der N-Terminus, ist mit den für die Kontraktion verantwortlichen Strukturen innerhalb der Muskelzellen verbunden. Der Mittelteil des Dystrophins, die **Stabregion**, besteht aus umeinandergedrehte und mehrfach in sich selbst gefaltete Aminosäureketten. Wenn die Kontraktion der Muskelzelle das Dystrophin-Protein zwingt, seine Länge zu verändern, kann es sich wegen seiner gefalteten Struktur wie eine Feder oder ein *Stoßdämpfer* verhalten. Das Dystrophin überträgt dadurch die mechanische Energie, die von dem Aktin-Myosin-System erzeugt wird, auf die Muskelzellmembranen und die außen darüberliegenden

Strukturen, das Bindegewebe und die Sehnen, in einer schonenden Art, die die Membranen nicht überdehnt.

Dystrophin hat noch mehr Aufgaben: Es organisiert die komplizierte Struktur des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes und die Anordnung vieler anderer Proteine. Es sorgt auch z.B. für die korrekte Kalzium-Konzentration in den Zellen und reguliert das Muskelwachstum. Viele Einzelheiten dieser komplizierten Zusammenarbeit zwischen den zahlreichen Einzelteilen einer lebenden Zelle sind noch nicht bekannt.

Duchenne-Jungen haben kein oder nur sehr wenig Dystrophin in ihren Muskelfasern. Wenn seine schützende und organisierende Wirkung ausgefallen ist, zerreißt die Muskelkontraktion die Zellmembranen, so daß zuviel Kalzium in die Fasern eindringen kann. Das überschüssige Kalzium aktiviert dann Enzyme wie *Calpain* und andere Proteasen, die die Muskelproteine zerstören und zum Absterben der Zellen führen, zur *Apoptose*. Die Konsequenzen sind weitere Vorgänge wie Entzündungen und die Aktivierung der Fibroblasten, so daß es zur **Fibrose** kommt, der Entwicklung von Narbengewebe, das die Muskelregeneration verlangsamt und die typischen Symptome älterer Duchenne-Patienten verursacht.

Jungen mit der langsamer voranschreitenden *Becker-Dystrophie* haben weniger als normale Mengen von Dystrophin, das auch oft kürzer ist. Es kann zwar immer noch seine Aufgaben erfüllen, jedoch nicht so effektiv wie das normale Protein.

Nicht nur die Skelettmuskeln sind vom Fehlen des Dystrophins betroffen, sondern auch die glatten und die Herzmuskeln. Schädigungen der Herzmuskeln verursachen eine *Kardiomyopathie* und die Schwäche der glatten Muskulatur hat weitere Konsequenzen, z.B., die Blutgefäße geben weniger leicht nach, wenn der Blutdurchfluß zunimmt, was zu Atmungs- und anderen Problemen führen kann. Und auch das Verdauungssystem wird betroffen, wenn die Darmbewegungen schwächer werden. Die Veränderungen eines einzigen Gens können also den ganzen Körper in Mitleidenschaft ziehen.

Die Mutationen des Dystrophin-Gens: Es gibt hauptsächlich drei Arten von Mutationen, die die Funktion des Dystrophin-Gens beeinflussen: **Deletionen**, wenn ein oder mehrere ganze Exons des Gens fehlen, **Duplikationen**, wenn Teile des Gens wiederholt sind, und **Punktmutationen**, wenn einzelne Basenpaare ausgetauscht, entfernt oder eingefügt sind. Außerdem gibt es noch Inversionen, d.h., Richtungsänderungen der Gensequenz, und Mutationen in den Introns, die den normalen Spleißprozeß verändern.

Die verschiedenen Wege zu einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Die Forschung versucht, Therapien für Duchenne-Muskeldystrophie auf zwei genetischen Wegen zu entwickeln und mit einer Reihe von verschiedenen pharmakologischen Methoden.

Auf dem ersten genetischen Weg mit dem **Exon-Skiping** wird das geschädigte Gen nicht verändert. Diese Methode greift nur in die Weitergabe der genetischen Information vom Gen zum Protein ein. Das Spleißen der Exons der pre-mRNA zur mRNA im Zellkern wird ganz gezielt geändert, so daß die gestörte, *out-of-frame*-Information

Da die Drei-Buchstaben-Codons der mRNA in den Ribosomen eines nach dem anderen ohne Zwischenraum gelesen werden, bleibt das **Leseraster** erhalten, englisch **in-frame**, wenn die Mutation ganze Codons aus drei Buchstaben entfernt oder zugefügt hat. Das Dystrophin kann zwar noch produziert werden, aber es ist länger oder kürzer als normal. Wenn diese Änderungen nur unwichtige Strukturen des Dystrophins betreffen, kann es immer noch zumindest teilweise seine Aufgaben erfüllen. Dann entsteht die gutartige Form der Dystrophie, **Becker-Muskeldystrophie**.

Wenn jedoch die Mutation das Leseraster um ein oder zwei Basen verschoben hat, bleibt es nicht erhalten, es ist "**out-of-frame**". Dann wird eine Reihe von falschen Aminosäuren ab der Mutationsstelle in das wachsende Protein eingebaut bis schließlich ein neues, ein **vorzeitiges Stoppcodon** erreicht wird. Das unfertige Dystrophin kann seine normale Funktion nicht erfüllen, es verschwindet, und es entwickelt sich die **Duchenne-Muskeldystrophie**.

Verlauf der Duchenne-Muskeldystrophie: Die ersten klinischen Zeichen treten mit zwei bis drei Jahren auf, wenn das Kind Schwierigkeiten beim Gehen und vor allem beim Treppensteigen bekommt. Ohne Früherkennung wird auch heute noch die Krankheit erst mit ca. 3 bis 5 Jahren diagnostiziert (erkannt). Wegen zunehmender Kontrakturen, vor allem an den Fuß-, Knie- und Hüftgelenken, verlieren die Patienten mit 10 bis 12 Jahren ihre Gehfähigkeit. Fortschreitende *Skoliosen* (Rückgratverkrümmungen) und Bewegungseinschränkungen machen sie bald ganz von intensiver Pflege abhängig. Die Beeinträchtigung der Atem- und Herzfunktionen führen dann zu Herz- und Kreislaufversagen im frühen Erwachsenenalter. Behandlung mit Corticosteroiden, Krankengymnastik, orthopädische Operationen zur Vermeidung von Kontrakturen und Rückgratverkrümmungen, sowie Atemhilfen und andere Betreuungsmaßnahmen können die Lebensqualität verbessern und die Lebenserwartung deutlich erhöhen.

Einige dieser medizinischen und sozialen Betreuungsmaßnahmen wurden bei diesem und früheren Parent-Project-Treffen diskutiert. Ich hoffe, daß es einmal möglich sein wird, einen ähnlichen wie diesen wissenschaftlichen Bericht mit einem Team von Spezialisten zu schreiben, weil dies für alle Duchenne-Jungen wichtig sein wird, vor allem in den weniger entwickelten Ländern, um an den Entwicklungen der letzten Jahre teilzuhaben, die ihr Leiden reduziert und ihr Leben verlängert und lebenswerter gemacht haben.

wieder lesbar, *in-frame*, gemacht wird. Dadurch wird die Duchenne- zur Becker-Dystrophie verlangsamt. Eine vollkommen neue Behandlungsart mit *genetischen Medikamenten*, die für verschiedene Patientengruppen speziell hergestellt werden müssen, kann diese Änderungen der Informations-Verarbeitung bewirken: Diese Medikamente heißen **Antisense-Oligoribonukleotide**, abgekürzt AONs.

Der *zweite genetische Weg* ist der Versuch, neue Dystrophin-Gene in die Kerne der Muskelzellen zu übertragen, die dann wieder die Produktion von Dystrophin steuern

können. Viele Experimente mit Mäusen haben gezeigt, daß dieses Ziel erreicht werden kann, wenn man einen modifizierten, einen gezähmten, Virus, d.h., den **Adeno-assoziierten Virus**, AAV, als **Vektor** (als „Transportfahrzeug“), verwendet, um damit die aktiven Teile des Dystrophin-Gens, seine aneinandergehängten Exons - die **cDNA** - in die Muskelzellen einzubringen. Der AAV-Vektor ist aber nicht genügend groß, um die komplette cDNA mit allen 79 Exons zu transportieren. Nur cDNAs, die etwa ein Drittel so lang als normal sind, passen in ihn hinein. Das bedeutet, daß auch das neue Dystrophin nur etwa ein Drittel so groß sein wird als das normale. Wenn dieses verkürzte Dystrophin eine Struktur hat, die zu einer Becker-Dystrophie führen kann, dann würde eine solche Behandlung *keine vollständige Heilung* bringen, sondern nur eine Verlangsamung der schnellen Duchenne- in die mildere Becker-Dystrophie mit einer manchmal normalen Lebenserwartung. Da das neu übertragene genetische Material nicht in die Chromosomen der Zelle eingebaut wird, bleibt das mutierte Dystrophin-Gen unverändert. Es bleibt mit seiner Mutation auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms.

Weil beide genetische Methoden so neu sind, muß die Forschung sehr vorsichtig vorgehen. Obgleich es verständlich ist, daß man neue Therapien schnell in die Klinik bringen möchte, ist es wichtig, daß keine Fehler vorkommen, die die Sicherheit beeinflussen, weil dies ein Rückschlag für das gesamte Gentherapie-Feld sein würde. Deshalb sind die Genehmigungsverfahren sehr streng und brauchen viel Zeit.

Auf dem *dritten therapeutischen Weg* versucht man, vor allem die nichtgenetischen Konsequenzen des fehlenden Dystrophins zu vermeiden oder zumindest abzumildern, also die Zerstörung der Muskeln durch Protein-abbauende Enzyme, die Durchlässigkeit der Membranen, die Fibrose und die Entzündung. Es gibt bereits eine Reihe von zugelassenen Medikamenten gegen andere Krankheiten, von denen man annimmt, daß sie auch eine positive Wirkung auf die Duchenne-Dystrophie haben könnten. Im Kapitel über die pharmakologischen Wege sind die neuesten Forschungsergebnisse zusammengefaßt, die bei dem Treffen in Philadelphia diskutiert wurden. .

Warum brauchen wir klinische Studien?

Wie ein Medikament zu den Patienten kommt. In ihrem Vortrag mit dem Titel *Einführung in klinische Versuche* erklärte **Kate Bushby** von der University of Newcastle upon Tyne in England, wie eine neue *Hypothese* (eine Idee) eines Wissenschaftlers für eine Therapie, zu einem wirksamen Medikament für Duchenne-Muskeldystrophie führt. In dieser Zusammenfassung wiederhole ich mit einigen neuen Details die wichtigste allgemeine Information, die Dr. Bushby bereits beim Treffen des PPUK 2006 in London gegeben hatte.

Klinische Studien sind unbedingt notwendig für die Entwicklung eines wirksamen Medikamentes, die viele Jahre braucht. Doch Duchenne-Jungen können nicht viele Jahre warten, bis solche Studien durchgeführt sind und ein Medikament endlich für sie zur Verfügung steht. Ihr und Eure Eltern müssen aber verstehen, daß die Wissenschaftler Eure Lage durchaus kennen und so schnell wie möglich mit vielen Mitarbeitern arbeiten, aber daß sie auch mit den Genehmigungsbehörden zusammenarbeiten müssen, um sicher zu sein, daß die neuen Medikamente wirksam und sicher sind. Von Anfang an, schon in der präklinischen Phase, müssen sie vorsichtig arbeiten und einen Schritt nach dem anderen tun, bevor klinische Studien beginnen können. Und für diese Laboratoriumsexperimente allein können schon viele Jahre nötig sein. Zum Beispiel hat es 13 Jahre gedauert, bis nach den ersten Vorschlägen für das Exon-Skipping als einer Methode zur Therapie einer Erbkrankheit im Jahr 1993 diese Technik jetzt in den ersten klinischen Studien an Duchenne-Jungen getestet werden kann.

Die erste Aufgabe der Wissenschaftler, die ein neues Duchenne-Medikament zu entwickeln beginnen, ist es, experimentelle Daten durch Testen einer neuen Idee an einem Versuchstier zu sammeln, das ein Modell für eine Krankheit wie die Duchenne-Muskeldystrophie ist. Dabei müssen zuerst Versuche an isolierten Muskelzellen *in vitro* (in einem Laboratoriumsgefäß) durchgeführt werden, und dann *in vivo* (an einem Lebewesen) an dystrophischen

mdx-Mäusen und GRMD-Hunden. Um festzustellen, ob eine neue Methode die Pathologie (den Krankheitsprozeß) ändern kann, werden in allen Einzelheiten die biochemischen und biologischen Konsequenzen (die Folgen) der vorgeschlagenen Behandlung bestimmt, wie z.B. die Änderungen der Aktivität des Enzyms Creatinkinase (CK), der Histologie (der Struktur) der Muskeln, des Vorkommens und der Eigenschaften des Dystrophins und seiner mRNA. Mit Experimenten an Tieren kann man dann eine Verbesserung der Muskelfunktion nachweisen und feststellen, ob die neue Substanz tatsächlich eine positive Wirkung hat und nicht etwa giftig ist.

Aber selbst zuverlässige Ergebnisse vorklinischer Experimente beweisen noch nicht, daß eine neue Substanz, ein mögliches Medikament, die gleichen Ergebnisse zeigen wird, wenn sie an Kindern getestet wird. Obgleich mdx-Mäuse kein Dystrophin in ihren Muskeln haben, sind diese kleinen Tiere nicht richtig behindert, ihre Krankheit ist viel milder als die menschliche Duchenne-Dystrophie. Die Dystrophie der viel größeren *golden retriever* (Apportierhunde), GRMD, ähnelt viel mehr der menschlichen Krankheit. Diese Hunde sind richtig behindert und haben Schwierigkeiten aufzustehen und zu laufen. Aber trotzdem kann nicht erwartet werden, daß die Ergebnisse von Experimenten mit diesen Tieren die gleichen sein werden, wenn sie an Kindern wiederholt werden. *Ein Kind ist keine große Maus und auch kein zweibeiniger Hund!* Aus all diesen Gründen sind klinische Studien mit Duchenne-Jungen notwendig.

Normalerweise müssen solche klinischen Studien drei Phasen durchlaufen, und es ist wichtig zu wissen, daß es nach den klinischen Phasen I und II den Teilnehmern an einer Studie nicht klinisch besser gehen wird, weil diese Phasen so angelegt sind, daß sie nur Fragen nach der Sicherheit und einer begrenzten Wirksamkeit beantworten können: (1) In *Phase-I* testet man auf Toxizität (Giftigkeit), (2) in *Phase-II* auf notwendige Dosis, Sicherheit, und Anzeichen von Wirksamkeit, und (3) in *Phase III* will

man weiterhin die Sicherheit prüfen, einen klinisch erwünschten positiven Effekt bestätigen und die Wirksamkeit beweisen, d.h., definitiv zeigen, daß die neue Behandlung eine wirkliche Verbesserung der Muskelfunktionen und der Lebensqualität mit sich bringt.

Die klinischen Studien für eine Duchenne-Therapie bringen eine Reihe besonderer Probleme mit sich: (1) Diese Krankheit ist selten, deswegen ist die pharmazeutische Industrie nicht immer daran interessiert, doch ihre Hilfe ist wichtig für die Entwicklung eines Medikamentes. Sie brauchen aber eine Aussicht auf Gewinn, um genügend Kapital zu bekommen, deswegen sind die Steuererleichterungen für sog. *orphan diseases* (seltene Krankheiten) wichtig, die auf Seite 21 beschrieben sind. (2) Weil Duchenne-Dystrophie ziemlich selten ist, gibt es auch relativ wenige Patienten mit manchen bestimmten Mutationen in ihrem Dystrophin-Gen. Man kennt sie auch nicht alle, weil viele Patienten immer noch keine molekularen Diagnosen haben (auf Gentests basierende Diagnosen). Deshalb sollten die Eltern darauf bestehen, daß die genaue Mutation im Dystrophin-Gen ihres kranken Sohnes sobald als möglich bestimmt wird, und zwar nicht nur wenn Deletionen oder Duplikation vorliegen, sondern auch wenn eine Punktmutation oder eine der sehr seltenen Mutationen vorgekommen sind. (3) Nationale und internationale Register mit den vollen diagnostischen Daten möglichst vieler Patienten werden bereits eingerichtet. Einzelheiten darüber stehen nimm Internet unter www.treat-nmd.eu. Die Familien sollten gebeten werden, sich über solche Register zu informieren und die Daten ihres Kindes dort aufnehmen zu lassen.

Duchenne-Muskeldystrophie ist eine komplizierte Krankheit, und wirksame Medikamente müssen wahrscheinlich lebenslang auf das genetische System einwirken, das das Dystrophin in gesunden Muskeln produziert. Für eine solche genetische Behandlung wird man neuartige Medikamente brauchen, die alle Muskeln eines Jungen, selbst die der Lungen und des Herzens, über sehr lange Zeit positiv verändern können. Deshalb sind die Anforderungen an die Sicherheit und die Wirksamkeit eines solchen Duchenne-Medikaments äußerst streng.

Die Überwachungs- und Kontrollmaßnahmen, der verschiedenen Behörden sind dazu da, die Patienten vor Schaden und ihre Ärzte vor juristischen Konsequenzen einer möglichen gefährlichen Behandlung zu bewahren. Sie stellen sicher, daß Studien so durchgeführt werden, daß sie auch die Antworten auf die gestellten Fragen liefern. Die Vorschriften sorgen auch dafür, daß die Daten später in der Zulassung widerspruchsfrei und genau sind. Der umfangreiche bürokratische Aufwand, die langen Verzögerungen und die hohen Kosten klinischer Studien sind notwendig, damit alles korrekt durchgeführt wird im Interesse der Duchenne-Jungen und ihrer Familien.

Es gibt mehr negative als positive klinische Studien, deshalb sollte kein Patient die neuesten und besten medizinischen Betreuungsmaßnahmen vernachlässigen oder etwa abbrechen. Nur sorgfältig geplante und durchgeführte klinische Studien werden zu einer wirksamen Therapie innerhalb einer vertretbaren Zeit führen. Fehler müssen unter allen Umständen vermieden werden, sie würden alle Forschungsarbeiten verzögern und die Jungen noch länger auf eine entscheidende und positive Änderung ihres Lebens warten lassen.

Die Ergebnisse klinischer Studien müssen zuverlässig und signifikant sein. In seinem zweiten Vortrag erklärte **Richard Finkel**, daß die Forscher sich auf sog. *outcome measures* (standardisierte Ergebnisdaten) einigen müssen, damit die klinischen Studien mit Duchenne-Patienten zuverlässig ausgewertet und mit den Ergebnissen anderer Studien mit den gleichen oder ähnlichen Medikamenten verglichen werden können. Beispiele von medizinischen, genetischen und biologischen Eigenschaften, die man messen kann, sind die Aktivitäten der Creatinkinase, die Menge und die Struktur des Dystrophins, die Muskelkraft und Muskelausdauer, die Atmung, die Herzfunktion sowie die Lebensqualität der Jungen. Die Messungen sollten es erlauben festzustellen, ob die Ergebnisse statistisch relevant mit einem p-Parameter von mindestens 0,05 sind. Dies bedeutet, daß die Wahrscheinlichkeit für ein nur zufälliges Ergebnis weniger als 5% beträgt.

Die Meßmethoden sollten standardisiert sein und es möglich machen, festzustellen, ob das untersuchte potentielle (mögliche) Medikament Änderungen der Krankheits-symptome (der Krankheitszeichen) verursachen kann, die klinisch bedeutend und spezifisch (charakteristisch) für Duchenne- und Becker-Dystrophie sind. Sie sollten auch sicher und leicht durchzuführen sein und mit genügender Empfindlichkeit kleine Änderungen finden können. Außerdem müssen sie für die Patienten, ihre Eltern und die Genehmigungsbehörden akzeptabel sein. Und vor allem müssen sie deutlich zeigen, ob eine vorgeschlagene Behandlung auch im Interesse des Kindes sein wird, d.h., daß sie, falls eine vollständige Heilung noch nicht möglich ist, zumindest den Krankheitsverlauf deutlich verlangsamten kann.

Biotechnologie-Firmen brauchen Kapital. **Jeremy Gelber** von der Beratungsfirma Morgan Stanley Investment Banking diskutierte die finanzielle Seite der Entwicklung eines Medikamentes für eine seltene Krankheit wie die Duchenne-Muskeldystrophie. Die durchschnittlichen direkten Kosten für die Entwicklung bis zur Genehmigung betragen etwa 300 Million Dollar, das sind kapitalisiert, (einschließlich der Zinsen) mehr als etwa 800 Millionen Dollar. Dieses Geld muß von Investoren kommen, die das Risiko eines Fehlschlags akzeptieren, aber dafür einen Gewinn erwarten, wenn das Medikament erfolgreich verkauft werden kann. Investmentgesellschaften können Millionen von Dollar bereitstellen, sie kennen die oft ganz neu gegründeten Biotechnologie-Firmen, sie kennen den Pharmamarkt, und sie beraten ihre Kunden, die Kapitalanleger, über die Risiken und den möglichen Gewinn. Diese Spezialisten wissen, wie wichtig es ist, daß klinische Studien positive Ergebnisse liefern. Deshalb müssen sie sehr sorgfältig geplant und durchgeführt werden, weil eine gescheiterte Studie einen großen negativen Einfluß auf den Aktienpreis und den Marktwert einer Firma hat. Ein erfolgloser klinischer Versuch kann eine Firma zerstören und dadurch zu einer Verzögerung der Entwicklung eines Medikamentes führen, auf das alle Duchenne-Familien warten.

„Bitte lassen Sie unseren Sohn an einer der ersten klinischen Studien teilnehmen, wir würden alles tun und überall hingehen, denn dann hätte er doch eine Chance für eine Heilung“. Viele e-Mails, manche aus weit entfernten Ländern, erreichen mich mit diesem Hilferuf. Die folgen-

den Abschnitte sind eine Antwort auf diese Bitte.

Nur 19 Kinder nehmen an den drei ersten klinischen Phase-I-Studien an Duchenne-Jungen in den Vereinigten Staaten, in Holland und England teil. Sie kommen aus der Nachbarschaft der klinischen Zentren, weil sie wiederholt klinisch getestet werden müssen, und sie müssen eine ganz genau bekannte Mutation in ihrem Dystrophin-Gen haben.

Nur ein einzelner Muskel wird bei diesen ersten Studien lokal behandelt. Selbst wenn die Ergebnisse positiv sind, d.h., wenn genügend neues Dystrophin ohne ernste Nebenwirkungen erscheint, und wenn dieser einzelne Muskel danach besser arbeiten kann, werden trotz dieser positiven Veränderung, die Kinder *keinen therapeutischen Vorteil* von dieser Behandlung haben. Ihre Muskeldystrophie wird weder geheilt noch verlangsamt! Mit diesen ersten Versuchen will man nur beweisen, daß zwei neue Methoden – Exon Skipping und Minigen-Transfer – wirklich in menschlichen Muskeln funktionieren. Man möchte und erwartet nur einen *proof of principle* (einen Beweis der prinzipiellen Machbarkeit).

Wenn dies bewiesen ist, wird meistens im nächsten Schritt eine *systemische Anwendung* versucht werden. Die potentiellen Medikamente – Antisense-Oligoribonukleotide, AONs, werden in die Blutbahn injiziert, damit sie alle

Muskeln erreichen. Die erste systemische Studie wird wahrscheinlich in Holland 2008 beginnen, auch wieder mit nur wenigen Kindern aus der Nachbarschaft der klinischen Zentren.

Aus diesen Gründen hat es zurzeit keinen Sinn, daß die Eltern mit ihrem Kind von weit her, womöglich von anderen Kontinenten, kommen und mehrere Monate in der Nähe der Zentren wohnen. Das würde viel zu teuer sein und das Kind nicht heilen. Das Beste, das die Familien machen können, um Zugang zu einer Therapie zu haben, sobald sie fertig und zugelassen ist, ist Mitglied einer der aktiven Muskeldystrophiegesellschaften zu sein, eine Genanalyse für ihr Kind machen zu lassen, und seine genaue Mutation und alle anderen klinischen Daten in Duchenne-Datenbanken zu registrieren, die jetzt eingerichtet werden. Dann können die Forscher die Familien kontaktieren, deren Söhne eine der wirklich *gebrauchten* Mutationen haben, weil in den kommenden Jahren immer mehr klinische Studien durchgeführt werden, auch mit Jungen, die eine der seltenen oder ungewöhnlichen Mutationen haben. Und die Familien sollten aktuelle Forschungsberichte lesen, so daß sie wissen, was die Forschung tut und somit erfahren, wann und wo ein wirksames Medikament zur Verfügung steht.

Exon-Skipping und Gen-Übertragung.

Exon-Skipping bringt keine Heilung. Die Exon-Skipping-Technik versucht, die schnell verlaufende Duchenne-Dystrophie zur viel milderen Becker-Dystrophie zu verlangsamen. Diese Technik *verändert nicht das Gen und auch nicht seine Mutation*, sondern beeinflusst die Weitergabe der genetischen Information vom Gen zum Protein. Exon-Skipping kann *keine Heilung für Duchenne-Muskeldystrophie* sein, sie wird nur die ihre Symptome abmildern können, d.h., sie ist *nur eine Therapie*.

Wenn eine Mutation – eine Deletion, Duplikation oder Punktmutation – das Leseraster der mRNA verschiebt und so Duchenne-Dystrophie verursacht, kann das Raster wiederhergestellt werden, wenn aus der mRNA zusätzlich ein oder mehrere Exons durch *Antisense-Oligoribonukleotide*, AONs, künstlich entfernt werden. Dies sind kurze RNA-Moleküle, deren Basensequenzen so konstruiert sind, daß sie sich ganz spezifisch an die komplementäre Sequenz der pre-mRNA innerhalb oder an den Endregionen des zu entfernenden Exons anlagern und *nirgendwo sonst*. Diese AONs stören dadurch den Spleißmechanismus derart, daß das betreffende Exon nicht mehr in der mRNA enthalten ist, es ist *geskippt* (übersprungen). Auf diese Weise können auch mehrere Exons entfernt werden.

Da die geskippte mRNA kürzer als normal ist, wird das von ihr determinierte Dystrophin-Protein auch kürzer sein, es wird weniger Aminosäuren enthalten. Wenn die fehlenden Aminosäuren Teil einer unwichtigen Region sind, wie der Stabregion in der Mitte des Dystrophins, kann das kürzere Protein oft noch seine stabilisierende Rolle für die Muskelzellmembran erfüllen. Das Ergebnis wäre dann eine Änderung der schweren Duchenne-Symptome in die viel milderen der Becker-Dystrophie.

In den ersten Exon-Skipping-Studien werden zwei verschiedene Formen chemisch geschützter AONs verwendet. Sie müssen geschützt sein, weil sie dann nicht oder nur

langsam in den Muskelzellen von Enzymen zerstört werden, die Nukleinsäuren abbauen. Diese beiden AON-Formen sind die *2'O-Methyl-Phosphorothioate*, auch *2'O-Methyls* genannt, und die *Morpholinos*. Wegen ihrer ungewöhnlichen Struktur sind die Morpholinos nicht echte Nukleotide, deswegen ist die Abkürzung AON für sie eigentlich nicht zutreffend. Aus praktischen Gründen verwende ich in diesem Bericht die Kurzform AON für beide Formen, wie es auch in vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen geschieht.

Exon-Skipping-Studie in Holland. Weil *Judith van Deutekom*, jetzt Forschungsleiterin von Prosensa B.V., einer Biotechnologie-Firma in Leiden in Holland, an dem Treffen in Philadelphia nicht teilnehmen konnte, berichtete *Elizabeth Vroom*, Präsidentin der internationalen United Parent Project Muscular Dystrophy, UPPMD, über die *erste klinische Studie mit der Exon-Skipping-Technik an Menschen*, die zwischen Mai 2006 und März 2007 durchgeführt wurde.

Diese Studie wurde von der Firma Prosensa organisiert und zum Teil auch finanziert. Ein großer Teil der sehr hohen Kosten wurden aber durch Spendengelder von Elternorganisationen aufgebracht, darunter waren das holländische Parent Project, die UPPMD, die französische Muskeldystrophiegesellschaft AFM, und auch die deutsche Aktion Benni und Co. Als Beispiel eines besonderen Engagements für die Sache der Muskelkranken sei der Vortragsabend am 11. November 2005 in der Stadt Achern in Südwestdeutschland erwähnt, an dem Dr. *Klaus Klar* praktisch alle bekannten Schillerballaden und die einzige von Goethe vor einem großen Publikum aus seinen Freunden und Patienten auswendig rezitierte und danach 3.700 Euro nach Leiden für die holländische Studie schicken konnte. Ohne diese und viele andere Aktivitäten der Duchenne-

Familien wäre es aus finanziellen Gründen nicht möglich gewesen, so früh und problemlos zu beweisen, daß diese neue genetische Technik in Duchenne-Kindern funktionieren wird.

Diese Studie sollte nur einen *proof of principle* (einen grundlegenden Beweis) liefern und nicht einen therapeutischen Vorteil für die behandelten Jungen bringen. Es war eine *lokale Studie* an einer kleinen Region eines einzelnen Muskels, des *Tibialis anterior* des Schienbeins, die mit einem 2'O-Methyl-AON gegen Exon 51, genannt *PRO051*, behandelt wurde. Die holländischen Wissenschaftler arbeiteten mit der 2'O-Methyl-Version des Anti-51-AONs, weil sie mit diesem Typ der chemisch stabilisierten AONs langjährige Erfahrungen haben. Sie haben damit Muskelfasern mit Erfolg behandelt, nicht nur in Zellkulturen, sondern auch nach lokalen Injektionen in lebende Versuchstiere und systemischen Injektionen in ihre Blutzirkulation.

Exon 51 wurde als erstes Ziel gewählt, weil ein erfolgreiches Skippen dieses einzelnen Exons das Leseraster von 16% aller Duchenne-Patienten bzw. von 25% aller Duchenne-Jungen mit Deletionen wiederherstellen könnte, vor allem bei denen, die Deletionen der Exons 50, 52, 45-50, 48-50 und 49-50 haben.

Weil Exon-Skippping ein neues medizinisches Verfahren ist, wurden an jedem Jungen vor dem Beginn der Studie intensive klinische und molekulargenetische Tests durchgeführt. Da die holländische Genehmigungsbehörde es nicht erlaubte, eine Muskelbiopsie vor der Studie vorzunehmen, wurde eine Hautbiopsie durchgeführt, aus der Zellkulturen hergestellt wurden. Mit diesen Laboratoriumstests wurden die zuvor schon an der DNA nachgewiesenen Deletionen auch an der mRNA bestätigt und auch die Basensequenzen der Grenzregionen vor und hinter den deletierten Exons bestimmt. Außerdem wurde das ganze Dystrophin-Gen überprüft, um sicherzustellen, daß keine unerwarteten Unregelmäßigkeiten zu erwarten waren. Obgleich schon bekannt war, daß das Skipping von Exon 51 in lebenden Tieren und in Zellkulturen von Duchenne-Patienten möglich war, wurde die Skipping-Reaktion an den Muskelzellkulturen aus den Hautbiopsien eines jeden Jungen wiederholt, um jedes Risiko auszuschließen, daß das Skipping in dem lebenden Muskel während der klinischen Studie nicht funktionierte.

Außerdem wurde an der mRNA aller vier Jungen die Sequenzen an den Bruchpunkten der Deletionen analysiert, um nachzuweisen, daß keine Unregelmäßigkeiten vorgekommen sind, die man beim Testen der DNA nicht sehen kann, die aber z.B. das nicht geplante Skipping eines zusätzlichen Exons verursachen könnten. Diese Vorsichtsmaßnahme wird auch später für alle Patienten gelten, die mit dieser Technik behandelt werden. Einzelheiten stehen im Kommentar von Dr. *Johan den Dunnen* auf Seite 25.

Eine weitere Vorsichtsmaßnahme war es, die Jungen einen nach dem anderen zu behandeln, das heißt, daß erst nachdem die Ergebnisse des ersten Jungen positiv waren und nur unbedeutende Nebeneffekte wie vorübergehende leichte Schmerzen nach den Injektionen und der Biopsie zeigten, der zweite und die folgenden Jungen behandelt wurden.

Am 27. Dezember 2007 wurden die Einzelheiten dieser Studie im Band 357 der Zeitschrift *New England Journal of Medicine* auf den Seiten 2677-2686 von *Judith C. van Deutekom* als erste Autorin mit 15 weiteren Wissen-

schaftlern veröffentlicht, so daß jetzt Einzelheiten mitgeteilt werden können.

Für diese Studie wurden zunächst sechs Jungen ausgewählt, doch als die Ergebnisse der Behandlung der ersten vier Jungen so eindeutig und positiv waren, war es nicht mehr nötig, die beiden letzten auch zu behandeln. Die vier behandelten Jungen waren zwischen 10 und 13 Jahre alt, sie hatten Deletionen der Exons 50, 52, 48-50 und 49-50. Der Versuch war offen, das heißt, jeder Beteiligte wußte, daß alle vier Jungen das *PRO051* bekam.

Jeder der vier Jungen erhielt 4 Injektionen von 0,2 mg *PRO051* in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) unter Lokalanästhesie in eine kleine Region von nur 1,5 cm Länge des *Tibialis-anterior*-Muskels. Vier Wochen nach der Injektion wurde eine Biopsie an der Injektionsstelle durchgeführt und das Muskelgewebe auf die verkürzte, *geskippte*, mRNA und das dadurch entstandene, ebenfalls verkürzte Dystrophin getestet.

Im März 2007 wurde der Versuch beendet und die Ergebnisse ausgewertet. Die Analysen der mRNA und des Dystrophins im Muskelgewebe aus den Biopsien der vier Jungen zeigten, daß 64%, 85%, 97% und 73% der noch vorhandenen Muskelfasern Dystrophin an den Muskelmembranen enthielten. Die Menge des neuen Dystrophins betrug 33%, 35%, 17% und 25% des normalen Gehalts bezogen auf Laminin $\alpha 2$, einem von Duchenne nicht betroffenen Membranprotein. Durch den Vergleich mit Laminin kann man den Einfluß der verschieden weit fortgeschrittenen Muskeldegeneration der vier Jungen ausgleichen. Ohne diesen Ausgleich sah man, daß absolut gerechnet der 13 Jahre alte Junge mit den wenigsten Muskelfasern, dafür aber mit viel Bindegewebe und Fett im Muskelgewebe nur 3% der normalen Menge neues Dystrophin hatte, und der mit den am besten erhaltenen Muskeln 12%. Die Konsequenz daraus ist, daß solche klinischen Studien mit möglichst jungen Patienten durchgeführt werden sollten, und daß natürlich eine zukünftige Exon-Skippping-Therapie so früh wie möglich nach einer möglichst früh gestellten Diagnose begonnen werden müßte, wenn noch die Muskeln weitgehend erhalten sind.

Mit molekularen Sequenzierungsmethoden wurde dann bewiesen, daß das neue Dystrophin in der Muskelprobe der vier Jungen tatsächlich die Struktur hatte, die nach dem Skipping von Exon 51 erwartet worden war. Beim ersten 10 Jahre alten Patienten mit der Deletion von Exon 50 folgte auf Exon 49 direkt Exon 52, beim zweiten 13 Jahre alten Jungen mit Deletion der Exons 48, 49 und 50 folgte auf Exon 47 das Exon 52, beim dritten ebenfalls 13jährigen Jungen mit Deletion der Exons 49 und 50 schloß sich Exon 52 direkt an Exon 48 an, und beim 11jährigen Patienten mit der Deletion von Exon 52 folgte auf Exon 50 das Exon 53, so daß in allen Fällen das zuvor verschobene Leseraster wieder in Ordnung – *in frame* – war.

Ob das neue Dystrophin tatsächlich die Duchenne-Dystrophie in den Kindern verlangsamen könnte, konnte nicht bewiesen werden, denn die wenigen Kubikzentimeter des einzigen behandelten Muskels am Schienbein waren einfach zu klein, um die Funktion dieses Muskels zu verbessern. Die Kraft des Muskels wurde zwar vor und nach der Behandlung gemessen, aber es wurde, wie erwartet, kein Unterschied festgestellt.

Alle Beteiligten an der Studie sind den vier kranken Kindern, die übrigens alle schon einen Rollstuhl brauchen,

und ihren Familien sehr dankbar, daß sie die Unannehmlichkeiten der Studie auf sich genommen haben, obgleich sie von Anfang an wußten, daß die Behandlung keinen therapeutischen Effekt bringen konnte.

Die holländischen Forscher bereiten jetzt die nächsten klinischen Studien vor, bei denen sie versuchen werden, das PRO051 systemisch in den ganzen Körper zu verabfolgen, so daß dieses potentielle Medikament alle Muskeln erreichen kann, einschließlich die der Lunge und des Herzens. Diese Studien werden sowohl kurz- als auch langfristig sein, d.h., einen Monat und sechs Monate dauern, wobei die ein halbes Jahr dauernde Studie erst begonnen wird, wenn die Einmonatsstudie erfolgreich war. Dabei werden verschiedene Mengen des AONs gegeben werden, um die wirksamste Dosis zu bestimmen, die möglicherweise schon die Duchenne-Symptome der Jungen deutlich verlangsamen wird. Inwieweit die Muskelfunktionen sich verbessern werden, wird von den Eigenschaften des Becker-Proteins abhängen, das nach dem Skippen entsteht.

Es werden noch weitere Studien mit Mäusen durchgeführt werden, um die Pharmakodynamik der AONs aufzuklären, d.h. um herauszufinden, was im einzelnen mit ihnen innerhalb der Muskelfasern geschieht. Bei einigen dieser Tierversuche werden die AONs subkutan (unter die Haut) gespritzt, weil dies später die beste Methode wäre, falls wiederholte Injektionen notwendig sein sollten. In ähnlichen Versuchen wurde schon gezeigt, daß die systemische Anwendung gut funktioniert, daß sogar die Herzmuskeln behandelt werden können und daß es keine ernstlichen Nebenwirkungen auf die Leberenzyme oder andere Blutwerte gibt.

Die vollständige Entwicklung des Skippens von Exon 51 ist nur der Beginn des Forschungsprogramms von Pro-sensa, das eine wirksame Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie zum Ziel hat. Die Entwicklung von weiteren AONs für andere Deletionen wird zügig folgen. Außer dem 2'O-Methyl-AON zu Skippen von Exon 51 hat die Firma schon die AONs zum Skippen der Exons 43, 44, 45, 46, 50, 52 und 53 entwickelt und in genügenden Mengen produziert. Zusammengenommen würden diese AONs die Behandlung von mehr als 65% aller Patienten mit Deletionen erlauben.

In der Zukunft wird es auch möglich sein, mit dieser Technik das Leseraster bei einigen Duplikationen wiederherzustellen oder wenn mehr als ein Exon geskippt werden muß. Zum Beispiel würde ein Multiexon-Skippen der 11 Exons 45 bis 45 Becker-Dystrophin in bis zu 63% der Duchenne-Jungen mit Deletionen erzeugen, wie es C. Beroud und Mitarbeitern in *Human Mutation* 28:196-202 (2007) nach theoretischen Überlegungen beschrieben hat. Der jetzige Stand der Behandlung von Duplikationen wurde von A. Aartsma-Rus und Mitarbeitern in *BMC Medical Genetics* 8:43-47 (2007) beschrieben, und eine Zusammenfassung des ganzen Gebietes des Exon-Skippings wurde von A. Aartsma-Rus und G-J. B. van Ommen in *RNA* 13:1-16 (2007) veröffentlicht.

Die neue Veröffentlichung im *New England Journal of Medicine* wurde begleitet von einem Kommentar auf den Seiten 2719-2722 von Eric P. Hoffman, der 1987 im Laboratorium von Louis Kunkel an der Harvard Universität das Protein Dystrophin fand, seine Struktur ermittelte und auch den Namen vorschlug. Er ist jetzt Direktor des Zentrums für genetische Medizin am Children's National Medical

Center in Washington. In seinem Kommentar beschreibt er sehr anschaulich die Exon-Skipping-Technik und zählt dann die Hürden auf, die nach dem Erfolg der holländischen Studie noch zu nehmen sind auf dem Weg zu einer Therapie, die, wie er sagt, den Kindern mit Duchenne den Rollstuhl ersparen wird:

(1) Jetzt müssen klinischen Studien mit systemischer Behandlung durchgeführt werden. Das wird der nächste Schritt in Leiden sein. (2) Es muß nachgewiesen werden, daß eine Langzeitbehandlung mit wiederholten größeren Mengen – mehreren Gramm! – AON ungefährlich ist. (3) Bei manchen Patienten wird es nicht genügen, nur ein Exon zu skippen, um ein Dystrophin zu erzeugen, das zu milden Becker-Symptomen führt. Multiexon-Skippen wird dann nötig werden mit AON-Cocktails. (4) Viele verschiedene AONs werden entwickelt werden müssen, für größere und kleinere Gruppen von Patienten und auch für einzelne mit seltenen Mutationen. Das wird dann zu einer *personalisierten molekularen Medizin* führen. Und (5), die FDA und andere Genehmigungsbehörden werden dieser nicht nur auf Duchenne begrenzten Entwicklung Rechnung tragen müssen und dürfen nicht für jedes AON oder jede AON-Kombination auf Jahre dauernden Zulassungsprozeduren bestehen, sondern sollten nur einmal relativ schnell die chemische Struktur genehmigen und nicht jede einzelne der vielen notwendigen Nukleotidsequenzen.

Kurz zusammengefaßt kann man sagen, daß diese erste und erfolgreiche klinische Studie und die sehr aktive Forschung an Universitäten und in Biotechnologie-Firmen zeigt, daß es in der nicht zu fern Zukunft mit dieser einen Technik eine wirksame Therapie für die meisten Duchenne-Jungen geben wird.

Klinische Exon-Skipping-Studie in England. Bei dem Treffen in Philadelphia wurde die klinische Phase-I-Exon-Skipping-Studie nicht diskutiert, die nach einigen Verzögerungen mit der Behandlung des ersten Patienten am 18. Dezember 2007 in England begonnen hat. Weil diese Studie so wichtig ist, wiederhole ich Teile meiner Zusammenfassung aus meinem Bericht über das 2006-PPUK-Treffen in London im Oktober 2006 mit einigen zusätzlichen neuen Informationen.

Das *MDEX-Konsortium* wurde im Januar 2005 gegründet mit der Aufgabe, die Exon-Skipping-Technik weiterzuentwickeln und klinische Studien durchzuführen. Die Mitglieder dieses Konsortiums sind: *Francesco Muntoni, Kate Bushby, Volker Straub, Dominic Wells, Jenny Morgan, George Dickson, Ian Graham, Mathew Wood, Steve Wilton, and Jenny Versnel*. Das britische Gesundheitsministerium, der „Medical Research Council“, das „Parent Project UK“, jetzt „ActionDuchenne“, und die britische Muskeldystrophiegesellschaft „Muscular Dystrophy Campaign“, sind ebenfalls im Konsortium vertreten.

Auf dem Treffen in London 2006 berichtete der Vorsitzende des MDEX-Konsortiums, *Francesco Muntoni* vom Imperial College, daß in dieser Studie versucht wird, Exon 51 zu skippen, weil dadurch etwa 20% der Duchenne-Jungen, nämlich die mit den Deletionen der Exons 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63, durch das Skippen dieses einen Exons 51 behandelt werden könnten.

In vorklinischen Versuchen wurden sechs verschiedene Antisense-Oligos, AONs, an Zellkulturen mit normalen menschlichen Muskeln getestet und auch an Kulturen mit

Muskeln von Duchenne-Jungen. Zusammen mit *Steve Wilton* wurden diese AONs auch an isolierten ganzen Muskeln untersucht und mit *Judith van Deutekom* an „humanisierten“ Mäusen, die in ihren Muskeln Dystrophin von Duchenne-Patienten enthielten. (Die Herstellung der humanisierten Mäuse wurde am 13. Dezember 2007 von der Zeitschrift *Journal of Biological Chemistry* von *Johan den Dunnen* und 9 Mitarbeitern online veröffentlicht.)

Die besten Ergebnisse wurden mit dem *Morpholino-AON H51A* erhalten, das in *Steve Wiltons* Laboratorium in Perth/Australien entwickelt worden war. *Dominic Wells* konnte in Experimenten an mdx-Mäusen zeigen, daß dieses Morpholino-AON genügend stabil für eine Langzeitbehandlung ist. Dieses Ergebnis wurde durch Zusammenarbeit von vier Laboratorien erhalten, zwei britischen, einem holländischen und einem australischen, es wurde im September 2007 in der Zeitschrift *Human Gene Therapy*, 18:789-810, veröffentlicht. Wie bereits erwähnt, haben die Morpholinos eine Struktur, die verschieden von den 2'-O-Methyls aber ihnen ähnlich ist, sie sind deswegen keine richtigen Nukleotide, doch der Einfachheit halber kürze ich sie hier auch mit AON ab.

Das Morpholino-AON gegen Exon 51, das in England verwendet wird, ist 30 Einheiten lang, es enthält die gesamte Basensequenz des von den Holländern verwendeten 2'-O-Methyl-AONs, das nur eine Länge von 20 Einheiten hat. Beide Antisense-Verbindungen binden sich ganz spezifisch an ihre komplementäre Sequenz des *exonic splicing enhancer*, ESE (Exon-Spleißverstärker) innerhalb von Exon 51 der Dystrophin-pre-mRNA und nirgendwo sonst. Diese Blockade des ESE verhindert die Bindung der SR-Proteine, die unerläßliche Teile des RNA-Spleißkomplexes sind. Die Folge davon ist, daß das angesteuerte Exon nicht in die mRNA eingebaut wird, d.h., es wird *geskippt*. Die ESE-Sequenzen in verschiedenen Genes haben trotz gewisser Ähnlichkeiten genügend verschiedene Strukturen, so daß die Genauigkeit des Exon-Skippings gesichert ist: Nur das angesteuerte Exon im angesteuerten Gen wird geskippt und kein anderes im selben Gen oder in irgendeinem anderen der mehr als 20.000 Gene des Menschen, weil es statistisch unwahrscheinlich ist, daß es im gesamten menschlichen Genom eine andere Sequenz gibt, die zu den beiden Antisense-Strukturen vollständig komplementär ist. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß diese genetische Technik genetische Nebeneffekte verursachen wird.

Drei Gruppen mit jeweils zwei 12 bis 18 Jahre alten Duchenne-Jungen werden an dieser britischen klinischen Studie teilnehmen. Inzwischen haben alle drei zuständigen Zulassungsbehörden, das "Gene Therapy Advisory Committee GTAC", die "Medical and Healthcare Product Regulatory Agency MHRA", und ein lokales Komitee ihre Zustimmung gegeben, so daß am 18. Dezember 2007 der erste Junge seine Injektionen bekommen konnte.

Für jede Patientengruppe wird eine der drei verschiedene Dosierungen 0,09, 0,297, and 0,9 mg Morpholino-AON in 0,9 ml Lösung angewendet, die in ein Gewebvolumen von nur einem Kubikzentimeter durch neun Injektionen direkt in einen der beiden *Extensor digitorum brevis*, EDB-Muskeln gespritzt. Dies sind kleine Muskeln an der Fußaußenseite, die nur die Zehen bewegen. Er kann also ohne Konsequenzen entfernt werden, falls es nicht akzeptable Nebenwirkungen geben sollte.

Intensive klinische Untersuchungen einschließlich von

Biopsien werden vor und 30 Tage nach den Injektionen durchgeführt. Die höchste Dosis wird nur verwendet werden, wenn die beiden niedrigeren Dosen nicht ausreichen sollten um neues Dystrophin zu erzeugen. Und die Studie wird nicht weitergeführt, wenn in den beiden ersten Patientengruppen eindeutige positive oder negative Resultate erhalten werden.

Wie bei der holländischen Studie wird auch diese kleine klinische Studie nur einen *proof of principle* liefern, den grundlegenden Beweis, daß die lokale Injektion eines Morpholino-AONs in einen einzigen menschlichen Muskel sicher ist und die Synthese von wenigstens etwas Dystrophin zur Folge hat. Man hofft, daß mit einigen der verschiedenen Dosierungen in mehr als 10% der Muskelfasern neues Dystrophin gebildet wird. Die teilnehmenden Jungen werden zwar keinen therapeutischen Vorteil in der jetzigen Studie haben, doch sie wird zuverlässige Ergebnisse liefern, um die Gesamtmenge an AONs abzuschätzen, die für eine systemische Behandlung eines Jungen nötig wären, bei der dann alle Muskeln erreicht werden können.

Janet Rose Christensen ist Vizepräsidentin für Zulassungs- und Qualitäts-Angelegenheiten der Firma AVI Bio Pharma Inc. in Portland, Oregon in den USA. Sie beschrieb die Rolle ihrer Firma bei der Exon-Skipping-Studie mit Duchenne-Patienten in England. Seit einigen Jahren hat diese pharmazeutische Firma Morpholino-Antisense-Oligos, abgekürzt *Morpholinos*, als genetische Medikamente gegen viele Herz-, Kreislauf-, Viren- und Leberkrankheiten entwickelt. Elf klinische Studien mit solchen Substanzen sind bereits mit über 300 Teilnehmern durchgeführt worden. Die Firma hat also große chemische und klinische Erfahrungen mit diesen Antisense-Medikamenten. Zusammen mit *Steve Wilton* in Perth in Australien wurden Sequenzen entwickelt, die in der Dystrophin-mRNA Exon-Skipping verursachen. Mit dem MDEX-Konsortium wird die Firma aktiv an der Phase-I-Studie beteiligt sein, die jetzt in England beginnt.

Das Morpholino, von der Firma AVI-4658 genannt, das in dieser Studie für das Skippen von Exon 51 verwendet wird, besteht aus 30 Untereinheiten, Nukleotiden. In vor-klinischen Versuchen konnte gezeigt werden, daß es Exon 51 wirksam skippen kann. Es lagert sich durch Watson-Crick-Bindung der Basenpaare A-U und G-C sehr spezifisch an seine komplementäre Sequenz in der Mitte des Exons 51 an. Dieses Morpholino besteht aus 1.144 Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff-, Sauerstoff- und Phosphor-Atomen. Es wird in den Laboratorien von AVI von speziell ausgebildeten Technikern unter Befolgung der GMP, "*good manufacturing procedures*" (gute Herstellungsmethoden) für die Produktion von Medikamenten ohne Verwendung von Automaten synthetisiert.

Bevor AVI-4658 in der britischen Studie verwendet werden kann, mußte es von der erwähnten englischen Behörde zugelassen werden und auch von der amerikanischen *Food and Drug Agency*, FDA. *Janet Christensen* beschrieb in Einzelnen die komplizierte Genehmigungs-prozedur in den Vereinigten Staaten:

Weil Duchenne-Dystrophie als eine „stark behindernde und lebensbedrohende Krankheit“ angesehen wird, kommt die FDA-Bestimmung 21 CFR 312, Teil E, zur Anwendung, in der es heißt: „...es ist zulässig, die gesetzlichen Vorschriften sehr flexibel anzuwenden, solange die Si-

cherheit und die Wirksamkeit garantiert sind. Dies bedeutet, daß die Ärzte und Patienten bereit sind, größere Risiken und Nebenwirkungen von Produkten zu akzeptieren, die lebensbedrohende und stark behindernde Krankheiten behandeln können, als sie es bei Produkten tun würden, die bei weniger ernstesten Krankheiten eingesetzt werden sollen.“

Janet Christensen schloß ihren Vortrag mit der Feststellung, „daß diese Vorschriften es der FDA erlauben, etwas weniger streng einen Antrag für eine Duchenne-Therapie zu beurteilen als einen Antrag für ein weiteres Medikament gegen Kopfschmerzen. Es ist jetzt wichtig, die erste klinische Studie mit diesem Morpholino erfolgreich durchzuführen. Wir hoffen, daß dies den Weg für einen viel schnelleren Genehmigungsprozeß für die vielen weiteren Morpholinos öffnen wird, die für die Behandlung aller Duchenne-Jungen gebraucht werden, für die Exon-Skippen infrage kommt.“

Erste Schritte zu einem Multiexon-Skippen. *Terence Partridge* vom Children's National Medical Center in Washington diskutierte zuerst einige Probleme, die es beim Exon-Skippen geben wird, und danach seine und seiner Kollegen Forschungsarbeiten mit dem Ziel, zwei Exons des dystrophischen Hundes gleichzeitig zu skippen. Damit könnte man zeigen, daß diese neue Technik auch denjenigen Jungen zur Verfügung stehen wird, bei denen mehr als ein Exon geskippt werden muß, um das verschobene Dystrophin-Leseraster zu normalisieren.

Exon-Skippen funktioniert in mdx-Mäusen ausgezeichnet, wenn die 2'O-Merhyl- und Morpholino-AONs gegen Exon 23 systemisch wiederholt in ihre Blutbahn gespritzt werden, wo sie neues Dystrophin in einigen Muskeln bis zu 50% der normalen Menge produzieren. Aber die Morpholinos wandern nicht in die Herzmuskeln und man weiß noch nicht warum das so ist. *Dominic Wells* vom Imperial College in London berichtete bei der PPUK-Konferenz in London 2006 über erste Experimente, mit denen gezeigt werden konnte, daß Morpholinos nach einer Ultraschallbehandlung ins Herz wandern können. Dr. Partridge und seine Kollegen arbeiten auch an diesem Problem.

Obgleich die mdx-Mäuse kein Dystrophin in ihren Muskeln haben, sind ihre dystrophischen Symptome sehr mild, sie sind deshalb kein ideales Versuchstier zum Studium der menschlichen Duchenne-Muskeldystrophie. Und weil sie nur etwa zwei Jahre leben, können Langzeitexperimente über mehrere Jahre mit ihnen nicht durchgeführt werden. Hunde jedoch leben viel länger als Mäuse, und die dystrophischen *golden retriever dogs* GRMD (Apportierhunde) sind auch körperlich behindert. Deshalb werden Experimente mit diesen Hunden wahrscheinlich Ergebnisse liefern, die ähnlich sind wie die, die man bei klinischen Studien an Duchenne-Patienten erwarten kann.

Versuche mit GRMD-Hunden bringen noch einen anderen Vorteil: Die beiden klinischen Studien in Holland und in England zum Skippen von Exon 51 in Duchenne-Jungen haben schon und werden noch beweisen, daß Exon-Skippen wirklich in Patienten funktioniert. Bei diesen Studien wird nur ein einziges Exon geskippt. Aber etwa 50% aller Duchenne-Dystrophien, die in der Duchenne-Datenbank der Universität Leiden registriert sind, werden von Mutationen (Deletionen, Duplikationen und

Punktmutationen) verursacht, die es erfordern, zwei oder mehr Exons zu skippen, um das Leseraster zu normalisieren. Und einige der Multiexon-Skipplings würden eine Therapie für ziemlich große Gruppen von Patienten sein. Wie bereits erwähnt, könnte man nach theoretischen Überlegungen z.B. durch das Skippen der 11 Exons 45 bis 55 eine Becker-Dystrophie mit sehr milden Symptomen in 63% aller Duchenne-Jungen mit Deletionen erzeugen. Und weil die dystrophischen Hunde ein Doppelexon-Skippen brauchen, würden Experimente mit ihnen den Weg zu einer Behandlung dieser Duchenne-Jungen mit den schwierigen Mutationen ebnen.

Die dystrophischen Hunde haben eine Mutation an der Spleißstelle von Exon 7 im Dystrophin-Gen, die eine Deletion von Exon 7 in der mRNA verursacht mit einer Leseraster-Verschiebung und einem vorzeitigen Stopp-Codon gleich danach. Ein Skippen der beiden flankierenden Exons 6 und 8 würde das Leseraster wieder normalisieren.

Verschiedene Mengen eines Cocktails aus drei Morpholino-AONs – zwei verschiedene gegen Exon 6 und eines gegen Exon 8 – wurden lokal in den Tibialis-anterior-Muskel von jungen erwachsenen GRMD-Hunden injiziert. Zwei Wochen danach wurden Biopsien durchgeführt und in dem dabei erhaltenen Muskelgewebe konnte neues Dystrophin in allen Muskelfasern um die Injektionsstelle herum nachgewiesen werden konnte. Und die Muskelstruktur sah fast ganz normal aus.

Dr. Partridge und seine Mitarbeiter arbeiten mit *Shin'ichi Takeda* in der General Animal Research Facility (Allgemeines Tierforschungsinstitut) in Tokio zusammen, wo sie systemische Injektionen in die Blutbahn der Hunde mit sehr guten Ergebnissen durchführen konnten. Die Einzelheiten dieser Experimente sind noch nicht veröffentlicht, deswegen kann über sie hier noch nicht berichtet werden.

Exon-Skippen mit Morpholino-AONs hat eine Reihe von Vorteilen: (1) Sie erreichen alle Muskeln des Körpers, aber immer noch mit Ausnahme des Herzens; (2) sie sind sehr aktiv wirksam; (3) sie scheinen nicht gefährlich zu sein; (4) sie werden im Körper nicht abgebaut, sondern im Urin ausgeschieden; (5) sie wirken nur kurzzeitig, deshalb werden wiederholte Behandlungen notwendig sein, aber es wäre deshalb auch möglich, die Behandlung zu beenden, falls eine bessere Therapie zur Verfügung steht; und (6), sie bringen keine Immunprobleme mit sich, denn sie enthalten kein fremdes Protein, und das neue Dystrophin-Protein wird nur innerhalb der Muskeln gebildet.

Zwar funktionieren Morpholino-AONs gut in einem großen Säugetier wie dem Hund mit einer dem Menschen ähnlichen Körperstruktur, doch dies ist keine Garantie dafür, daß diese potentiellen Medikamente genauso gut und über eine genügend lange Zeit in Duchenne-Jungen wirksam sein werden. Die meisten Forschungsarbeiten der letzten Jahre sind mit den Morpholino- und den 2'O-Methyl-AONs durchgeführt worden. Eine zukünftige und endgültige Therapie kann sehr wohl eine Mischung beider AON-Typen erfordern, um den Skipping-Effekt zu optimieren und um gleichzeitig toxische Nebenwirkungen so niedrig wie möglich zu halten. Aber es können auch noch unbekannte Probleme auftreten, die man vielleicht mit anderen AON-Cocktails oder sogar nur mit anderen Typen von AONs lösen kann.

Aber wann wird Exon-Skipping für die Duchenne-Jungen fertig sein? Ich fragte *Gertjan van Ommen* von der Universität Leiden genau dies in einem Interview im Januar 2004. Seine ziemlich lange Antwort, auf 7 Worte gekürzt, war: „Sie werden in 10 Jahren fertig sein.“ Die zehn Jahre waren nicht als wissenschaftlich genaue Zeitangabe gemeint. Das war nur eine Schätzung eines sehr bekannten Wissenschaftlers, der mit dieser neuen Technik arbeitet und der ganz genau weiß, wie wenig und langsam man mit jedem Forschungsschritt vorankommt und was alles schief laufen kann. Jetzt, Anfang 2008, könntet Ihr, die Eltern, und Eure kranken Kinder annehmen, daß noch 6 Jahre der anfänglichen 10 übrig sind, wenn Ihr die 10 Jahre wirklich wörtlich nehmt. Das dürft Ihr aber nicht! Die Zahl der übriggebliebenen Jahre könnte sehr wohl 8, 9, selbst wieder 10 Jahre sein, oder wenn alles gut geht, auch nur 4 oder 3.

Und mir wurde dann manchmal gesagt, daß ich keine Zeitschätzung machen sollte, denn Ihr würdet diese Zahlen wirklich wörtlich nehmen und die Monate und Tage rückwärts zählen. Andererseits wissen viele von Euch, wie das reale Leben aussieht und auch wie es in der Wissenschaft vor sich geht. Deshalb werdet Ihr das alles verstehen und sicher auch die folgende Stellungnahme schätzen, die mir *Francesco Muntoni* nach Absprache mit seinem Kollegen *Gertjan van Ommen* geschickt hat:

„Ich weiß ganz genau, wie wichtig es ist, den Eltern die Wahrheit zu sagen. Sie können tatsächlich erwarten, daß die Forscher während der nächsten 6 Jahre – nachdem sie Exon 51 geskippt haben – weitere systemische Studien zum Skippen mehrerer anderer Exons durchführen werden. Sie müssen aber auch verstehen, daß die Suche nach einer Therapie niemals aufhören wird. Es werden z.B. auch immer wieder neue Antibiotika entwickelt. Ich denke nicht, daß wir 6 Jahre warten müssen, bevor wir die ersten therapeutischen Erfolge sehen, aber andererseits bin ich auch ziemlich sicher, daß die Strukturen der AONs und die Art ihrer Anwendung, wie wir sie jetzt haben, dann als veraltet angesehen werden. Deswegen ist es wahrscheinlich, daß während der nächsten 6 Jahre wirksame und zuverlässige Methoden zur wiederholten Injektion von mehreren AONs ausgearbeitet werden, und das wird hoffentlich positive klinische Konsequenzen haben. Ich bin also überzeugt, daß wir, die Wissenschaftler, bessere chemische Strukturen und therapeutische Methoden untersuchen werden, daher sollten wir nicht überrascht sein, wenn wir in weiteren 6 Jahren neue und verbesserte AONs anwenden möchten.“

Das was ich betonen möchte ist, daß es ganz breite Wege gibt, nicht nur einen einzigen Pfad, mit einem einzigen Ziel. Und wenn alles in der richtigen Richtung vorangeht, wird auf diesen Wegen viel passieren. Manchmal passiert etwas viel schneller als wir es erwartet haben, und solche explosiven Ideen sind immer sehr willkommen aber vollkommen unvorhersehbar. Wir werden sehr viel von den jetztigen ersten AON-Studien lernen, und das wird positive Auswirkungen haben auf die Anwendung, den Transport der AONs in die Muskeln und ihre therapeutische Wirkung, so daß die Wartezeit deutlich kürzer wird für alle, die so darauf hoffen.“

Transfer des Dystrophin-Gens, erster klinischer Versuch mit einem Virus-Vektor. Der folgende Text folgt z.T. Informationen aus den Vorträgen von *Scott*

McPhee von der Firma Asklepios Biopharmaceuticals und *Xiao Xiao* von der University of North Carolina, beide in Chapel Hill im Staat North Carolina, die bereits in meinen Berichten über die Treffen in Cincinnati und London 2006 enthalten sind. Diese früheren Informationen sind hier mit neuen Daten aktualisiert worden, die *Christopher Shilling* vom Zentrum für Muskel-Gen-therapie im Children's Research Institute in Columbus/Ohio auf der Konferenz in Philadelphia mitgeteilt hat.

Der Transfer (die Übertragung) eines modifizierten Dystrophin-Gens mit einem Virus-Vektor (Transporter-Virus) in die Muskelzellen ist eine der Strategien für eine Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie. Die *adeno-assoziierten Viren*, AAV, sind Vektoren mit wichtigen Vorteilen. Sie haben eine starke Wirkung in Muskeln und im Herzen, und sie können wahrscheinlich zur Behandlung von allen Duchenne-Patienten unabhängig von ihren Mutationen verwendet werden. Vor-klinische *proof-of-principle*-Studien mit dystrophischen Mäusen und Hunden haben zur Entwicklung eines Vektors mit einem Minidystrophin-Gen für den ersten klinischen Versuch dieser Gentherapiemethode beigetragen. Der hierzu verwendete Vektor ist ein AAV des Serum-typs 2.5, ein *BioStrophin™ biological nano particle* (biologisches Nano-Teilchen), das von der Firma Asklepios entwickelt wurde. Diese Viren können von den Zellen, die sie infizieren, nicht vermehrt werden, weil die meisten ihrer eigenen Gene entfernt wurden. Diese Modifikation schaffte Raum für die kodierenden (Informationen übertragenden) Sequenzen eines therapeutischen Gens, das transportiert werden soll.

Die AAV-Vektoren sind jedoch ziemlich klein, sie können nur fremdes genetischen Material einbauen, das nicht länger als etwa 5.000 Basenpaare ist. Deswegen mußte die cDNA des normalen Dystrophins, die aneinandergehängten 79 Exons ohne die Introns, die etwa 14.000 Basenpaare lang ist, stark verkürzt werden, damit sie in den kleinen Vektor paßt. Die Übertragung einer solchen Minigen-cDNA würde deshalb die Duchenne-Muskeldystrophie nicht heilen sondern sie nur in die viel langsamer voranschreitende Becker-Dystrophie abändern.

Aus diesen Gründen wurde in die Vektoren, die in dieser ersten Studie verwendet werden, die Minidystrophin-Genkonstruktion *Delta-3990*, eingebaut, die Teile des Exons 17 und alle Exons von 18 bis 59 und von 70 bis 79 des normalen Gens nicht mehr enthält. Das bedeutet, daß das erwartete Becker-Dystrophin etwa nur ein Drittel so lang sein wird wie das normale Protein. Im Jahr 1990 wurde ein 61 Jahre alter Becker-Patient diagnostiziert, der noch gehen konnte und der dieses verkürzte Dystrophin-Gen in seinen Muskeln hatte.

Diese Phase-Ia klinische Studie wird jetzt unter der Leitung von Dr. *Jerry Mendell* an der Kinderklinik der Ohio State University in Columbus durchgeführt. Sie wurde von der Federal Drug Agency FDA genehmigt, nachdem der AAV-Minidystrophin-Vektor an Versuchstieren auf Sicherheit und Toxizität (Giftigkeit) getestet wurde. Die Studie begann am 26. März 2006, als der erste Patient seine erste Injektion des BioStrophins an drei 10,5 cm voneinander entfernten Stellen des Bizepsmuskels eines Armes bekam, während in den Bizeps des anderen Armes nur physiologische Salzlösung gespritzt wurde. Die Studie wird doppelblind durchgeführt, d.h., alle Beteiligten, die

Patienten, die Wissenschaftler, Ärzte und Betreuer, erfahren erst nach dem Ende der ganzen Studie, in welchen Bizepsmuskel die Vektoren gespritzt wurden.

Es wird nicht erwartet, daß es für die Jungen in dieser ersten Studie bereits eine therapeutische Wirkung gibt, denn es soll nur prinzipiell festgestellt werden, ob diese Art der Gentherapie nicht nur in den Skelettmuskeln von Mäusen und Hunden wirksam ist, sondern auch in menschlichen Muskeln, es ist also wieder ein *proof of principle*. Außerdem werden Sicherheitsdaten erhalten und die Dosis bestimmt, die zu einer Produktion von Minidystrophin im Muskel führt, sowie geprüft, ob sich gegen das neue Dystrophin oder das Vektormaterial eine Immunabwehr entwickelt.

An der Studie nehmen sechs Duchenne-Jungen teil, die mindestens fünf Jahre alt sind und deren Mutation im Dystrophin-Gen genau bekannt ist. Alle sechs haben bereits ihre Injektionen erhalten. Zwei verschiedene Dosen wurden für jede der beiden Gruppen aus drei Patienten gegeben. Nach vier Wochen wurden von vier der Patienten Muskelproben nach Biopsien aus der Injektionsstelle erhalten, von den zwei anderen nach 12 Wochen.

Es sind keine Nebenwirkungen aufgetreten, die auf die Gentherapie zurückgeführt werden könnten, d.h., die Methode wird gut vertragen. Da die Studie doppelblind durchgeführt wird, werden die Biopsieproben bis zum Ende des ganzen Versuchs eingefroren gelagert, dann erst werden die sie auf neu gebildetes aber verkürztes Dystrophin getestet. Sobald alle Ergebnisse vorliegen und ausgewertet sind, werden sie voraussichtlich Anfang 2008 veröffentlicht.

Außerdem wurde begonnen, diese Methode auch an Hunden und Affen anzuwenden. Dabei wurden bereits ermutigende Ergebnisse des Gentransfers und der Neubildung von Dystrophin erhalten. Eine „Brücken“-Phase-Ia-Studie mit Duchenne-Jungen soll 2008 und 2009 durchgeführt werden, bei der ganze Gliedmaßen eine regionale Infusion der Vektoren in die vorübergehend blockierte Blutzirkulation bekommen. Diese regionale Anwendung wird möglicherweise bei den Patienten schon eine therapeutische Wirkung zeigen und ihnen eine Verbesserung ihrer Lebensqualität bringen. Und schließlich ist eine Phase-II/III-Studie mit einer systemischen Ganzkörperbehandlung vorgesehen, die mit einer größeren Zahl von Patienten 2009 und 2010 durchgeführt werden könnte.

Gentransfer mit Perizyten, adulten Muskelstammzellen: *Giulio Cossu* vom Stammzellen-Institut am Hospital San Raffaele in Mailand beschrieb seine und seiner Kollegen aussichtsreichen Arbeiten an einer Duchenne-Therapie mit Stammzellen.

Für eine wirksame Stammzelltherapie der Duchenne-Dystrophie braucht man eine sichere und ethisch akzeptable Quelle größerer Mengen von adulten (ausgewachsenen) Muskelstammzellen, die nur neue Muskelzellen erzeugen und keine anderen unerwünschten Zellen oder gar Tumoren. Und es sollte möglich sein, diese Stammzellen systemisch in den Blutkreislauf zu injizieren, von wo sie aus alle Muskeln erreichen würden. Dann haben sie die Wände der Blutgefäße der Muskelzellen zu durchqueren und müssen in den Muskeln bleiben, ohne dort Probleme anzurichten. Diese Bedingungen scheinen die *Mesoangioblasten* zu erfüllen. Dies sind adulte Stammzellen, die

sich an der Außenseite von kleinen Blutgefäßen innerhalb des Muskelgewebes befinden und auch daraus isoliert werden können.

Die italienischen Forscher arbeiteten zunächst mit einer Maus, die eine Form der Gliedergürtel-Muskeldystrophie hat, in denen ein Protein des Dystrophin-assoziierten Komplexes fehlt. Nach Injektionen von Mesoangioblasten aus normalen Mäusen, wanderten diese gesunden Stammzellen in alle Skelettmuskeln der lebenden Mäuse und bewirkten, daß mehr als 80% der normalen Menge des fehlenden Proteins *alpha-Sarkoglykan* wieder gebildet wurde.

Für eine mögliche Duchenne-Therapie durch diese neue Technik müßte das intakte Dystrophin-Gen aus dem Muskelgewebe eines gesunden Spenders in die Mesoangioblasten eines Patienten *ex-vivo* (im Laboratorium) mit bekannten Vektoren übertragen werden. Einige dieser transduzierten Zellen, die dann das normale Dystrophin-Gen enthalten, müßten vermehrt und schließlich in die Blutzirkulation des Patienten zurückinjiziert werden. Solch eine *autologe* Behandlung würde immunologische Probleme vermeiden. Man könnte aber auch Mesoangioblasten von einem gesunden Verwandten verwenden. Doch bei einer solchen *heterologen* Behandlung müßte man dauernd immununterdrückende Medikamente geben.

Die Mesoangioblasten, die für diese Experimente verwendet wurden, waren aus den Blutgefäßwänden von Mäusen und Hunden isoliert worden. Für den nächsten Schritt zur Entwicklung einer therapeutischen Methode für Duchenne-Patienten mußte man diese Stammzellen aus menschlichem Gewebe isolieren, um sie dann in den Tierversuchen einzusetzen. Dr. *Cossu* und seine Mitarbeiter haben das mit Erfolg getan und ihre neuen Ergebnisse im Februar 2007, in der Zeitschrift *Nature Cell Biology*, Band 9, Seiten 255-257, veröffentlicht.

Danach suchten die Forscher nach ähnlichen Stammzellen in den Wänden der kleinen Blutgefäße aus menschlichem Muskelgewebe, das aus diagnostischen Biopsien stammte. Sie fanden dort solche Zellen, aber ihre Eigenschaften waren etwas von denen der Mesoangioblasten verschieden. Diese jetzt *Perizyten* genannten Zellen hatten genau die Eigenschaften, die Stammzellen haben sollten, die für eine Duchenne-Therapie bestimmt sind:

(1) Sie lassen sich einfach aus menschlichem biologischem Material wie Muskelgewebe isolieren; (2) sie können im Laboratorium stark vermehrt werden bis zu Mengen, die für eine systemische Behandlung von Kindern notwendig wären; (3) es ist möglich, in sie normale Dystrophin-Sequenzen mit Virenvektoren hineinzubringen; (4) sie können aus der Blutzirkulation in die Muskeln wandern, und (5), sie entwickeln sich zu funktionierenden Muskelzellen im lebenden Muskelgewebe.

Die wichtigsten Ergebnisse wurden in Experimenten mit *mdx*-Mäusen erhalten, die also kein Dystrophin in ihren Muskeln haben, denen aber zusätzlich noch ihr Immunsystem durch eine genetische Manipulation zerstört worden war. Einen Monat nach drei systemischen Injektionen von normalen, d.h. nicht-dystrophischen, Perizyten in die Beinarterien von fünf dieser Mäuse wurden 200 bis 450 neue dystrophinhaltige Muskelfasern pro Standardquerschnitt gefunden. Wenn menschliche Perizyten von Duchenne-Patienten, also mit mutierten Dystrophin-Genen, zuerst mit Virusvektoren behandelt wurden, die Minidystrophin-Gene enthielten, und dann ebenso in diese

Mäuse injiziert wurden, konnten 190 bis 320 Muskelfasern mit Minidystrophin in den untersuchten Muskeln nachgewiesen werden. Die Funktion der Muskeln in den behandelten Mäusen hatte sich dadurch deutlich verbessert.

Im nächsten Schritt zu einer Anwendung beim Menschen isolierte Dr. Cossus Team Mesoangioblasten von normalen und dystrophischen Hunden, vermehrte sie in Zellkultur und injizierte sie in die Hinterbein-Arterie dystrophischer Hunde. Die Zellen aus den Hunden konnten nicht genau charakterisiert werden, so daß man nicht wußte, ob sie genau die gleichen Eigenschaften besaßen wie die menschlichen Perizyten. Deswegen werden sie hier wieder Mesoangioblasten genannt.

Vier Hunde wurden mit fünf monatlichen systemischen Injektionen von autologen Zellen behandelt, die von jedem der vier Hunde stammten, und in die das Gen, die cDNA, eines Mikrodystrophins mit einem Virusvektor im Laboratorium übertragen worden war. In diesem Fall war keine Immununterdrückung notwendig. Doch entgegen der Erwartung war diese Behandlung erfolglos. Möglicherweise war das transferierte Dystrophin zu kurz, um in einem großen Tier wie einem Hund die Muskelfunktion zu erhalten.

In einer heterologen Behandlung bekamen sechs andere Hunde in ähnlicher Weise Injektionen mit Spenderzellen von gesunden Hunden aber zusammen mit Cyclosporin zur Unterdrückung einer Immunabwehr. Diese Behandlung führte zu neuem normalem Dystrophin-Protein in vielen Muskeln der dystrophischen Hunde und zu einer Verbesserung der Muskelfunktion. Bei einem der Tiere wurden die Zellen über ein Katheter (ein relativ langes Kunststoffröhrchen) in die Aorta (die Halsschlagader) injiziert. Dies führte zu einer weiten Verteilung der Mesoangioblasten in alle Muskeln.

Das Ergebnis dieser Stammzellinfusionen war dramatisch: Dieser letztgenannte Hund zeigte eine deutliche Verbesserung seiner Dystrophie, und er konnte fünf Monate nach der letzten Injektion gut laufen, während die anderen behandelten Tiere sich weniger gut regenerierten.

Die Forscher wollen diese Experimente mit autologen Zellen wiederholen, wobei in diese Zellen Minidystrophin-Gene übertragen werden anstelle der kürzeren Mikrogene.

Geplant ist auch, die genetische Exon-Skipping-Methode anzuwenden, die in Frankreich von *Luis García* entwickelt wurde.

Dr. Cossu beendete seinen Vortrag mit folgender Stellungnahme: „Wir schlagen jetzt eine klinische Studie mit Duchenne-Patienten vor. Doch zunächst müssen wir Langzeitstudien mit den Hunden durchführen, die Toxizität der Zellen prüfen und auch die menschlichen Zellen unter Bedingungen isolieren, die für klinische Anwendungen vorgeschrieben sind. Diese Arbeiten haben schon begonnen und werden etwa ein Jahr dauern. In der geplanten klinischen Studie werden drei Patienten lokale Injektionen in einen einzigen Muskel bekommen, um zu sehen, ob diese menschlichen Stammzellen wirklich menschliches Dystrophin in einem menschlichen Muskel produzieren. Danach werden drei weitere Patienten systemische Injektionen von Spenderzellen bekommen zusammen mit Medikamenten gegen eine Immunabwehr gegen die fremden Zellen.“

Die erste und wichtigste Frage, die beantwortet werden muß, ist die nach der Langzeitsicherheit der Behandlung. Wir wissen bereits, daß nichts mit den Mäusen und Hunden passiert ist, aber wir wissen nicht, was mit den Jungen geschehen wird, wenn wir sie in der klinischen Studie wirklich behandeln. Die zweite Frage ist die, ob die Muskelkraft erhalten bleibt oder vielleicht sogar erhöht wird. Wir haben inzwischen eine neue Methode entwickelt, mit der wir die Kraft von einzelnen Muskelfasern messen können. Und wir werden natürlich alle Empfehlungen für klinische Studien befolgen, die vom TREAT-NMD-Programm ausgearbeitet werden.

Diese Stammzellbehandlung steckt noch in ihren Kinderschuhen. Wir wissen nicht, wie wirksam sie sein wird und wir kennen nicht ihre Risiken. Schließlich werden wir große Mengen von Zellen in die Kinder injizieren, da könnten ernste Probleme auftreten. Die Behandlung selbst ist kompliziert, sie fertig zu entwickeln wird einige Jahre dauern, und das wird viel kosten. Aber sie bietet eine Aussicht auf Erfolg und wir sind begeistert von ihren Möglichkeiten. Wir werden sie an Kindern ausprobieren, denn sie wird zu einer richtigen Heilung führen.“

Die pharmakologischen Wege.

Hochregulieren von Utrophin als Ersatz von Dystrophin. Es gibt vier große Herausforderungen, denen sich jeder stellen muß, der versucht, eine Therapie für die Duchenne-Dystrophie zu finden: (1) Dystrophin ist ein riesiges Protein, dessen Funktion wiederhergestellt werden muß; (2) um die Muskeln wieder funktionsfähig zu machen, müssen wenigstens 20% der normalen Menge neues Dystrophin entstehen, oder wenn nicht dieses Protein, dann ein anders wie Utrophin, das es ersetzen kann; (3) dies muß in allen Skelettmuskeln passieren, auch in denen der Lungen und des Herzens; und (4); eine Immunreaktion gegen das neue Protein muß vermieden werden.

Als *Kay Davies*, die jetzt an der Universität Oxford arbeitet, vor mehr als 20 Jahren versuchte, das Duchenne-Gen zu finden, fanden sie an seiner Stelle das Protein *Utrophin* und sein Gen. Utrophin ist ein Protein mit einer Struktur und einer Funktion, die dem Dystrophin sehr ähnlich sind. Beim Menschen liegt sein Gen auf dem Chromo-

som 6, es hat 75 Exons und ist etwa eine Million Basenpaare lang. Wie das Dystrophin verbindet es die F-Aktin-Struktur der Zellen mit einem Proteinkomplex in den Membranen, der auch so ähnlich aussieht, wie der Dystrophin-assoziierte Komplex. Utrophin findet sich in vielen Körpergeweben, auch in Muskeln, aber hier ist es auf die Regionen konzentriert, an denen die motorischen Nerven die Muskelmembranen kontaktieren, an den *motorischen Endplatten*.

In Duchenne-Patienten verteilt sich das Utrophin von den motorischen Endplatten aus über die Muskelmembranen. Je mehr Utrophin ein Patient hat, desto später braucht er einen Rollstuhl. Das bedeutet, daß eine größere Menge Utrophin die Duchenne-Dystrophie erträglicher machen würde. Während der Entwicklung in der 12. Schwangerschaftswoche enthalten die Muskeln sowohl Utrophin als auch Dystrophin. Danach verschwindet das Utrophin von den Zellmembranen, und bei der Geburt haben die Mus-

kellmembranen nur noch Dystrophin. Utrophin ist also die fötale (vorgeburtliche) Form des Dystrophins. Das bedeutet, daß man eine Duchenne-Therapie hätte, wenn es gelänge, das Entwicklungsprogramm für Utrophin wiederzuleben.

Mdx-Mäuse, deren Utrophin-Gen experimentell zerstört wurde, die also weder Dystrophin noch Utrophin in ihren Muskeln haben, zeigen Duchenne-artige Symptome, sie sterben früh im Gegensatz zu „normalen“ mdx-Mäusen, deren Muskeln viel weniger geschädigt sind als bei Duchenne-Jungen, obgleich sie kein Dystrophin haben.

In anderen Experimenten mit transgenen mdx-Mäusen, die Utrophin-Minigene in ihren Keimzellen hatten, die mit einer Technik dort eingebaut wurden, die man nicht beim Menschen anwenden kann, wurde gezeigt, daß Utrophin, wenn es in größeren Mengen vorhanden ist, Dystrophin ersetzen kann. Wenn die Menge von Utrophin um das Drei- bis Vierfache erhöht wurde, konnte die Entwicklung der relativ leichten Duchenne-Symptome der mdx-Mäuse ganz vermieden werden.

Daher sollte man für eine mögliche Duchenne-Therapie versuchen, die geringe Menge Utrophin durch Hochregulieren seines Gens zu erhöhen. Das Gen hat zwei Startstellen, zwei Promoter-Sequenzen, an denen sich Signal-Verbindungen anlagern, wenn die Synthese des Utrophin-Proteins beginnen soll. Der eine Promoter startet die Produktion der häufigeren der beiden ähnlichen Formen des Utrophins, des *A-Utrophins*, das dann nur in relativ kleinen Mengen an den neuromuskulären Endplatten aller Muskeln vorkommt. Der andere Promoter startet die andere Form, das *B-Utrophin* in den Blutkapillaren.

Die Forscher versuchten dann, diesen Signalprozeß so zu beeinflussen, daß mehr A-Utrophin entsteht, das dann zu den Muskelzellmembranen der Duchenne-Jungen geleitet wird, wo es hoffentlich die vom Dystrophin verlassenen Stellen einnimmt.

Es stellte sich aber bald heraus, daß es eine schwierige und teure Aufgabe war, eine Substanz zu finden, die Utrophin hochregulieren kann und sie dann zu einem wirksamen Medikament für eine Duchenne-Therapie zu entwickeln, eine Aufgabe, die sich nicht in einem Universitätslaboratorium lösen läßt. Deswegen gründete Dr. *Davies* mit anderen zusammen die Firma VASTox plc in Abington bei Oxford, die jetzt *Summit plc* heißt.

In dieser Firma sind bis Ende 2007 über 30.000 chemische Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet worden, die Aktivität des Utrophin-Gens in Zellkulturen von mdx-Mäusen hochzuregulieren.

Verwendet wurde dazu das Licht-erzeugende Enzym Luziferase aus Glühwürmchen in einem neu entwickelten Reagenziensystem, mit dem sich die Menge des Utrophin-Proteins messen läßt. Bis Juli 2007 sind 31 aussichtsreiche Substanzen gefunden worden, die die Menge des Luziferins um ein Mehrfaches vergrößern können. Diese Substanzen werden jetzt optimiert und in lebenden mdx-Mäusen getestet mit dem Ziel, ihre Wirkung weiter zu erhöhen und sicherzustellen, daß das Utrophin in allen Muskeln der Tiere genügend hochreguliert wird. Es werden auch zusätzliche Tests mit dystrophischen Zebrafischen durchgeführt, durch die möglicherweise noch andere potentielle Medikamente zur Behandlung von Duchenne-Dystrophie identifiziert werden können.

Zwei der früh gefundenen aktiven Substanzen, VOX A

und VOX B, sind schon systemisch durch intraperitoneale Injektionen (in den Unterleib) von Mäusen getestet worden. Nach 12 Wochen wöchentlicher Injektionen war das Utrophin in den untersuchten Skelettmuskeln der Mäuse hochreguliert worden mit Anzeichen einer Funktionsverbesserung. Nach weiterer Optimierung zeigte eine für die klinische Entwicklung ausgewählte Verbindung, SMT C1100, daß sich mit ihr die Muskeldegeneration reduzieren ließ und auch die Fibrose, die Fettablagerung und die chronische Entzündung, so daß die Tiere ihre Muskelfunktion deutlich regenerieren konnten. Nach 28 Tagen täglicher Behandlung sind keine Nebenwirkungen aufgetreten, d.h., SMT C1100 scheint sicher zu sein. Falls weitere vor-klinische toxikologische Untersuchungen erfolgreich verlaufen und die Synthesemethoden sich verbessern lassen, könnten die ersten Sicherheitsstudien mit gesunden Freiwilligen Mitte 2008 beginnen und mit Duchenne-Patienten wahrscheinlich Anfang 2009.

Biglykan kann Utrophin hochregulieren. Beim Treffen in Cincinnati 2006 beschrieb *Justin Fallon* von der Brown University in Providence im Staat Rhode Island, Arbeiten in seinem Laboratorium über das Protein *Biglykan*. Ein Jahr später, 2007 in Philadelphia, präsentierte er neue Ergebnisse, die zeigten, daß Biglykan Utrophin dramatisch hochreguliert.

Biglykan kommt während der Entwicklung an der Außenseite der Skelett- und Herzmuskellmembranen vor, wo es mit seinen beiden Enden die Proteine Alpha- und Gamma-Sarkoglykan miteinander verbindet, die beide Komponenten des Dystrophin-Proteinkomplexes sind. Biglykan ist wichtig für die Regulation vieler Signal- und Strukturproteine in den Muskelzellmembranen.

In Experimenten mit nicht-dystrophischen Mäusen, deren Gen für Biglykan inaktiviert war, wurde gefunden, daß ohne Biglykan viele Proteine des Dystrophin-Komplexes verschwinden. Eine Behandlung dieser Mäuse mit lokalen und systemischen Injektionen von rekombinantem (durch Gentechnik künstlich hergestelltem) menschlichem Biglykan führte zum Wiedererscheinen des Proteins Beta-Syntrophin, das zum Dystrophin-Komplex gehört. Dies ist ein Zeichen dafür, daß dieser Proteinkomplex wieder vollständig war.

Die lokale und systemische Behandlung von mdx-Mäusen mit menschlichem Biglykan verbesserte viele Symptome der nur leicht dystrophischen Tiere, die kein Dystrophin in ihren Muskeln haben. Das überraschendste Ergebnis war jedoch, daß zwei bis drei Wochen nach einer einzigen systemischen Injektion die normale geringe Menge von Utrophin in den behandelten Muskeln um etwa 2,5-fach hochreguliert war.

Der nächste Schritt war zu prüfen, ob eine Behandlung mit Biglykan die Muskelfunktion von mdx-Mäusen verbessert. Nach drei Monaten wiederholter systemischer Injektionen von menschlichem Biglykan waren die Muskeln der Mäuse ohne Dystrophin viel widerstandsfähiger gegen Schäden, die durch forcierte (erzwungene) Kontraktionen und Verlängerungen der Muskeln verursacht wurden.

Da Biglykan beim Menschen während der Entwicklung vorkommt, würde seine Verwendung als Medikament kaum immunologische Abwehrreaktionen auslösen. Da es außerhalb der Muskelzellen aktiv ist, muß es dafür nicht die Muskelzellmembranen durchqueren. Die Alpha- und

Gamma-Sarkoglykane, die beiden Proteine, and die sich das Biglykan bindet, kommen nur außen an den Skelett- und Herzmuskeln vor. Das bedeutet, daß Biglykan vor allem in diesen beiden Muskeltypen aktiv sein wird und deshalb nur wenige Nebeneffekte verursachen kann.

Die Experimente mit Tieren werden fortgesetzt, um die Behandlungsbedingungen zu optimieren. Es wird etwa 12 bis 18 Monate dauern, bis genügend Biglykan in klinischer Reinheit hergestellt ist, so daß mit diesem potentiellen Duchenne-Medikament in etwa zwei Jahren eine Phase-I-Studie an Duchenne-Jungen durchgeführt werden kann.

Durchlesen durch vorzeitige Stoppcodons mit PTC124:

Langdon Miller von der Firma PTC Therapeutics in South Plainfield, New Jersey, aktualisierte mit neuen Informationen über die Phase-II klinische Studie von PTC124 die Ergebnisse, die ich bereits in meinen Berichten über die 2006-Konferenzen in Cincinnati und London zusammengefaßt hatte.

Etwa 13 bis 15% der Duchenne-Jungen haben eine Punktmutation in ihrem Dystrophin-Gen, die ein einzelnes Aminosäure-Codon in eines der drei Stoppcodons, TGA, TAG oder TAA abgeändert hat. In der mRNA werden diese Codons zu UGA, UAG und UAA, die die Proteinsynthese vorzeitig abbrechen, bevor das Protein fertig ist. Diese Mutationen heißen *Nonsense-Mutationen*, weil nach ihnen die Proteinsynthese nicht weitergeht.

Sie werden auch Stoppmutationen genannt oder vorzeitige Stoppcodons. Wenn eine solche Mutation im Dystrophin-Gen entstanden ist, wird nach ihm ein abgebrochenes Dystrophin-Protein produziert, das zu kurz für seine normale Funktion ist. Es wird abgebaut und verschwindet. PTC124 ist eine niedermolekulare Substanz, das es dem Protein-synthetisierenden System in den Ribosomen erlaubt, durch das vorzeitige Stoppszeichen *hindurchzulesen*, so daß ein Protein von normaler Länge entsteht. PTC124 wird aber einem Duchenne-Jungen nur helfen können, wenn seine Mutation ganz genau bekannt ist und feststeht, daß es eine Nonsense-Mutation ist. Das heißt, die Gensequenz um die Mutationsstelle herum muß in allen Einzelheiten bestimmt werden. Nur wenn eines der Stoppcodons TGA, TAG oder TAA entstanden ist, kann PTC124 wirken, kann es den Zellvorgängen helfen, eine der genetischen Ursachen der Duchenne-Dystrophie zu umgehen, aber es ist nicht Teil einer Gentherapie und es veranlaßt auch kein Exon-Skipping.

PTC124 ist ein vollständig neues Medikament, das Erste seiner Art. Um es zu finden, wurden etwa 800.000 niedermolekulare chemische Substanzen automatisch auf ihre Fähigkeit getestet, die Konsequenzen eines vorzeitigen Stoppcodons zu ignorieren. Die dabei identifizierten aktiven Substanzen wurden dann in mehrjähriger Laboratoriumsarbeit chemisch optimiert. Obgleich das Antibiotikum Gentamicin die erste Verbindung war, bei der man das Durchlesen durch Stoppcodons nachweisen konnte, ist PTC124 nicht mit Gentamicin verwandt, und es ist auch kein Antibiotikum. Alle Einzelheiten über PTC124 einschließlich seiner molekularen Struktur und der umfangreichen vorklinischen Untersuchungen wurden am 3. Mai 2007 in der Zeitschrift *Nature*, Band 447, Seiten 87-91, veröffentlicht zusammen mit einem Kommentar "*Ignore the nonsense*" (Ignoriere den Unsinn) auf Seite 42.

PTC124 ist noch nicht im Handel, denn es wird in Tier-

versuchen und klinischen Studien mit Patienten noch weiterentwickelt. Es ist ein orales Medikament, das also durch den Mund verabfolgt wird, ein weißes kristallines Pulver mit leichtem Vanillegeschmack, das in kleinen Kunststoffbeuteln zur Verfügung steht. Es wird vor der Anwendung mit Wasser, Milch oder Saft zu einer Suspension aufgeschwemmt.

Weil PTC124 Nonsense-Mutationen in jeder mRNA ignorieren kann, ist es auch ein mögliches Medikament für andere genetische Krankheiten, die von solchen Mutationen verursacht werden, z.B. für Mukoviszidose. PTC Therapeutics hat schon mehrere klinische Studien mit PTC124 durchgeführt und hofft, bald auch Langzeitstudien mit Mukoviszidose und Duchenne Patienten beginnen zu können.

Um sicherzustellen, daß PTC124 ein Duchenne-Medikament sein kann, wurden präklinische Experimente an Versuchstieren durchgeführt. Nach der oralen Gabe an lebende mdx-Mäuse erschien Dystrophin normaler Länge in ihren Skelett- und Herzmuskeln und auch im Zwerchfell, das dann auch an seine normale Stelle an der Innenseite der Muskelzellmembran wanderte. Die Muskeln waren danach wesentlich widerstandsfähiger gegen erzwungene Verlängerungen und die CK-Aktivitäten im Serum verringerten sich. Toxizitätsstudien mit hohen Dosen des Medikamentes an Ratten und Hunden führten im allgemeinen zu keinen ernstern oder akuten Nebenwirkungen. Entzündungen der Nieren wurden bei Mäusen beobachtet und auch der Nebennierendrüse von Hunden. In Ratten wurden in einer Studie auch Tumoren im braunen Fett gesehen, das ließ sich aber bei einer Wiederholung der Studie nicht bestätigen. Überzeugende Hinweise auf ähnliche Nieren- und Nebennieren-Probleme bei Menschen traten nicht auf. Menschen haben kaum braunes Fett, es ist deshalb unwahrscheinlich, daß dieser Effekt für Menschen Bedeutung hat. In den klinischen Studien wird deshalb besonders sorgfältig auf diese Probleme geachtet.

Bei der ersten klinischen Erprobung von PTC124 wurde eine offene Phase-I Studie durchgeführt mit 61 gesunden 18 bis 30 Jahre alten erwachsenen Freiwilligen. Diese Altersgruppe wurde gewählt, weil sie der von jungen erwachsenen Duchenne-Patienten entspricht. Sie erhielten das Medikament dreimal pro Tag bis zu zwei Wochen lang. Die Absorption (die Aufnahme) des Medikaments wurde mit und ohne gleichzeitiger Nahrungsaufnahme getestet. Das Medikament wurde vom Körper gut absorbiert, und es war möglich, eine Konzentration im Blutplasma von 2 bis 10 Mikrogramm/ml einzuhalten, die in mdx-Mäusen als besonders wirksam gefunden wurde. Mit PTC124 gab es nur wenige Nebenwirkungen wie Übelkeit, Durchfall und Kopfschmerzen bei sehr hohen Dosierungen von mehr als 150 mg/kg. Manchmal wurden dabei auch geringe Erhöhungen der Leberenzyme gesehen. Dosierungen bis zu 100 mg/kg/Tag wurden von den gesunden Erwachsenen gut vertragen, dies ist eine größere Dosis als sie Duchenne-Patienten bekommen würden.

Diese Ergebnisse erlaubten es, mit einer Phase-IIa-Studie zu beginnen. Der erste Teil dieser offenen klinischen Studie mit 26 fünf bis 13 Jahre alten Duchenne-Patienten ist abgeschlossen. Sechs Jungen erhielten eine Dosis von 16 mg/kg/Tag und 20 Jungen 40 mg/kg/Tag des Medikamentes in drei Portionen pro Tag. Sie hatten verschiedene Stoppmutationen: 15 hatten das Stoppcodon TGA, 6 TAG

und 5 TAA, die auf die Exons 6 bis 70 verteilt waren.

Die Patienten wurden bis zu 21 Tagen vor der Behandlung klinisch getestet, dann erhielten sie 28 Tage lang täglich das Medikament, und schließlich wurden sie nach weiteren 28 Tagen abschließend intensiv untersucht. Muskelbiopsien wurden vor und nach der Behandlung am Fußmuskel *Extensor digitorum brevis*, EDB, durchgeführt, um auf die Wiederherstellung der Produktion von Dystrophin normaler Länge zu testen. Andere chemische und Funktionstests wurden ebenfalls vorgenommen, um den therapeutischen Effekt zu messen und die Sicherheit zu überprüfen.

Bevor die Patienten der ersten beiden Gruppen das Medikament erhielten, wurde Muskelgewebe aus ihrer ersten Biopsie im Laboratorium mit PTC124 behandelt. In diesen Laborexperimenten wurde die erwartete Dosis-abhängige Erhöhung der Menge des normal langen Dystrophins bei allen Jungen gefunden.

Das Ergebnis dieser klinischen Studie war, daß nach 28 Tagen Behandlung mit dem Medikament in 3 von 6 Jungen der Gruppe mit der niedrigen Dosis und in 11 von 20 der Gruppe mit der höheren Dosis, d.h., in etwa 50% aller 26 Jungen, eine relativ geringe Menge Dystrophin im Muskelgewebe der nach der Behandlung durchgeführten Biopsie nachgewiesen werden konnte.

Eine der Gründe, warum nicht in allen Jungen neues Dystrophin gefunden wurde, könnte sein, daß die PTC124-Konzentration im Blut unterhalb des angestrebten Konzentrationsbereiches von 2 bis 10 Mikrogramm/ml Plasma war, möglicherweise verursacht durch den im Vergleich mit Erwachsenen schnelleren Abbau des Medikaments in Kindern. Doch bei allen Kindern waren die CK-Aktivitäten während der Behandlung zurückgegangen. Sie stiegen aber während den Nachuntersuchungen im Anschluß an die Behandlung wieder an, so wie es für ein Medikament zu erwarten war, das eigentlich ununterbrochen angewendet werden mußte. Einige milden bis mäßigen aber selten auftretenden Nebenwirkungen wurden beobachtet wie Durchfall, Übelkeit und Kopfschmerzen, aber es gab keine erheblichen Änderungen der Laborwerte.

Aber einige Eltern und Lehrer berichteten, daß die Jungen nach der Behandlung mehr Ausdauer hatten und aktiver und weniger müde waren als vorher. Dies sind keine richtigen wissenschaftlichen Ergebnisse, sie müssen deshalb im Detail überprüft werden.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß man mit einer höheren PTC124-Dosis genügend Dystrophin für eine therapeutische Wirkung erhalten würde. Deshalb wurde die Phase-IIa-Studie modifiziert, indem 12 weitere Duchenne-Jungen aufgenommen wurden, die 80 mg/kg/Tag PTC124 in drei Portionen pro Tag an 28 Tagen erhielten. Diese Dosis sollte dann genügen, um eine Blutkonzentration von mindestens 2 bis 10 Mikrogramm/ml Plasma zu erreichen. Diese zusätzliche Behandlung ist bereits abgeschlossen, die Daten werden analysiert und in kürze mitgeteilt.

Am Ende seines Vortrags erwähnte Dr. Miller drei Fragen, die beantwortet werden müssen, bevor PTC124 ein Medikament für Duchenne-Jungen sein kann: (1) Werden die kurzzeitigen positiven Wirkungen von PTC124 zu den gewünschten Langzeiteffekten führen, wie eine Verbesserung der Muskelfunktion, der Muskelkraft und der Ausdauer als auch zu einer besseren Lebensqualität? (2) Welche PTC124-Dosis wird die besten klinischen Wirkungen

ohne Sicherheitsprobleme liefern? (3) Wie lange wird es dauern, bis die kurzzeitigen pharmakologischen Wirkungen zu einem dauernden klinischen Nutzen werden?

Nur eine über eine längere Zeit durchgeführte kontrollierte klinische Studie kann diese Fragen beantworten. Die nächsten Schritte, die PTC Therapeutics unternehmen wird, sind deshalb, die Ergebnisse der fertigen Phase-IIa-Studien abschließend auszuwerten und dann die Anträge für eine klinische Langzeitstudie an die amerikanische FDA und die europäische EMEA (European Medicines Agency) bis Ende 2007 vorzubereiten und einzureichen. Es wird erwartet, daß diese Studie in den nächsten Monaten beginnen kann. Außerdem sollen die Jungen, die an der Phase-IIa-Studie teilgenommen hatten, die Gelegenheit bekommen, in einer offenen Verlängerung der Studie weiterbehandelt zu werden.

Projekt Katalyse: Vier neue Duchenne-Medikamente werden entwickelt. Die Firma PTC Therapeutics in South Plainfield, NJ, sieht es als ihre Aufgabe an, niedermolekulare Medikamente zu finden und weiterzuentwickeln, die die Übertragung der genetischen Information vom Gen zur mRNA modifizieren. Der Name PTC ist die Abkürzung der englischen Beschreibung dieser Aufgabe: *Post-Transcriptional Control* (Kontrolle nach der Transkription, des „Weiterschreibens“).

Ellen Welch, eine Abteilungsleiterin von PTC, stellte dieses, englisch *Project Catalyst* genannte Programm vor, mit dem zusätzlich zum PTC124 weitere potentielle Medikamente zur Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie gefunden werden sollen. *Projekt Katalyse* wurde im Mai 2004 mit dem Ziel begonnen, mit automatische Testverfahren unter mehreren hunderttausend niedermolekularen Verbindungen diejenigen zu finden, die in der Lage wären, in den Muskelzellen die Produktion (die *Expression*) von vier Proteinen zu modifizieren, die eine Rolle bei einer Therapie der Duchenne-Dystrophie spielen können. Diese vier Proteine wurden ausgewählt, weil die Forschung gezeigt hatte, daß das Hoch- oder Herunterregulieren ihrer Expression die Muskelstruktur und -funktion in Duchenne-Patienten verbessern würde: Das Herunterregulieren von *Myostatin* und das Hochregulieren des Muskel-spezifischen *Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors*, IGF-1, jedoch nicht der Leber-spezifischen Form, würden das Wachstum und die Regeneration der Muskeln fördern; und das Hochregulieren von *Utrophin* und von *Alpha7-Integrin* würden die Muskelzellmembranen stabilisieren und dadurch die Muskelfunktionen verbessern.

Die automatischen Testverfahren zur Identifizierung der potentiellen Duchenne-Medikamente verwenden eine neu entwickelte Methode zur Aktivitätsmessung mit einem biologischen Meßsystem: Die mRNA der vier Proteine wurde mit dem Gen für das Enzym Luziferase der Glühwürmchen verbunden. In Gegenwart einer aktiven PTC-Verbindung wird dann die Menge der Luziferase verändert und das Licht, das sie produziert, wird entweder verstärkt oder geschwächt. Das genaue und automatische Messen von Lichtintensitäten ist sehr viel einfacher als das Analysieren von Wirkungen biologischer Aktivitäten.

Relativ wenige Substanzen mit wenigstens einigen der gewünschten Eigenschaften wurden bei diesem Suchprogramm gefunden und werden jetzt durch Variation ihrer chemischen Struktur optimiert. Dies führt zu Änderungen

ihrer biologischen, pharmakologischen und medizinischen Eigenschaften, wie der Aktivität, der Wirksamkeit, der Löslichkeit, des Wanderungsvermögens (Permeabilität), des biologischen Um- und Abbaus (Metabolismus), der Giftigkeit (Toxizität), der Nebenwirkungen, der oralen Verfügbarkeit (daß man sie schlucken kann), und von anderen Eigenschaften. Mit diesen Optimierungsprozessen sind viele Chemiker viele Jahre lang beschäftigt. Schließlich müssen für die aussichtsreichsten Verbindungen die Methoden zur Synthese auf größere Mengen adaptiert werden, damit genügende Mengen für das vorklinische Testen an isoliertem Muskelgewebe und in lebenden Versuchstieren wie den mdx-Mäusen zur Verfügung stehen.

PTC Therapeutics hat jetzt schon mehrere potentielle Medikamente zur Verfügung, die Myostatin zu sehr kleinen Konzentrationen herunterregeln, die die Muskelform von IGF-1, aber nicht die Leberform, hochregulieren, und die Utrophin und Alpha7-Intergrin auf das Zweifache hochregulieren können. Diese sehr aussichtsreichen Medikamente werden weiter optimiert, so daß mit ihnen etwa 2009 die ersten Phase-I klinischen Studien zur Toxizitätsprüfung mit Duchenne-Jungen beginnen können.

Die genetische Information des Dystrophin-Gens einschließlich seiner Mutationen wird durch diese Medikamente nicht verändert werden. Sie müssen wahrscheinlich während der ganzen Lebenszeit des Patienten genommen werden. Unter Umständen könnten sie später mit anderen Medikamenten und auch genetischen Techniken wie Exon-Skipping kombiniert werden, und so Teil einer sehr effektiven Duchenne-Therapie werden.

PPMD unterstützt das Projekt Katalyse von PTC Therapeutics finanziell und stellt dadurch sicher, daß dadurch Therapien entwickelt werden, für die sich sonst pharmazeutische Firmen kaum interessieren würden. Diese positive Zusammenarbeit ist von A.-L. Winkler und D. Finegold im Januar 2008 in der Zeitschrift *Nature Biotechnology*, Band 26, Seiten 23-26 unter dem Titel „Giving patients a say: how to work with patient advocacy groups“ (Den Patienten das Sagen lassen: wie man mit Interessengruppen der Patienten arbeiten kann) als beispielhaftes Zusammenarbeiten sehr ausführlich beschrieben worden.

Die Hemmung von NFκB verbessert die Muskelstruktur und Muskelfunktion. Als *George Carlson* und seine Forschungsgruppe an der Still University in Kirksville, Missouri, sich vor einigen Jahren vornahm, ganz gezielt eine Therapie für Duchenne-Dystrophie zu entwickeln, versuchten sie erst einmal zu verstehen, warum die mdx-Maus eine, wenn auch nur milde, Muskeldystrophie hat, wenn ihr das Dystrophin fehlt. Damals nahm man an, daß das Einfließen von größeren Mengen von Kalzium-Ionen (elektrisch geladenen Atomen) für die dystrophischen Symptome verantwortlich war. Aber als man in Dr. Carlsons Laboratorium dieses Einfließen von Kalzium in isolierte stark dystrophische Muskelfasern des Atmungsmuskels *Triangularis sterni* (TS) der mdx-Mäuse maß, stellte man fest, daß dieses Einfließen in die gestreßten Fasern gegenüber dem Einfließen in normale Fasern unter den gleichen Bedingungen kaum erhöht war. Demnach war ein erhöhtes Einströmen von Kalzium gar nicht für die Muskeldegeneration verantwortlich. Aber der TS-Muskel wird jedesmal, wenn das Tier ausatmet, passiv gedehnt, und das bedeutet, daß dieses passive Dehnen der dystrophischen

Fasern einen Mechanismus auslöst, der die Muskeldegeneration begünstigt. Andere Wissenschaftler konnten dann zeigen, daß das passive Dehnen den Signalmechanismus NFκB (NFkappaB) im Muskel aktiviert. Dr. Carlson und seine Kollegen begannen danach, die Hypothese (die Annahme) zu testen, daß die Aktivierung dieses Mechanismus die Ursache für die Schädigung des gedehnten dystrophischen TS-Muskels ist.

Das Protein NFκB war 1986 gefunden worden, im gleichen Jahr wie das Dystrophin-Gen. Es kommt im Zytoplasma aller Zellen vor, aber meistens hat es sich dort mit einem anderen Protein zusammengelagert, mit dem Protein κB oder IκB (inhibitory κB), wodurch es inaktiviert wurde. Wenn durch ziemlich komplizierte Regulationsprozesse eine Entzündung ausgelöst wird, um einen viralen oder bakteriellen Infekt zu bekämpfen, fügt der enzymatische IκB-Kinase-Komplex, IKK, zwei Phosphatgruppen an das NFκB-Protein an und befreit es so von seinem Hemmstoff. Das jetzt aktivierte NFκB wandert vom Zytoplasma in den Zellkern und dann, weil es sich an die Promoter- und *enhancer sequences* (Aktivierungs-Sequenzen) vieler Gene anlagert, werden diese Gene hochreguliert. Mehrere hundert Gene sind bekannt, die an verschiedenen Reaktionsketten, sog. *Kaskaden*, beteiligt sind, die auf diese Weise vom aktivierten NFκB im Zellkern ausgelöst werden. Sobald die Entzündung nicht mehr gebraucht wird, wird die Aktivierung des NFκB von Anti-Entzündungsfaktoren beendet. Wenn genetische Mutationen, andere pathogene (krankheitsauslösende) oder Streß-Vorgänge die Deaktivierung des NFκB durch diese Faktoren verhindern, können sich einige chronische Krankheiten entwickeln, wie Arteriosklerose, Lungenfibrose, Asthma, rheumatische Arthritis und wahrscheinlich auch Duchenne-Muskeldystrophie.

Dr. Carlson begann dann, eine Reihe von bekannten Medikamenten zu untersuchen, die die Aktivierung von NFκB hemmen, um zu sehen, ob sie eine Wirkung auf den chronisch gedehnten TS-Muskel haben. Eines dieser Medikamente ist *Pyrrolidin-Dithiocarbamat*, von dem bekannt war, daß es die Aufspaltung des inaktiven NFκB-IκB-Komplexes verhindert, so daß das NFκB nicht mehr in den Zellkern wandern kann. Dr. Carlson konnte dann zeigen, daß dieses Medikament die Struktur und die Funktion von dystrophischen Muskeln in mdx-Mäusen wirksam verbessern konnte. Einige der NFκB-hemmenden Medikamente sind bereits für die Behandlung anderer Krankheiten zugelassen. Eines davon ist auch Sulfasalazin, das für die Behandlung rheumatischer Arthritis bei Kindern verwendet wird.

Dr. Carlson und seine Kollegen haben schon diese beiden Medikamente an ihren isolierten TS-Muskelfasern aus mdx-Mäusen getestet und gefunden, daß der Durchmesser der Fasern deutlich größer geworden war und daß sich ihre Funktion verbessert hatte.

Dr. Carlson sagte am Ende seines Vortrags: „Wir überlegen uns jetzt, ob wir nicht einige dieser NFκB-hemmenden Medikamente, die bei anderen Krankheiten angewendet werden, an Duchenne-Jungen klinisch testen sollten.“

Beta-Agonisten, mögliche Medikamente für Duchenne-Dystrophie. *Gordon Lynch* von der University of Melbourne in Australien besprach Forschungsarbeiten seines Laboratoriums zur möglichen Anwendung von Medika-

menten, die als *Beta-Agonisten* bekannt sind, für die Erhaltung und Verstärkung der Muskeln von Duchenne-Patienten. Beta-Agonisten sind Hormon-ähnliche Substanzen, die sich an spezifische Rezeptor-Proteine in den Zellmembranen binden und dann von dort aus Signalketten innerhalb der Zelle auslösen. Dadurch werden in einer Kette von miteinander reagierenden Proteinen chemische Signale zu biologischen Zielstrukturen in den Zellen gesendet, die aktiviert, gehemmt oder verändert werden müssen, damit die Zelle unter sich ändernden Lebensbedingungen angemessen funktioniert. Dieser Weg, die *Reaktionskaskade*, die von Beta-Agonisten beeinflusst und modifiziert wird, ist die sog. *Beta-adrenergische Signalkette*, mit der neben anderen biologischen Wirkungen vor allem die Proteinsynthese und der Proteinabbau kontrolliert werden.

Einige der Beta-Agonisten sind Medikamente, mit denen man durch Inhalation die glatten Muskeln der Atemungswege von Asthma-Patienten entspannen kann, sie sind *Bronchodilatoren*. Andere haben starke anabolische (aufbauende) Wirkungen auf Skelettmuskeln, besonders wenn sie in einer höheren Dosis in den Blutkreislauf gespritzt werden. Sie werden auch manchmal von Sportlern illegal zur Unterstützung des Muskelwachstums und Verringerung des Körperfetts angewendet, also zum Doping.

Da die Beta-Agonisten auch dem Muskelabbau in älteren Menschen entgegenwirken können, testete Dr. Lynch und seine Kollegen diese anabolische Wirkung in Experimenten an 28 Monate alten Ratten, die also fast ihre normale Lebenserwartung von etwa 30 bis 32 Monaten erreicht hatten. Im Jahr 2004 zeigten die Forscher, daß durch die tägliche Behandlung dieser alten Ratten während vier Wochen mit 1,4 mg/kg *Fenoterol* durch intraperitoneale Injektion (in den Bauchraum) den altersabhängigen Muskelschwund ins Gegenteil änderte: Im Vergleich mit 16 Monate alten erwachsenen Ratten war die Muskelmasse der alten Ratten deutlich größer, die Muskelfasern hatten einen größeren Durchmesser, die Muskelkraft hatte zugenommen, und viele der langsamen Muskelfasern waren schnelle Fasern geworden, was schnellere und kräftigere Muskelkontraktionen ermöglichte. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Beta-Agonisten wahrscheinlich verwendet werden könnten, um *Sarkopenia* zu behandeln, den Muskelabbau und andere Schwächen des immer größer werdenden Anteils älterer Menschen in der Bevölkerung. Fenoterol ist ein Beta-Agonist der älteren Generation. In den folgenden Experimenten untersuchten Dr. Lynch und seine Kollegen daher die Wirkung von stärkeren Beta-Agonisten der neueren Generation wie *Formoterol* und *Salmeterol*, die beide schon zur Behandlung von Asthma für Menschen zugelassen sind.

Wenn der Muskelschwund von älteren Menschen mit Beta-Agonisten behandelt werden kann, dann darf man annehmen, daß sie auch gegen Muskelschwundkrankheiten wie Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzt werden könnten.

Tatsächlich ist eine klinische Studie schon mit Duchenne- und Becker-Patienten durchgeführt worden. Da Fenoterol nicht verwendet werden durfte, wurden die Patienten 28 Wochen lang mit 8 mg/Tag *Albuterol* behandelt, einem bereits als Medikament zugelassenen Beta-Agonist. Diese niedrige Dosis wurde gewählt, nachdem in einem ein Jahr dauernden klinischen Versuch mit erwachsenen FSH-Dystrophie-Patienten (Fazio-skapulo-humerale Mus-

keldystrophie) eine Dosis von 16 und 32 mg/Tag Albuterol zu nicht akzeptablen Herzproblemen führte. Die wesentlich niedrigere Dosis in der Duchenne-Studie verursachte zwar keine Nebenwirkungen, doch brachte sie nur eine geringe Erhöhung der Muskelkraft, die therapeutisch bedeutungslos war.

Deshalb fragten sich Dr. Lynch und seine Kollegen, ob vielleicht der stärkere Beta-Agonist *Formoterol* in mdx-Mäusen wirksamer sein würde. Sehr niedrige Dosen Formoterol, 25 Mikrogramm/kg, vergrößerten die Muskelfasern und verbesserten die Funktion in den beiden untersuchten Skelettmuskeln dieser dystrophischen Mäuse. Wichtig war dabei, daß diese Verbesserung der Muskelkraft keine negativen Folgen für die Ermüdbarkeit der Muskeln mit sich brachte.

Für die weitere Entwicklung einer Duchenne-Therapie sind jetzt zusätzliche vorklinische Experimente geplant, vor allem, um die positiven Effekte der Beta-Agonisten auf die Skelettmuskeln von ihren möglichen schädlichen Wirkungen auf das Herz zu trennen. Da diese Beta-Agonisten über die gleichen Rezeptoren in den Skelettmuskeln und dem Herzen wirken, ist eine Trennung dieser Effekte eine große Herausforderung. Schließlich brauchen Duchenne-Patienten keine Vergrößerung ihres Herzens. Außerdem sollte eine andere Nebenwirkung, nämlich die Verminderung der Beta-Rezeptoren vermieden werden, um Beta-Agonisten zu erhalten, die für eine Langzeitbehandlung geeignet sind. Sobald diese Probleme mit Mäusen und Hunden gelöst sind, kann man daran denken, klinische Studien mit Duchenne-Jungen durchzuführen.

Behandlung von Entzündungen: Der Abbau und das Absterben von Muskelzellen verursacht Entzündungsvorgänge, die die Zelltrümmer beseitigen. Steroide können Entzündungen unterdrücken, und das ist wahrscheinlich der Grund, warum das Medikament *Prednison*, dessen aktive Form *Prednisolon* und das mit ihm verwandte *Deflazacort* in der Lage sind, die Muskelmasse und Muskelkraft zu erhöhen sowie die Immunantwort zu unterdrücken, allerdings oft mit unangenehmen Nebenwirkungen. Sie werden in großem Maße bei Duchenne-Jungen angewendet, um die Muskelfunktionen wenigstens einige Jahre zu erhalten. Doch der genaue Mechanismus ihrer Wirkung ist immer noch nicht genau bekannt.

Melissa Spencer von der University of California in Los Angeles berichtete über Experimente, die das Ziel haben, neue Medikamente zu finden, um ganz spezifisch die Entzündungen und Immunreaktionen in den Muskeln zu bekämpfen, um damit eventuell die Steroide ersetzen zu können. Der folgende Text wiederholt zum Teil die Zusammenfassung des ähnlichen Vortrags beim Treffen 2006 in Cincinnati von *Sylvia Lopez*, einer Doktorandin in Dr. Spencers Laboratorium

Es konnte gezeigt werden, daß erhöhte Mengen von CD4- und CD8-T-Zellen und noch wichtiger von myeloiden (Knochenmark-ähnlichen) Zellen des Immunsystems den Fortschritt der Krankheit beschleunigen. Diese Zellen produzieren Zytokine, Moleküle, die Entzündungen und die Entwicklung von Fibrose in mdx- und Duchenne-Muskeln begünstigen. In gesunden Menschen ist dies ein normaler Vorgang der Wundheilung, die schwaches Gewebe stabilisiert und die Heilung fördert. In Duchenne-Jungen kann dieser Vorgang nicht mehr kontrolliert wer-

den und wird chronisch wie eine dauernd heilende Wunde. Deshalb würde die Hemmung oder Entfernung von Immunzellen und auch eine Änderung der aktiven Zytokine wahrscheinlich den Abbau der dystrophischen Muskeln und die Bildung der Fibrose verlangsamen. Es gibt bereits eine Reihe von zugelassenen entzündungshemmenden Medikamenten. Wenn man nachweisen könnte, daß sie die Duchenne-Dystrophie positiv beeinflussen, würde die Erlaubnis der FDA schneller zu erreichen sein, als für die Zulassung eines vollständig neuen Medikamentes.

Mit drei dieser Medikamente wird jetzt in Dr. Spencers Laboratorium an mdx-Mäusen gearbeitet. Sie werden bereits in klinischen Studien gegen andere Krankheiten getestet: *CTLA-4Ig* gegen rheumatische Arthritis, *Galectin-1* ebenfalls gegen Arthritis, es verbessert auch die Muskelregeneration, und *Anti-asialo GMI*, ein Antikörper gegen die Parkinson-Krankheit.

Zwei weitere bekannte Medikamente werden folgen: *Remicade®* und *Enbrel®*, die beide gegen rheumatische Arthritis und andere Krankheiten zugelassen sind. Ein weiteres Ziel für ein entzündungshemmendes Medikament ist das Protein NFkappaB, das bereits von Dr. Carlson in Philadelphia diskutiert wurde.

Am Ende ihres Vortrags, teilte Dr. Spencer wichtige neue Ergebnisse mit. *Osteopontin* ist ein Protein, das im Blut vorkommt und viele Funktionen in der Knochenbiologie hat, sowie bei der Immunregulation, den Entzündungen und Krebsmetastasen. Es konnte gezeigt werden, daß seine Konzentration im Blut und in den Muskeln von mdx-Mäusen und Duchenne-Patienten erhöht ist. Mdx-Mäuse ohne Osteopontin haben eine bessere Muskelkraft, niedrigere CK-Werte und weniger Fibrose. D.h., wenn etwas gefunden werden könnte, die Osteopontin in Duchenne-Patienten hemmt, hätte man vielleicht ein potentiell Medikament, das die Muskelregeneration und die Muskelfunktion verbessern und die Fibrose verringern könnte.

Studien zur Langzeitbehandlung werden nötig sein, um festzustellen, ob diese Medikamente für eine Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie geeignet wären und vielleicht auch die Steroide ersetzen könnten. Möglicherweise könnten sie aber auch mit einer genetischen Methode wie das Exon-Skipping kombiniert werden und dann die Lebenserwartung und die Lebensqualität der kranken Kinder positiv beeinflussen.

Klinische Studie mit MYO-029 zur Hemmung von Myostatin: *Myostatin* ist ein Protein, das in den Muskeln gebildet wird und aus einer Kette von 375 Aminosäuren besteht. Nach mehreren molekularen Umlagerungen wird es biologisch aktiv und verursacht dann eine Reihe von chemischen Reaktionen, die für das Wachstum der Muskeln notwendig sind. Durch eine Hemmung von Myostatin könnte deshalb wahrscheinlich die Regeneration von Muskelfasern der Duchenne-Jungen stimuliert werden, so daß sie nicht mehr so schnell zerstört werden, sie könnten sogar größer werden.

Nicht-dystrophische Mäuse, deren Myostatin-Gen mit genetischen Methoden deaktiviert wurde, haben bis zu dreifach vergrößerte Skelettmuskeln mit deutlich mehr und dickeren Fasern. Es gibt Rinder, die belgische blaue Rasse, die sehr muskulös sind, weil ihr Myostatin-Gen vor einigen Jahrhunderten durch eine Mutation inaktiviert wurde. Vor kurzem wurde festgestellt, daß *Bully Whippets* (engli-

sche Windhunde) extrem vergrößerte Muskeln haben, weil sie kein Myostatin enthalten. Und in Berlin wurde ein jetzt 8 Jahre alter Junge gefunden, dessen Skelettmuskeln etwa doppelt so groß wie die eines normalen Kindes sind. Dies sind Hinweise darauf, daß ein Herunterregulieren oder Hemmen des Myostatins zu einem verstärkten Muskelwachstum auch in Duchenne-Jungen führen könnte.

Eine Myostatin-Therapie würde zwar die genetische Ursache der Krankheit nicht beeinflussen, sie könnte aber wahrscheinlich durch die Kombination mit genetischen Behandlungen wie Dystrophin-Gentransfer oder Exon-Skipping deren therapeutische Wirkungen verstärken.

Kathryn Wagner vom Wellstone-Muskeldystrophie-Zentrum der Johns Hopkins Universität in Baltimore berichtete, daß ihr Forscherteam mdx-Mäuse gezüchtet hat, die nicht nur kein Dystrophin haben, sondern auch kein Myostatin bilden können. Erwachsene Mäuse dieser Myostatin-*knock-out*-Tiere hatten mehr normale Muskeln, weniger Fibrose (Narbengewebe), und sie regenerierten ihre Muskeln schneller als "normale" mdx-Mäuse.

Die Frage war jetzt, ob das Fehlen von Myostatin auch ähnliche Wirkungen auf das Herz haben könnte. Neue Untersuchungen an mdx-Mäusen zeigten, daß die Blockade von Myostatin keine Wirkung auf das Herz hat. Dies bedeutet, daß die Aktivität von Myostatin auf die Skelettmuskeln allein beschränkt ist.

In Zusammenarbeit mit der Firma *Wyeth Pharmaceuticals*, in Collegeville bei Philadelphia wurde eine klinische Studie mit *Myo 029* begonnen, einem spezifischen Antikörper (einem Immunprotein), der sich an Myostatin bindet und dessen Aktivität blockiert. Er verursacht keine Immunabwehr, weil er eine menschliche Struktur hat, er ist "humanisiert". Er kann in den Blutkreislauf oder unter die Haut injiziert werden.

In einer Phase-I/II klinischen Studie werden drei Gruppen von je 36 erwachsenen Muskeldystrophie-Patienten, darunter einige Becker-Patienten, intravenös mit 1, 3 und 10 mg/kg MYO-029 alle zwei Wochen über einen Zeitraum von 24 Wochen behandelt. Danach folgen 12 Wochen klinische Überwachung.

Das Ziel dieser Studie ist es, die Sicherheit zu prüfen und eine mögliche Wirkung festzustellen. Vorläufige Ergebnisse zeigen, daß MYO-029 gut vertragen wird und daß es zumindest über kurze Zeit sehr sicher ist. Sobald die Studie abgeschlossen ist und die Ergebnisse vollständig analysiert und ausgewertet sind, werden sie in allen Einzelheiten veröffentlicht werden.

Da es wichtig ist, die Langzeitwirkung dieses potentiellen Medikamentes zu kennen, sind Studien mit Hunden geplant. Wyeth ist nicht die einzige Firma, die auf diesem Gebiet arbeitet. Andere Firmen entwickeln andere Methoden, um Myostatin zu blockieren, nicht nur zur Behandlung von Muskeldystrophien, sondern auch wegen anderer, ökonomisch viel wichtigerer Probleme wie die Muskeldegeneration bei älteren Menschen.

Dr. Wagner beendete ihren Vortrag in Cincinnati mit einer Warnung, die hier wiederholt wird: Die Eltern sollten auf keinen Fall jetzt sog. Myostatin-Hemmstoffe über das Internet kaufen. Diese Substanzen sind nicht klinisch geprüft und deswegen unwirksam oder sogar gefährlich.

BBIC hemmt Proteasen, doch Myodur (C101) tut es nicht. **Lee Sweeney** von der University of Pennsylvania in

Philadelphia besprach neue Forschungsarbeiten zur Hemmung von Proteasen.

Der Abbau von Muskelproteinen bei der Duchenne-Dystrophie wird von mehreren verschiedenen Proteasen verursacht. Unter diesen Protein-zerstörenden Enzymen, ist das Enzym *Calpain*, das durch Kalzium aktiviert wird, und ein großer Proteinkomplex, der *Proteasom* genannt wird. Wenn Zellmembranen durchlässig werden, wie es bei der Duchenne-Dystrophie geschieht, fließen große Mengen Kalzium-Ionen in die Zellen und aktivieren das Calpain und indirekt auch die Proteasomen. Die erhöhte enzymatische Aktivität führt zu einer ausgedehnten Zerstörung wichtiger Proteine, die für die Muskelfunktion und überhaupt für das Überleben der Muskelzellen notwendig sind. Die Forscher versuchen, die Aktivität von Calpain und anderer Proteasen zu hemmen, um so die Zerstörung der Muskelzellen zumindest zu verzögern.

Einer der dafür in Frage kommenden Hemmstoffe ist BBIC, das *Bowman-Birk inhibitor concentrate*, (das Bowman-Birk Hemmstoff-Konzentrat), ein natürliches Protein, das aus 71 Aminosäuren besteht und aus Sojabohnen isoliert werden kann. Es ist eine wasserlösliche Substanz, die über den Mund verabfolgt werden kann. Da BBIC aber zu groß ist, um in die Muskelzellen hineinzukommen, blockiert es mehrere Proteasen wie z.B. die Verdauungsenzyme *Trypsin* und *Chymotrypsin* außerhalb der Zellen und unterbricht die Signalketten, die Entzündungsprozesse bei der Duchenne-Dystrophie hervorrufen. In mdx-Mäusen hemmt BBIC dadurch den dystrophischen Prozess in mdx-Mäusen ähnlich wie es Prednison tut. Eine Langzeitbehandlung von mdx-Mäusen mit BBIC vergrößert ihre Muskelmasse und Muskelkraft. Die CK-Aktivitäten werden deutlich reduziert und ebenfalls die Fibrose. Von anderen Anwendungen, z.B. bei Krebspatienten, weiß man, daß es ein sehr sicheres Medikament ist.

Eine klinische Phase-I-Studie wird jetzt zusammen mit Dr. *Kenneth Fishbeck* an den National Institutes of Health, NIH, (an den sehr großen nationalen Medizin-Instituten) in Bethesda bei Washington vorbereitet. Sie wird begonnen, sobald die Erlaubnis der FDA vorliegt. Falls die klinischen Studien ähnliche Ergebnisse mit Duchenne-Jungen liefern, wie sie mit mdx-Mäusen erhalten wurden, könnte dieses ziemlich „gutartige“ Medikament möglicherweise die Duchenne-Muskeldegradation verlangsamen, obgleich es nicht die fundamentale genetische Ursache der Krankheit beheben kann. Sojabohnen enthalten auch andere Proteasen, deswegen muß BBIC, das aus ihnen isoliert wird, auch gereinigt werden. Sojabohnen einfach zu essen, hat keinen Effekt.

Das Tripeptid *Leupeptin* war der erste Proteasen-Hemmstoff, den man gefunden hatte und von dem man glaubte, er könne die Aktivität des Enzyms Calpain in mdx-Mäusen reduzieren. Leupeptin besteht aus drei Aminosäuren und hat eine chemisch aktive Aldehydgruppe, die für die Hemmaktivität notwendig ist. *Myodur*, auch als C101 bezeichnet, ist eine Kombination von Leupeptin und Carnitin. Sie wurde von der Firma CepTor in Baltimore entwickelt, weil man annahm, daß sie Calpain stärker als Leupeptin hemmen kann. Dr. *Theresa Michele* von CepTor hatte auf der PPMD-Konferenz 2006 in Cincinnati darüber berichtet.

Im Laboratorium von Dr. *Sweeney* wurden zusätzliche vorklinische Versuche zur Wirkung sowohl von Leupeptin

als auch von Myodur durchgeführt, bevor klinische Studien durchgeführt werden konnten. Die Ergebnisse waren enttäuschend: In Experimenten mit mdx-Mäusen wurde gezeigt, daß nach einer Behandlung von 8 Wochen mit Myodur oder nach 6 Monaten mit Leupeptin die Muskelmasse nicht zugenommen hatte, daß die Muskelfunktion sich nicht verbesserte und die Schädigungen der Muskeln gleichgeblieben waren. Calpain wurde durch diese Substanzen sogar hochreguliert, und das Calpastatin, ein natürlicher Hemmstoff des Calpains, wurde herunterreguliert. Es scheint demnach, daß man mit einem potentiellen Duchenne-Medikament nicht versuchen sollte, Calpain zu beeinflussen. Die von CepTor geplante klinische Studie wird nicht stattfinden.

Internationale klinische Studien mit pharmazeutischen Substanzen:

Die *Cooperative International Neuromuscular Research Group*, CINRG, (Internationale Arbeitsgruppe für neuromuskuläre Forschung), eine Zusammenarbeit von 22 Kliniken in den USA, in Kanada, Belgien, Italien, Schweden, Argentinien, Australien und Indien, führt klinische Studien mit Duchenne-Jungen durch. *Diana Escobar*, vom *Children's National Medical Center* (dem Nationalen Kinderzentrum) in Washington, DC, von dem diese Studien organisiert und geleitet werden, diskutierte die neuesten, bereits abgeschlossenen und die noch laufenden Studien. Zur Dokumentation dieser Studien sind standardisierte Testmethoden ausgearbeitet worden, mit denen nicht nur die Muskelfunktionen, sondern auch viele andere Daten bestimmt werden, einschließlich der Lebensqualität.

Nicht diskutiert wurden von Dr. *Escobar* die Ergebnisse der beiden vor kurzem abgeschlossenen Studien, die bereits publiziert sind. Das sind die Studien mit *Kreatin und Glutamin*, veröffentlicht in den *Annals of Neurology*, 58:151-155 (2005), bei denen eine geringe, aber nicht signifikante (deutliche) Wirkung auf die Muskelfunktion nachgewiesen wurde, und die Studie mit *Oxatomid*, veröffentlicht im *European Journal of Pediatric Neurology*, 23, April 2007, aus der auch keine signifikante Verbesserung der Muskelfunktion hervorging.

Dr. *Escobar* zeigte dann die ersten Ergebnisse einer offenen Phase-I/II-Pilotstudie mit *Pentoxifyllin* in Duchenne-Jungen, die mindestens ein Jahr lang vor der Studie nicht mit Steroiden behandelt wurden. An dieser Studie nehmen 17 Patienten im Alter von 4 bis 7 Jahren teil. Sie begann im März 2002 und wurde im Juli 2006 abgeschlossen. Jeder Junge wurde zuerst drei Monate lang klinisch kontrolliert und dann 12 Monate lang behandelt. Mit einer Reihe von Tests, darunter quantitativen Muskelfunktionstests, wurde die Wirkung der Behandlung geprüft. Acht Jungen sind aus der Studie vorzeitig ausgeschieden, einige davon wegen Nebenwirkungen wie *Leukopenie*, einer Verminderung der Zahl der weißen Blutkörperchen.

Das wichtigste, allerdings negative Ergebnis war, daß eine einjährige Behandlung mit Pentoxifyllin die Muskelkraft und Muskelfunktion *nicht* signifikant erhöhen konnte. Aber obgleich die Jungen keine Steroide bekommen hatten, gab es *keine Verschlechterung* ihrer Muskelkraft. Ob dies wirklich zutrifft, sollte in einer größeren und kontrollierten Studie geprüft werden.

Eine solche doppelblinde Studie mit 64 Patienten, die älter als 7 Jahre waren und noch mindestens 10 Meter gehen konnten, hat im September 2005 begonnen und sollte

im Dezember 2007 abgeschlossen sein. Jeder Junge bekam das Medikament oder ein Placebo (ein unwirksames Scheinmedikament) täglich 12 Monate lang. Die Patienten durften eine vorher begonnene Behandlung mit Steroiden oder anderen Substanzen wie Kreatin, Glutamin, Coenzym Q10 usw. weiterführen, sie durften sie nur während der Studie nicht verändern. Die Ergebnisse sind noch nicht veröffentlicht worden.

Eine offene Phase-II-Pilotstudie mit *Coenzym Q10* mit 13 Duchenne-Jungen, die 7 bis 11 Jahre alt waren und weiter mit Steroiden behandelt wurden, wurde zwischen September 2001 und Januar 2005 durchgeführt. Die Anfangsdosis von 90 mg/Tag wurde später auf 400 mg/Tag erhöht, wodurch die angestrebte Konzentration von mindestens 2,5 Mikrogramm/ml Serum erreicht wurde. Die einzige Nebenwirkung war Migräne bei einem Jungen, der die hohe Dosis bekam, was aber durch Herabsetzung der Dosis vermieden werden konnte. Die Jungen wurden sechs Monate lang täglich behandelt, danach konnten die Familien entscheiden, ob das Medikament bis zum Ende der ganzen Studie weiterhin gegeben werden sollte.

Diese Behandlung mit Coenzym Q10 verbesserte die Muskelfunktion im Durchschnitt um 7,3% in diesen auch mit Steroiden behandelten Duchenne-Patienten. Die gesamte Muskelfunktion wurde mit quantitativen Tests gemessen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im März 2006 eine randomisierte (nach dem Zufall organisierte) klinische Studie begonnen, an der 120 nicht mehr gehfähige 10 bis 15 Jahre alte Patienten teilnehmen und die voraussichtlich im Dezember 2008 abgeschlossen werden kann. Die Patienten erhalten 12 Monate lang täglich entweder 0,75 mg/kg/Tag Prednison oder Coenzym Q10 in einer Dosis, die zu einer Konzentration von 2,5 Mikrogramm/ml Serum, führt. Einige Patienten erhalten beide Medikamente gleichzeitig. Die Ergebnisse der Behandlung werden mit Patienten verglichen, die eine optimale standardisierte Betreuung erhalten, ein Placebo wird nicht verwendet.

Die Ergebnisse aller klinischen Studien werden veröffentlicht, sobald sie vollständig ausgewertet sind. Weitere

Informationen über diese und andere Duchenne-Studien stehen im Internet unter www.clinicaltrials.gov.

Zum Abschluß ihres Vortrags besprach Dr. Escolar, was sie als Direktorin der Abteilung für neuromuskuläre Krankheiten am Children's National Medical Center den Eltern sagt, wenn sie gefragt wird, was sie ihren kranken Kindern geben sollten:

Eine Behandlung mit 0,75 mg/kg/Tag *Prednison* sollte sofort nach der Diagnose beginnen. Wenn der Patient und/oder die Familie stark übergewichtig sind, kann anstelle von Prednison 0,9 mg/kg/Tag *Deflazacort*, gegeben werden, jedoch erst nach einer Ernährungsberatung. Eine strikte Diät muß eingehalten werden mit viel Protein aber wenig Fett und Kohlehydraten, z.B. mit magerem Fleisch, frischen Früchten und frischem Gemüse. Weiterhin kann gegeben werden: *Vitamin D* und *Kalzium*, Kreatin 5 g/Tag, Glutamin 0,3 g/kg zweimal täglich; und Coenzym Q10 200-400 mg/Tag. Akzeptiert, aber nicht empfohlen sind auch, wenn die Eltern es wünschen, z.B., Grüntee-Extrakt, Arginin und Antioxidantien wie Protandim. Wenn die Steroidbehandlung mit zwei bis vier Jahren begonnen wird, gibt es weniger Probleme mit der Gewichtszunahme, als wenn man erst später damit anfängt. Ein langsames Wachstum als Nebeneffekt ist unabhängig vom Behandlungsbeginn. Verhaltensänderungen sind geringer oder nur vorübergehend, wenn die Steroidbehandlung früh begonnen wird.

Hierzu möchte ich als Berichtserstatter anfügen, daß dies die Behandlungsempfehlungen einer in den Vereinigten Staaten bekannten Spezialistin für Muskelkrankheiten bei Kindern sind. Es handelt sich nicht um eine von einer Ärztekommision oder einem anderem Gremium erarbeitete nationale oder internationale Empfehlung. Solche Empfehlungen oder Richtlinien, ein *standard of care*, wird im Rahmen des neuen europäischen TREAT-NMD-Programms ausgearbeitet werden. Ihr als Eltern könnt diese Informationen mit Eurem Arzt besprechen und dann gemeinsam entscheiden, welche Behandlungen und welche Medikamente für Euren Sohn die richtigen sind.

Wie genehmigt die FDA ein Duchenne-Medikament?

Tan Nguyen vom *FDA Office of Orphan Products Development* (der Abteilung für die Entwicklung von Produkten für seltene Krankheiten – "Waisen-Produkte" – der Administration für Lebensmittel und Medikamente) in Washington erklärte in einem sehr engagierten und optimistischen Vortrag, daß die *Food and Drug Administration*, FDA, nicht dazu da ist, die Entwicklung von sehr notwendigen Medikamenten zu verzögern oder gar zu stoppen, sondern daß die Sorgen und Ängste einer Familie mit einem Kind, das eine unheilbare Krankheit hat, von der FDA sehr wohl verstanden werden. Es ist bereits viel getan worden, um den Genehmigungsprozeß für Medikamente für eine seltene Krankheit, *orphan disease*, wie die Duchenne-Muskeldystrophie zu beschleunigen und die Kosten ihrer Entwicklung zu verringern.

Der erste *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* (das nationale Gesetz zur Regelung von Lebensmitteln, Medikamenten und Kosmetika) wurde 1938 erlassen, nachdem bei der sog. Sulfanilamid-Katastrophe 107 Patienten in den

USA gestorben waren. Aber erst seit 1962 konnte die FDA die Hersteller zwingen, die Sicherheit ihrer Medikamente zu beweisen. Nachdem in Deutschland wegen Thalidomid (Contergan) mehr als 10.000 schwer behinderte Kinder geboren wurden, konnte eine noch größere Katastrophe in den USA gerade noch verhindert werden, weil die Genehmigung von Contergan wegen ungenügender Sicherheitsnachweise verzögert worden war. Der Genehmigungsprozeß durch die FDA wurde im Oktober 1962 durch die Kefauver-Harris-Zusätze zum Gesetz radikal verschärft. Seit dieser Zeit müssen die Hersteller nicht nur nachweisen, daß ein Medikament sicher, sondern daß es auch wirksam ist, bevor die FDA seine Vermarktung zulassen kann.

Eine Entwicklung eines Medikamentes, das nicht für eine seltene Krankheit bestimmt ist, muß die folgenden Phasen durchlaufen: (1) Die vorklinische Phase mit Studien im Laboratorium und an Tieren, die im Durchschnitt 6,5 Jahre dauert und 1-12 Millionen Dollar kostet, und bei der die Sicherheit, die biologische Aktivität und chemische

Zusammensetzung geprüft werden; (2) die *Phase-I* klinische Studie an 20-100 gesunden Freiwilligen (durchschnittliche Dauer 1,5 Jahre) zur Bestimmung der Sicherheit bei Menschen; (3) die *Phase-II* klinische Studie an 100-500 Patienten (durchschnittliche Dauer 2 Jahre) zur Erarbeitung der optimalen Dosierung und dem Nachweis der Sicherheit und Wirksamkeit; (4) die *Phase-III* klinische Studie an 1.000-5.000 Patienten (durchschnittliche Dauer 3,5 Jahre) zur Bestätigung der Sicherheit und Wirkung bei einer Langzeitbehandlung. Die Kosten für alle drei Phasen der klinischen Studien belaufen sich auf etwa 15-300 Millionen Dollar. Es können bis zu 15 Jahre für die gesamte Entwicklung nötig sein mit Gesamtkosten von etwa 360 Millionen Dollar. Im allgemeinen wird von 5.000 untersuchten Substanzen schließlich nur eine zur Vermarktung zugelassen.

Für die Entwicklung eines Medikaments gegen eine seltene und ernste Krankheit wie die Duchenne-Muskeldystrophie mit einer begrenzten Zahl von Patienten müssen nicht unbedingt alle Zulassungsvorschriften angewendet werden. Sie können innerhalb eines festen Regelwerkes angemessen abgeändert werden.

Sobald die vorklinischen Studien abgeschlossen sind, reicht der Hersteller eine *Investigational New Drug Application*, IND, bei der FDA ein (einen Antrag zur Prüfung eines neuen Medikaments), um die Erlaubnis für die Durchführung von klinischen Studien zu erhalten. Nach dem Ende aller klinischen Studien, wird eine *New Drug Application*, NDA, (ein Antrag für ein neues Medikament) gestellt, um den endgültigen Genehmigungsprozess für die Vermarktung in Gang zu setzen. Bei diesem FDA-Verfahren werden alle vorklinischen und klinischen Daten zum Beweis der Sicherheit und Wirksamkeit des Medikaments überprüft. Das dauert in den meisten Fällen ein Jahr, manchmal auch weniger, und kostet mehr als eine Million Dollar an Gebühren.

Ein Medikament wird *orphan drug* (Waisen-Medikament) genannt, wenn es neben anderen Definitionen, für die Behandlung einer seltenen Krankheit bestimmt ist, an der in den Vereinigten Staaten weniger als 200.000 Personen leiden. Mit etwa 10.000 Duchenne-Jungen in den Vereinigten Staaten wird Duchenne-Dystrophie als seltene Krankheit angesehen, und ein Medikament, das für ihre Behandlung entwickelt wird, kann die Bezeichnung *Orphan Drug* erhalten. (Ich verwende jetzt diese beiden englischen Wörter wie deutsche Wörter.) Sechs potentielle Duchenne-Medikamente sind schon zu Orphan Drugs erklärt worden: Mazindol, Oxandrolon, PTC124, 2'-O-Methyl-AONs für Exon-Skipping, Leupeptin und Idebenone. Leider werden einige dieser Medikamente nicht mehr weiterentwickelt. Die FDA hat bisher über 300 Orphan Drugs für mehr als 180 Krankheiten genehmigt.

Wenn eine Firma ein solches Orphan Drug entwickelt, bekommt sie eine Reihe von finanziellen Hilfen: (1) 50% der Kosten für die klinische Entwicklung werden auf die US-Einkommensteuer angerechnet; (2) die normalen Gebühren für den Marketingantrag von über einer Million Dollar werden erlassen; und (3), die Firma kann das Medikament sieben Jahre lang exklusiv vermarkten. Die Firma kann sich auch um Orphan-Drug-Zuschüsse von bis zu jährlich 400.000 Dollar für vier Jahre bewerben. Das sind insgesamt 1,6 Millionen Dollar hauptsächlich für die Kosten der klinischen Studien. Es sollte auch erwähnt

werden, daß in manchen Fällen die Zeit für die Genehmigung um bis zu drei Jahren durch den sog. *Subpart E Approval* verkürzt werden kann. Dies geschieht, wenn die Daten einer Phase-II klinischen Studie bereits für die Genehmigung ausreichend sind.

Für ein noch nicht genehmigtes Medikament, das aber bereits aktiv geprüft wird und sicher und wirksam zu sein verspricht, kann man die Erlaubnis bekommen, es unter einem *compassionate use program* (einer Härtefall-Regelung) Patienten zu geben, die eine ernste und lebensbedrohende Krankheit haben, für die es noch keine andere zufriedenstellende Therapie gibt.

Dr. Nguyen teilte auch Einzelheiten mit, wie die FDA den ganzen Entwicklungsprozeß überprüft, um die Sicherheit der Patienten in klinischen Studien zu garantieren und die Wirksamkeit des Medikaments nachzuweisen.

Orphan Drugs müssen auch sicher und wirksam sein.

Unter den vielen Antworten, die Dr. Nguyen nach seinem Vortrag auf Fragen der Eltern gegeben hat, waren die beiden folgenden besonders wichtig:

„Es ist zurzeit noch nicht möglich, mit einiger Sicherheit vorauszusagen, ob jedes einzelne der vielen AONs mit verschiedenen Sequenzen den ganzen Genehmigungsprozeß eines normalen Medikamentes durchlaufen muß. Es wäre gut, wenn nur das erste jeder Sorte das durchzumachen hätte, und daß für die folgenden dieser Prozeß abgekürzt werden könnte. Es wäre deswegen eine gute Idee, wenn die Duchenne-Gemeinschaft vorausdenken und entsprechende Vorschläge und Empfehlungen in irgendeiner öffentlichen Form machen würde.“

„Die FDA besteht darauf, daß ein Orphan Drug mit dem gleichen hohen Standard wie bei einem normalen Medikament auf Sicherheit und Wirksamkeit geprüft wird. Aber die FDA versteht sehr wohl, daß einige Eltern meinen, die Krankheit sei so ernst, daß sie ihren kranken Kindern lieber ein noch nicht genehmigtes aber aussichtsreiches Medikament geben möchten, als noch viele Jahre warten zu müssen, selbst wenn dies das Risiko deutlich erhöht, daß etwas Negatives passiert.“

Kate Bushby sagte dazu, und ich zitiere praktisch alle ihre Worte hier: „Wir wissen, daß wir den Patienten schnell etwas geben müssen, das funktioniert. Aber wir müssen die Risiken so klein wie möglich halten. Ich will einem 6jährigen Jungen nicht etwas geben, das vielleicht nicht wirkt, denn ein 6jähriger Junge wird von Duchenne nicht morgen umgebracht. Man lernt einfach nicht genug von einer Phase-I Studie, um vorauszusagen, was bei einer Langzeitbehandlung passieren wird. Jeder Schritt einer solchen Studie sagt einem etwas anderes. Bei jedem Schritt kann es einen Fehlschlag geben, wir wollen das nicht, aber es kann vorkommen. Selbst Todesfälle kann es geben! Wenn ein Arzt ein Medikament schon nach einer Phase-I Studie gibt, und es kommt später bei der Phase-II Studie heraus, daß es gefährlich ist, dann wird er juristische Probleme bekommen. Wenn ein Medikament für viele Menschen bestimmt ist, dann muß es durch den Genehmigungsprozeß gehen. Nur dann wird es wirklich zur Verfügung stehen und für alle, die es brauchen, auch zu bezahlen sein. Wenn man Abkürzungen macht und den falschen Weg einschlägt, verzögert man nur die Lösung der Probleme. Man muß sich die Zeit nehmen und alle notwendigen Daten sammeln. Es wäre sehr schlimm, wenn ein Me-

dikament nach einer schnell durchgeführten Studie bei einer Langzeitbehandlung sich als unsicher erweist, so daß es zurückgezogen werden muß. Und die Eltern können nicht die Verantwortung übernehmen und einfach eine ent-

sprechende Erklärung unterschreiben. Das wäre unethisch. Und was passiert, wenn das Kind stirbt? Wir haben die Verantwortung für die Patienten und für die Eltern auch.“

TREAT-NMD, ein “Network of Excellence” der Europäischen Union.

Serge Braun, der wissenschaftliche Direktor der französischen Muskeldystrophiegesellschaft *Association Française contre les Myopathies*, AFM, beschrieb zuerst diese sehr aktive nationale Patientenorganisation. Sie wurde 1985 gegründet, hat jetzt 75 klinische Zentren in Frankreich und ist im ganzen Land durch ihr Téléthon bekannt, einem 30stündigen Fernsehprogramm am ersten Dezember-Wochenende jeden Jahres. Nachdem es 1987 mit der Hilfe von *Jerry Lewis* begonnen und ähnlich wie das amerikanische Telethon organisiert wurde, bringt dieses Programm im Durchschnitt 140 Millionen Dollar jedes Jahr an Spenden. Das gesamte Budget der Gesellschaft betrug 2006 170 Millionen Dollar, von denen 88 Millionen zur Finanzierung von 400 Forschungsprojekten nach einer Therapie von neuromuskulären Krankheiten verwendet wurden, darunter waren etwa 100 Projekte von außerhalb Frankreich einschließlich den USA.

Dr. *Braun* erklärte dann, daß die AFM und andere europäische Eltern-Organisationen erkannten, wie wenig die Aktivitäten für Behandlungen, Diagnosen und Patientenbetreuung in den verschiedenen Ländern der Europäischen Union koordiniert waren. Dies war im Hinblick auf die ersten Folgen dieser seltenen Krankheiten nicht akzeptabel. *Françoise Salama* von der AFM, die einen Sohn mit Duchenne-Muskeldystrophie hat, und viele ihrer europäischen Kollegen begannen deshalb, die Europäische Kommission darauf hinzuweisen und zu veranlassen, finanzielle Hilfen für eine Zusammenarbeit auf diesem Gebiet zur Verfügung zu stellen. Damit hatten sie Erfolg, denn es kam 2004 zu einer Einladung, am neuen Programm *Network of Excellence* teilzunehmen. Das Ziel dieses Programms ist es, „die wissenschaftliche und technologische Qualität eines bestimmten Forschungsfeldes zu stärken, indem auf europäischem Niveau die Mittel (Ressourcen) und das Können zusammengeführt werden, damit die Forschungskapazitäten der Partner dieses Netzes fortschrittlich und dauerhaft gemeinsam genutzt werden.“ Nach einem langen Antragsprozess wurde das Programm TREAT-NMD (Behandle neuromuskuläre Krankheiten) im Dezember 2006 mit einem Budget von 10 Millionen Euro für 5 Jahre genehmigt. Die aktive Arbeit daran begann bereits im Januar 2007.

TREAT-NMD gehört jetzt zum *Network of Excellence*, in dem das Können von Grundlagenforschern und Klinikern mit industriellen Partnern vereint wird, um die Technologie und die Methoden voranzubringen mit dem Ziel, neue Therapien für neuromuskuläre Krankheiten zu entwickeln.

TREAT-NMD wird von der Universität von Newcastle in England aus verwaltet. Es wird koordiniert von *Kate Bushby* und *Volker Straub*, hat einen wissenschaftlichen und technologischen Beirat unter der Leitung von *Marianne de Visser* von der Universität Amsterdam, und eine Website: www.treat-nmd.eu, die sehr viel Informationen enthält und auch ein oft erscheinendes Rundschreiben, das

bereits an mehr als 1.000 e-Mail-Adressen verschickt wird.

Auf diese Einführung von Dr. *Braun* folgte der Vortrag von *Kate Bushby* mit dem Titel *TREAT-NMD in Aktion, die ersten sechs Monate*. Die wichtigsten Ziele von TREAT-NMD sind: (1) Die internationale Zusammenarbeit zu unterstützen für die Entwicklung von Therapien für Duchenne und kongenitale Muskeldystrophien sowie für spinale Muskelatrophie; (2) viele verschiedene therapeutische Ansätze zu fördern, indem klinische Studien vorgeschlagen und koordiniert werden; (3) Patienten für die Teilnahme an diesen Studien zu finden durch die Etablierung einer internationalen Datenbank; (4) Richtlinien für die klinischen Studien zu entwickeln, damit die Ergebnisse mit anderen, ähnlichen Studien verglichen werden können; (5) international akzeptierte Richtlinien für die Diagnose und Betreuung zu entwickeln, und (6) aktualisierte Berichte über Forschung, Diagnose und Betreuung zu erstellen und allen Patienten, ihren Familien und den Behandlungszentren, vor allem in den weniger privilegierten Ländern, anzubieten.

TREAT-NMD hat zurzeit 21 Partner überall in Europa: Universitäten, Patientengruppen, Behörden, Biotechnische Firmen und Einzelpersonen, die für das Erreichen der Ziele dieses Programms verantwortlich sein können. Es wird mit Gruppen von überall in der Welt zusammenarbeitet, und neue Partner, die auf diesem wichtigen Gebiet arbeiten, sind immer willkommen.

Dr. *Bushby* zählte dann vier Beispiele der jetzigen und zukünftigen Aktivitäten auf:

(1) Eine internationales Patientenregister in Partnerschaft mit bereits existierenden Registern wird eingerichtet, so daß es standardisierte Informationen über die wichtigsten klinischen und diagnostischen Patientendaten geben wird, die später für Entwicklung und das Management einer übernationalen Datenbank wichtig sein werden. Dies wird es erlauben, geeignete Patienten für klinische Studien zu identifizieren und auch die Sammlung, die Überwachung und den Vergleich von Langzeit-klinischen Daten der Patienten, die verschieden behandelt werden. Dann wird es auch möglich sein, einzelne Familien über die für sie wichtigen Fortschritte der Forschung und Betreuung individuell zu informieren.

(2) In Zusammenarbeit mit dem Center of Disease Control and Prevention (Zentrum für Krankheitskontrolle und Vorsorge), CDC, in Atlanta in den USA werden der aktuellsten Richtlinien für die Betreuung entwickelt. Die Arbeiten an diesem Projekt haben bereits begonnen, sie werden alle Aspekte der medizinischen und sozialen Betreuung der Patienten umfassen. Es muß ein Weg gefunden werden, um sicherzustellen, daß alle Behandlungszentren die Empfehlungen auch befolgen, und die Partnerschaft mit Patientenorganisationen wird notwendig sein, damit dies wirklich geschieht.

(3) Die Meßmethoden für die Ergebnisse von klinischen Studien werden standardisiert, d.h., der Art und

Weise, wie klinische Veränderungen nachgewiesen werden. Zwei Arbeitstreffen hat es dafür bereits im Mai und im Juni 2007 gegeben.

(4) Ein Koordinationszentrum für klinische Studien, CTCC, eingerichtet an der Universität Freiburg im Breisgau in Deutschland wird Empfehlungen für die Planung von klinischen Studien für seltene Krankheiten ausarbeiten in Zusammenarbeit mit pharmazeutischen Firmen und Ge-

nehmigungsbehörden.

Am Ende ihres Vortrags sagte Dr. Bushby, daß das TREAT-NMD Programm eine große Gelegenheit für die gesamte Duchenne-Gemeinschaft ist, um voranzukommen, und daß TREAT-NMD schon arbeitet. Die Verwaltung in Newcastle kann mit Fragen und Kommentaren immer unter der Adresse info@treat-nmd.eu per e-Mail erreicht werden.

Warum müssen wir die Mutation genau kennen?

Robert Weiss von der University of Utah in Salt Lake City beantwortete diese Frage, ähnlich wie es *Kevin Flanigan* beim Treffen 2006 in Cincinnati getan hatte.

Die exakte Mutation im Dystrophin-Gen eines Jungen, der Duchenne-Dystrophie zu haben scheint, sollte bekannt sein, um zu bestätigen, daß er wirklich Duchenne-Dystrophie hat und nicht eine der anderen Muskelkrankheiten, wie z.B. eine der vielen Gliedergürtel-Dystrophien, die ähnliche Symptome haben können. Wenn das Leseraster verschoben ist, ist eine Duchenne-Muskeldystrophie immer sehr wahrscheinlich, während eine Mutation, bei der das Leseraster intakt bleibt, in den meisten Fällen eine Becker-Muskeldystrophie voraussagen läßt.

Außerdem erlaubt die Kenntnis der genauen Mutation eine zuverlässige genetische Beratung der Familie des kranken Jungen und seinen über die Mutter verwandten weiteren Familien, in denen Duchenne-Überträgerinnen gefunden werden können. Schließlich werden die zukünftigen Therapien, wie das Exon-Skipping oder das Durchlesen durch Stoppcodons, es erfordern, daß die exakte Mutation im Dystrophin-Gen des Patienten bekannt ist, sie sind *mutations-spezifisch*.

Um Deletionen und Duplikationen zu finden, verwendet man jetzt meistens die MLPA Methode, die auf Englisch *multiplex ligation-dependent probe amplification* heißt und von Dr. *Jan Schouten* von der Firma MRC-Holland in Amsterdam entwickelt wurde.

Für diese, wie für andere genetischen Tests, sind nur 5 bis 10 ml mit EDTA ungerinnbar gemachtes Vollblut notwendig, aus dessen weißen Blutkörperchen das genetische Material isoliert werden kann. Der Patient muß nicht selbst zum Laboratorium kommen, die Blutprobe kann per Post eingeschickt werden.

Eine sehr kurze Beschreibung dieser Methode wäre: 158 Oligonukleotide mit speziell konstruierten Basensequenzen werden verwendet, die sich an zwei Regionen eines jeden der 79 Dystrophin-Exons anlagern. Wenn ein Exon im Gen des Patienten vorhanden ist, binden sich die beiden für dieses Exon bestimmten Oligonukleotide an die beiden Stellen des Exons mit der Komplementärsequenz und werden danach durch ein Enzym miteinander chemisch verbunden. Die verbundenen Nukleotide dienen dann als *template* (als Schablone) für die Multiplikation durch die *polymerase chain reaction*, PCR (die Polymerase-Kettenreaktion), mit der geringe Mengen genetischen Materials stark vermehrt werden können. Die verschiedenen langen Produkte dieser Reaktion kann man dann nach einer elektrophoretischen Trennung als *peaks* (als graphisch dargestellte Höchstwerte) auf einem Computerausdruck sehen. Wenn ein bestimmtes Exon nicht vorhanden ist, weil es *deletiert* ist, können die beiden Nukleotide für die-

ses Exon sich nicht an seine Sequenzen anlagern und auch nicht miteinander verbunden werden. Der entsprechende *peak* fehlt dann in dem Ausdruck.

Mit dieser Technik findet man die Deletionen und Duplikationen aller 79 Exons des Dystrophin-Gens in Duchenne-Patienten, nicht jedoch die Punktmutationen. Und weil es sich um eine quantitative Methode handelt, können auch Deletionen und Duplikationen in einem der beiden Dystrophin-Gene einer Duchenne-Überträgerin zuverlässig gefunden werden, selbst wenn die Deletion oder Duplikation des mit ihr verwandten Patienten nicht bekannt ist. Dies ist einer der wichtigsten Vorteile dieser Methode.

Doch falsch-positive Ergebnisse können vorkommen, die eine Deletion eines einzigen Exons anzeigen, wenn sie tatsächlich nicht vorhanden ist. Dies kann geschehen, wenn in seltenen Fällen in der Sequenz, an die die MLPA-Reagenzien binden, ein *Polymorphismus* aufgetreten ist. Ein Polymorphismus ist eine Änderung eines einzigen Basenpaares in der DNA, die aber keine Krankheit verursacht. Falls die MLPA-Methode die Deletion eines einzigen Exons anzeigt, muß dieses Ergebnis mit einer anderen Methode überprüft werden.

Wenn mit der MLPA-Methode keine Mutation gefunden wird, hat der Patient wahrscheinlich eine Punktmutation. Mit der SCAIP-Technik, englisch *single condition amplification/internal primer sequencing*, die in Dr. *Flanigans* Laboratorium entwickelt wurde, ist es möglich, alle Punktmutationen zuverlässig zu finden und im einzelnen zu charakterisieren, sowie auch alle vorzeitigen Stoppcodons, kleine Deletionen und Einfügungen, und auch Mutationen in den Sequenzen der Spleißstellen. Mit dieser Zweistufen-Methode kann die vollständige Basensequenz aller Exons des Dystrophin-Gens bestimmt werden als auch aller Intron-Exon-Grenzregionen mit den Spleißsignalen und auch aller Promotoren. Alle diese getrennten Genregionen werden zuerst mit einer einzigen Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt, und dann sequenziert mit einer der automatischen Gen-Sequenzierungsmethoden, um Punkt- und andere Mutationen zu finden.

Die neueste Methode für eine effektive und zuverlässige genetische Analyse des Dystrophin-Gens ist die Gen-Chip-Technologie, die ein sog. Mikro-Array benutzt. Wie im nächsten Kapitel über das CETT-Programm beschrieben, wird ein solcher Gen-Chip-Test zur Bestimmung von Exon-Deletionen und -Duplikationen als auch von Punktmutationen bereits von der Emory-Universität in Atlanta angeboten. Es ist vorgesehen, daß solche Gen-Chip-Methoden von vielen klinischen Laboratorien durchgeführt werden können, die sich zu einem internationalen Netz zusammenschließen werden.

Mit diesen Testmethoden, MLPA, SCAIP, und Gen-

Chip-Tests können 95-98% aller Mutationen entdeckt werden. Die restlichen 2-5% können mit ihnen jedoch nicht gefunden werden. Wenn der Patient eindeutige Duchenne- oder Becker-Symptome hat, aber keine Mutation in seiner Blutprobe gefunden wird, dann wird eine Muskelbiopsie notwendig, so daß mit Protein-Nachweismethoden bestimmt werden kann, ob das Dystrophin-Protein in den Muskelfasern vorhanden ist oder nicht. Die *Western-Blot-Methode* hat den Vorteil, daß sich mit ihr die Menge und die Größe des Dystrophin-Proteins bestimmen läßt, doch die *Immunfluoreszenz-Methode* wird meistens angewendet, weil man damit das Dystrophin, wenn es vorhanden ist, unter dem Mikroskop deutlich sichtbar machen kann. Die Zellmembranen der querschnittenen Muskelfasern aus einer Muskelbiopsie-Probe von einem Duchenne-Patienten bleiben dunkel, während in einer Probe eines muskelgesunden Menschen die Grenzen der Muskelzellen als ununterbrochene helle Linien von Fluoreszenzlicht erscheinen. In der Muskelprobe eines Becker-Patienten sieht man nur einige Segmente von hellem Fluoreszenzlicht an den Zellmembranen.

Johan den Dunnen vom Medical Center der Universität Leiden in Holland schickte einen Kommentar, in dem er sagt, daß die DNA-Daten nicht genügen, um mit Sicherheit festzustellen, was wirklich auf dem Niveau der mRNA vor sich geht, und daß es deshalb nicht möglich ist sicher zu entscheiden, welches AON für eine Exon-Skip-

ping-Therapie verwendet werden muß. Veröffentlichte Ergebnisse zeigen, daß bei 5 – 10% der Duchenne-Patienten mit Deletionen oder Duplikationen die mRNA-Sequenzen nicht mit den von der DNA-Analyse erwarteten übereinstimmen. Bevor mit einer Exon-Skipping-Therapie begonnen wird, sollte deshalb die mRNA nach einer Muskel- oder Hautbiopsie isoliert und um die Deletions- oder Duplikationsbruchpunkte herum sequenziert werden, um zu bestätigen, was von einem DNA-Test vorausgesagt wurde. Solche zusätzlichen Untersuchungen sind für alle Duchenne-Jungen, die an der ersten klinischen Exon-Skipping-Studie in Holland teilnahmen, durchgeführt worden. Sie müssen auch später, wenn Exon-Skipping routinemäßig angewendet wird, in allen Fällen vor der Behandlung durchgeführt werden.

In der holländischen Studie wurde außerdem als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme vor der Behandlung an Zellkulturen überprüft, ob das Ergebnis des Exon-Skippings mit dem erwarteten übereinstimmt wird, d.h., ob das letzte Nukleotid vor dem deletierten Exon – oder vor den deletierten Exons – tatsächlich mit dem ersten Nukleotid nach dem geskippten Exon ohne eine Verschiebung des Leserasters verbunden ist.

Die mRNA kann auch verwendet werden, um die seltenen Mutationen zu finden, die den Einbau eines Bruchstücks aus einem Intron in die gespleißten Exons der Dystrophin-mRNA verursacht hat.

Das CETT-Programm und der neue Gen-Chip-Test für Duchenne-Muskeldystrophie.

CETT-Programm für Zusammenarbeit, Fortbildung und Anwendung von genetischen Tests (Collaboration, Education and Test Translation). Dieses neue Programm wurde von **Madhuri Hegde** von der medizinischen Fakultät der Emory-Universität in Atlanta im Staat Georgia in den USA vorgestellt. Es wurde gemeinsam entwickelt vom CDC, dem Zentrum für Krankheitskontrolle und Vorsorge in Atlanta, von den NIH, den Nationalen Gesundheitsinstituten in Bethesda bei Washington, der amerikanischen Gesellschaft für Humangenetik, der Abteilung für seltene Krankheiten der Emory-Universität in Atlanta, des amerikanischen Kollegiums für medizinische Genetik, der Gesellschaft für metabolische Krankheiten und der genetischen Allianz. Dieses Projekt wurde 2006 mit dem Ziel begonnen, die Entwicklung von genetischen Tests zu fördern und sie in die klinischen Laboratorien für seltene Krankheiten zu bringen. Dies wird erreicht, (1) durch die Unterstützung der Zusammenarbeit von Forschung und Klinik zur Entwicklung von genetischen Tests von hoher Qualität, (2) durch Förderung der Registrierung von genetischen und klinischen Daten in öffentlichen Datenbanken zur Unterstützung der therapeutischen Forschung, (3) durch Entwicklung von Richtlinien für Laboratoriumstests, und (4) durch die Herstellung und Verteilung von aktuellem Informationsmaterial für die Patienten, ihre Familien, ihre Ärzte und Betreuer. Einzelheiten des CETT-Programms stehen im Internet unter www.cettprogram.org.

Duchenne-Muskeldystrophie gehört zu den ersten Krankheiten, für die das CETT-Programm eine Zusammenarbeit von Klinik, Forschung und Patienten-Vertretungen aktiv fördert. Durch den ganz besonderen Einsatz von herausragenden Persönlichkeiten wie früher *Jerry Le-*

wis mit der amerikanischen Muskeldystrophiegesellschaft MDA und jetzt *Patricia Furlong* mit dem Parent Project PPMD sind die Probleme und Anliegen der etwa 10.000 Duchenne-Patienten in den USA nicht nur der allgemeinen Öffentlichkeit bekannt, sondern auch den Politikern in Washington und in den Hauptstädten der Einzelstaaten. Die Zusammenarbeit von CETT und PPMD hat bereits ihr erstes wichtiges Ziel erreicht, nämlich die Überprüfung und Einführung an der Emory-Universität von Duchenne-Testverfahren für die Bestimmung der Mutationen im Dystrophin-Gen. Diese Tests benutzen die *Mikro-Array-Technik* mit sog. Gen-Chips. Diese Technik ist außerordentlich empfindlich und liefert ihre Ergebnisse sehr schnell in nur wenigen Tagen. In diesem Zusammenhang bedeutet Überprüfung, daß die Ergebnisse der Gen-Chip-Methoden an vielen Proben von Duchenne-Patienten und Überträgerinnen mit verschiedenen Mutationen verglichen werden mit den Ergebnissen, die an den gleichen Proben mit anderen, bereits eingeführten Methoden erhalten wurden. In allen Fällen wurden bisher die gleichen Mutationen gefunden.

Der neue Gen-Chip genetische Test. In ihrem zweiten Vortrag beschrieb Dr. *Hedge* diesen Test, der in einem oder zwei Schritten durchgeführt werden kann. Im ersten Schritt wird ein *Comparative Genome Hybridization* (CGH)-Array (eine Genom-Hybridisierungs-Vergleichsanordnung) mit der Dystrophin-Gensequenz von 2,2 Millionen Basenpaaren verwendet. Mit diesem ersten Schritt werden Exon-Deletionen und -Duplikationen aufgefunden. Der zweite Schritt ist notwendig, wenn keine Deletionen oder Duplikationen beim ersten Schritt gefunden wurden.

Schritt 1: Die Gen-Chip-Arrays werden von der Firma *Roche-NimbleGen Systems Inc.* in Madison, Wisconsin, hergestellt. Auf einem 25 x 76 mm großen gläsernen Objektträger werden fast 400.000 DNA-Oligonukleotide, die hier *Test-Oligos* genannt werden, mit einer patentierten Technik, die *Maskless Array Synthesizer* heißt, direkt synthetisiert und in einem regelmäßigen Muster (einem *Array*) auf dem Glas verankert. Die Test-Oligos haben eine Länge zwischen 45 bis 60 Basen und enthalten zusammen mehr als zweifach die Sequenz aller 2,2 Millionen Basenpaare des Dystrophin-Gens.

Die DNA aus der Blutprobe eines Patienten wird zuerst in kleine Stücke von ungefähr der gleichen Größe wie die Test-Oligos geschnitten und jedes dieser *Probe-Oligos* mit einem Molekül eines fluoreszierenden Farbstoffs verbunden. Wenn diese Probe-Oligo-Mischung gleichmäßig über den Array mit den Test-Oligos verteilt wird, können sich die Probe-Oligos des Patienten spezifisch mit den komplementären Sequenzen der Test-Oligos auf dem Array zusammenlagern (sie hybridisieren). Die Test-Oligos, die sich mit ihren komplementären Partnern unter den Probe-Oligos des Patienten verbunden haben, können gesehen und dokumentiert werden, weil nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Farbstoff an ihren Probe-Oligo-Partnern sichtbar fluoresziert und ihre Lage auf dem Objektträger bekannt ist.

Wenn das Gen des Patienten eine Deletion hat, bleiben die Test-Oligos mit den Sequenzen aus dem oder den fehlenden Exons ohne Partner, sie hybridisieren nicht und senden deswegen kein Fluoreszenzlicht aus. Wenn einige Exons im Gen dupliziert sind, werden doppelt so viele Test-Oligos als normal mit den entsprechenden Probe-Oligos der duplizierten Exons hybridisiert sein, so daß das von ihnen produzierte Fluoreszenzlicht doppelt so stark als normal ist.

Da die Sequenzen und die Positionen der nicht und doppelt hybridisierten Test-Oligos in dem Array bekannt sind, können die Grenzen der Deletionen und Duplikationen identifiziert werden.

Diese Methode liefert quantitative Ergebnisse, deshalb können Deletionen und Duplikationen nicht nur in dem einen Dystrophin-Gen der Duchenne-Patienten bestimmt werden, sondern auch diese Mutationen in einem der beiden Dystrophin-Gene der Frauen. Mit dem Gen-Chip-Test kann man daher feststellen, ob eine mit dem Patienten verwandte Frau eine Duchenne-Überträgerin ist oder – was manchmal noch viel wichtiger ist – ob sie es nicht ist und daher kein erhöhtes Risiko für eine Wiederholung der Krankheit hat. Dies ist sehr wichtig für die genetische Beratung der Familie.

Da mit dieser Methode die Mutationen im Gen selbst gefunden werden, kann man mit ihr die *ungefähre Lage der Bruchpunkte* einer Deletion oder Duplikation feststellen, d.h., ihren Anfang und ihr Ende, die beide in den meisten Fällen innerhalb der Introns liegen. Dies kann für zukünftige Forschungen wichtig werden, mit denen man die manchmal verschiedenen Symptome erklären könnte, die Patienten mit der gleichen Mutation haben. Man versteht immer mehr, daß die Introns nicht nur *genetic junk* (genetischen Abfall) enthalten, sondern auch Kontrollsequenzen, die unter anderem auch für das Auftreten von klinischen Zeichen der Krankheit verantwortlich sein können. Wenn diese Sequenzen in manchen Patienten durch

Deletionen oder Duplikationen gestört sind, in anderen aber nicht, könnte dies der Grund für das Auftreten verschiedener Symptome sein.

Schritt 2: Wenn keine Deletionen oder Duplikationen mit Schritt 1 gefunden werden, muß Schritt 2 durchgeführt werden, mit dem Punktmutationen identifiziert werden können, also wenn einzelne oder nur wenige Basen ausgetauscht, entfernt oder zusätzlich eingebaut sind. Für diesen zweiten Teil der Analyse wird ein *Resequencing Array* (Array zur wiederholten Sequenzierung) verwendet, mit dem Punktmutationen gesucht werden (1) in den Sequenzen der 14.000 Basenpaare aller Dystrophin-Exons, (2) in den 8 Promotoren des Dystrophin-Gens, (3) in den Intron-Sequenzen von ca. 100 Basenpaaren Länge in den Grenzregionen aller 79 Exons, und (4), in den Sequenzen der Nachbarschaft der fünf sehr seltenen Mutationen, die weit im Innern von Introns bereits vorgekommen sind. Mit dieser Sequenzierung wird jede Nukleotid-Position in den zu analysierenden Regionen des Dystrophin-Gens überprüft, um festzustellen, ob die normale Base vorhanden ist, ob sie durch eine der drei anderen Basen ersetzt wurde, ob sie entfernt oder neu eingefügt wurde.

Die Punktmutationen, kleinen Deletionen und Einfügungen (Insertionen) können die Ursachen sein (1) für die Verschiebung des Leserasters in der mRNA, die zur Duchenne-Dystrophie führt (*frameshift mutation*), (2) für den Austausch einer Aminosäure gegen eine andere (*missense mutation*), die Duchenne- oder Becker-Dystrophie verursachen kann, wenn die neue Aminosäure die Struktur des Dystrophins deutlich verändert, (3) für das Auftreten eines vorzeitigen Stoppcodons, an dem die Synthese des Dystrophins abgebrochen wird (*nonsense mutation*), (4) für die Beeinträchtigung des Spleißmechanismus, wodurch Deletionen in der mRNA hervorgerufen werden können (*splice site mutation*), oder (5) für die Schädigung eines Promoters, die die Dystrophin-Synthese vollständig unterbindet und so auch zu Duchenne-Dystrophie führen kann.

Seltene Ausnahmen. Wie bei allen genetischen Testverfahren, kann es auch vorkommen, daß dieser Gen-Chip-Test für einen Jungen mit Duchenne-Symptomen keine Mutation findet. Dann kann eine Mutation außerhalb der untersuchten Genregionen liegen. Um hier weiterzukommen, soll ein Gen-Chip mit 2,1 Millionen Test-Oligos in einer extrem dichten Anordnung entwickelt werden. In Entwicklung sind bereits Gen-Chips für andere neuromuskuläre Erkrankungen und auch für die Analyse an DNA aus Speichelproben und aus trockenen Blutflecken, die in Screeningprogrammen für Neugeborene erhalten werden. Einige dieser Gen-Chip-Methoden werden bereits mit konventionellen Tests verglichen.

Die Vorteile: Außer den genannten Eigenschaften des neuen Testverfahrens, wie hohe Empfindlichkeit, Zuverlässigkeit und Nachweis fast aller Dystrophin-Mutationen in Patienten und Überträgerinnen, ist als besonderer Vorteil zu erwähnen, daß nur etwa 7 *Arbeitstage* für Schritt 1 nötig sind, um die Deletionen in 60% und die Duplikationen in 5% der Duchenne-Jungen zu finden, und daß für Schritt 2 nur 14 *weitere Tage* gebraucht werden, um auch die Punktmutationen und sehr seltenen Mutationen in den verbleibenden 35% der Patienten zu entdecken.

Der neue genetische Test wird bereits angeboten. Wer den neuen Gen-Chip-Test für seinen Sohn oder weibliche Verwandte durchführen lassen möchte, der sollte das

Emory Genetics Laboratory in Atlanta über das Internet oder telefonisch kontaktieren: www.geneticslab.emory.edu Tel. 001-404-778-8500. Dort bekommt man auch Informationen über Versand des Probematerials und über Kosten und Versicherungsleistungen. Wenn keine Mutation gefunden werden sollte, kann eine Sequenzierung der cDNA, also aller aneinandergereihten Exons, durchgeführt werden, für die mRNA als Ausgangsmaterial gebraucht wird, das aus durch Biopsie gewonnenem Muskelgewebe isoliert werden muß. Blutproben für Schritte 1 und 2 des Tests und Biopsiematerial für die cDNA-Sequenzierung werden auch von außerhalb der USA akzeptiert.

DuchenneConnect wird die Zusammenarbeit und genetische Tests für Duchenne-Muskeldystrophie fördern.

DuchenneConnect ist ein vollkommen neues Internet-Informationszentrum, das die ganze Duchenne/Becker-Gemeinschaft zusammenhalten wird: die Patienten und ihre Familien, die Ärzte und Wissenschaftler, und die pharmazeutische Industrie. Dieses Zentrum wird eine einzige Quelle sein für den Austausch von Daten, Ideen, Behandlungsvorschlägen und die aktuellsten Informationen über Forschung und Behandlungsmaßnahmen.

Kyle Brown von der Firma Innolyt Inc. in San Mateo in Kalifornien, deren Ziel es ist, „die gemeinnützigen Forschungsgesellschaften zusammenzuführen“, beschrieb das neue DuchenneConnect-Programm des PPMD, seine Verbindung zum CETT-Programm und die Notwendigkeit, alle klinischen und genetischen Daten von möglichst vielen Duchenne- und Becker-Patienten zu registrieren.

Kyle Brown sprach die Familien, die ihm zuhörten, ganz persönlich an:

„Wir wollen Eure kranken Kinder und Euch, die Familien, kennenlernen. Wir wollen, daß Ihr Eure Informationen in die DuchenneConnect- und CETT-Programme einlegt. Wir brauchen die klinischen und genetischen Daten Eures Kindes und wollen wissen, wo Ihr wohnt, aber wir werden diese Daten getrennt speichern, um Eure Privatsphäre zu bewahren, wenn wir den Forschern und den pharmazeutischen Firmen und anderen Datenbanken Eure Daten mit Eurer Erlaubnis anbieten. Die Liste mit den Fragen, die wir beantwortet haben möchten, ist bereits lang: Wie wurde Euer Sohn diagnostiziert? Was waren die Ergebnisse seiner genetischen und anderen Tests? Wie gut kann er gehen? Wurden bei ihm orthopädische Operationen wegen Kontrakturen oder einer Skoliose durchgeführt? Welche technischen Hilfsmittel benutzt er? Braucht er Atmungshilfen und, wenn ja, mit welchem Gerät? Hat er Herzprobleme? Gibt es andere Mitglieder Eurer Familie mit der gleichen Krankheit?

Diese Liste ist nicht vollständig, es gibt noch mehr Fragen auf unseren Fragebögen, und weitere werden noch da-

Das CETT-Programm wird weiter ausgebaut. Innerhalb der nächsten Jahre wird die CETT-Organisation ein Netz von klinischen Laboratorien zunächst in den Vereinigten Staaten und dann auch in anderen Ländern etablieren, in denen dieser neue schnelle und zuverlässige Test für alle Duchenne-Patienten und ihre weiblichen Verwandten durchgeführt werden kann. Über das amerikanische Parent Project PPMD mit seiner neuen DuchenneConnect-Initiative kann man Zugang zum CETT-Programm bekommen und zu allem Informationsmaterial, das für die ganze Duchenne-Gemeinschaft erstellt wird.

zukommen. Dieser Informationstransferprozeß wird eine dauernde Frage-und-Antwort-Angelegenheit sein, weil wir für lange Zeit mit Euch in Kontakt bleiben müssen.

Durch DuchenneConnect werdet Ihr sehen können, wie sich die Krankheit Ihres Sohnes im Vergleich mit anderen Jungen entwickelt. Und wir werden Euch zeigen, wo die besten genetischen Berater sind, dort wo Ihr wohnt. Und um unsere Arbeit für Euch immer wertvoller zu machen, brauchen wir Eure Vorschläge und Ideen, die Ihr uns zu jeder Zeit sagen solltet.

Eure Daten in anonymer Form, das heißt, ohne Euren Namen und Eure Adresse, die Euch identifizieren könnten, werden wir den Duchenne-Wissenschaftlern, wo auch immer sie arbeiten, anbieten, falls sie sie für ihre Forschung nach einer Therapie brauchen. Und wir werden mit anderen Datenbanken überall in der Welt zusammenarbeiten, vorausgesetzt, sie haben die gleichen Standards und Vorschriften wie wir. Auch pharmazeutische Firmen werden Zugang zu den Daten haben, wenn sie z.B. Patienten mit besonderen Mutationen für ihre klinischen Studien brauchen. Aber wenn sie Euch kontaktieren wollen, müssen sie erst uns fragen, ob Ihr Eure Erlaubnis für den Datenaustausch gegeben habt. Ihr werdet also immer die Kontrolle darüber haben, was mit Euren ganz persönlichen Daten geschieht.

Das Ergebnis dieses Programms wird eine intensive Zusammenarbeit nicht nur innerhalb der USA, sondern auch später auf internationaler Ebene sein, in der Euer Sohn und seine ganze Familie die wichtigste Rolle spielen wird.

Bitte registriert Eure Familie im Internet-Informationszentrum des PPMD und werdet Teil dieses umfassenden Netzes, die Adresse ist: <http://www.duchenneconnect.org>. Zurzeit verwenden wir nur die englische Sprache, jedoch werden unsere Informationen in Kürze auch in andere Sprachen zur Verfügung stehen.“

Was bedeutet „Connect...“ im Titel des Treffens in Philadelphia?

Abschließende Worte von Patricia Furlong. „Das Wort *connect*, (auf Deutsch „Verbinde! Halte zusammen!“), bedeutet, daß es auf jeden Jungen und jungen Mann mit Duchenne ankommt und ebenso auf seine Familie, seine Ärzte und Betreuer, die dafür sorgen, daß sie alle ein mög-

lichst normales Leben führen können; und dazu gehören auch die Wissenschaftler, die alles tun, um eine Therapie für sie zu finden. *Connect* heißt auch, daß alle, die ganze Duchenne-Gemeinschaft, zusammenhalten und zusammenarbeiten muß, damit die Duchenne-Dystrophie nicht

mehr die normalen 70 Jahre oder 25.000 Tage eines menschlichen Lebens auf 20 Jahre oder 7.300 Tage nach der Diagnose reduzieren kann. Die immer noch fehlenden 50 Jahre müssen weniger und weniger werden bis sie ganz verschwinden, wenn es vielleicht nicht eine vollständige Heilung geben wird, dann aber wenigstens eine wirksame Therapie in der nicht zu fernen Zukunft. Meine beiden Söhne starben, als sie 15 und 17 Jahre alt waren, sie hatten nicht einmal die 7.300 Tage, aber das war vor mehr als 10 Jahren. Jetzt, in den letzten 10 Jahren, wurden 1.500 Tage zugefügt, das ist ein Viertel eines Duchenne-Lebens, und die Jungen haben jetzt 8.800 Tage, das sind 25 Jahre, mehr oder weniger. Es gibt also Fortschritte, und sie werden sich beschleunigen auf allen therapeutischen Forschungswegen, auf denen in vielen Laboratorien und Kliniken in der ganzen Welt ganz aktiv gearbeitet wird.

Die Liste der Forschungsstrategien ist lang. Viele sind auf diesem Treffen diskutiert worden, und Ihr werdet verstehen, daß wir mit immer mehr werdenden positiven Ergebnissen und klinischen Studien vorankommen, und daß es eine wirkliche Hoffnung gibt, daß wenigstens eine oder auch mehrere der neuen Techniken – Exon-Skipping, und Stoppcodon-Durchlesen z.B. – in einigen Jahren erfolgreiche Therapien sein werden.

Wir machen uns oft Gedanken darüber, ob unser Warten vergeblich sein wird, doch dieses Treffen hat gezeigt, daß es wirkliche Fortschritte gibt, nicht nur bei der Forschung, sondern auch bei der medizinischen Betreuung der Jungen und jungen Männer, die immer besser wird. Und, was ganz wichtig ist, die Öffentlichkeit und die Regierungen mit ihren Gesundheitsministerien in vielen Ländern beginnen zu verstehen, daß Duchenne ein weltweites Problem ist, und daß wir *mit vereinten Kräften mit Duchenne fertig werden* müssen. Allmählich stehen uns jetzt auch größere Mengen Geld zur Verfügung, und unsere eigenen Anstrengungen, die weiter intensiviert werden müssen, fügen noch bedeutend mehr hinzu, so daß neue Forschungsprojekte möglich werden und bereits weit vorangekommene Projekte noch beschleunigt werden.

In einigen der klinischen Studien mit Duchenne-Jungen, besonders in den wichtigsten wie Exon-Skipping, Stoppcodon-Durchlesen, Utrophin-Hochregulieren und Gen-Transfer, werden neue therapeutische Techniken an-

gewendet. Deshalb müssen diese Versuche sehr sorgfältig durchgeführt werden, damit sie absolut sicher und erfolgreich sind. Es werden noch mehr klinische Studien notwendig werden, deswegen brauchen die Forscher Eure dauernde Mitarbeit an den Studien trotz aller Schwierigkeiten wie Reisen und die vielen, manchmal anspruchsvollen Testprozeduren wie wiederholte Biopsien, selbst wenn kein therapeutischer Vorteil erwartet werden kann. Die Teilnahme von immer mehr Ihrer Jungen ist notwendig.

Duchenne ist keine einfache Krankheit. Es wird wahrscheinlich nicht nur eine einzige Therapie geben, die allen Patienten helfen kann. Wahrscheinlich werden mehrere verschiedene Techniken in vielen Fällen für eine wirksame Behandlung notwendig sein. Aber niemand wird alleingelassen werden. PTC124 wird jetzt in einer Phase-III Studie getestet werden. Exon 51 wird als erstes in den klinischen Versuchen geskippt, und andere Exons werden folgen, auch die für die schwierigen und seltenen Mutationen. Aber auch die Studien mit den konventionellen Methoden werden positive Ergebnisse bringen, die zu Behandlungen führen, die die Krankheit zwar nicht heilen werden, die aber ihr Fortschreiten bremsen und die Muskeln aufrechterhalten können, während weiter gewartet werden muß bis eine wirksamere und langdauernde Therapie fertig ist.

Und bitte versteht, daß viele der zukünftigen Therapien mutationsspezifisch sind. Das bedeutet, daß es wichtig ist, die genaue Mutation jedes Duchenne-Jungen zu kennen, damit entschieden werden kann, welche Therapie die richtige für ihn sein wird. Es existieren sehr gute Methoden, mit denen die Mutationen genau analysiert werden können, auch die der Mütter und ihrer weiblichen Verwandten, so daß jetzt sehr zuverlässige genetische Beratungen möglich sind.

Das ist also unser Standpunkt: Alle Kinder und jungen Männer, die Duchenne-Dystrophie haben, und wo immer sie sind, brauchen und verdienen eine genaue und frühzeitige Diagnose, zuverlässige genetische Tests, Betreuung nach den neuesten Methoden, die Gelegenheit, an klinischen Studien teilzunehmen, und Zugang zu aussichtsreichen Behandlungen. Um mit Duchenne Schluß zu machen, müssen wir zusammenstehen (to connect) und zusammenarbeiten, damit die 8.800 Tage eines Duchenne-Lebens 25.000 und mehr werden.“

Diesen Philadelphia-Bericht habe ich auf Englisch in den Monaten September bis November 2007 geschrieben und mit einigen Aktualisierungen im Dezember 2007 und Januar 2008 ins Deutsche übersetzt. Ricardo Rojas in Mexiko, ein junger Mann mit Becker-Dystrophie, hat ihn zur gleichen Zeit ins Spanische übersetzt. Übersetzungen ins Japanische und in andere Sprachen wird es ebenfalls geben. Dieser Bericht und die Berichte über das PPMD-Treffen im Juli 2006 in Cincinnati und das Action-Duchenne-Treffen im Oktober 2006 in London stehen auf Englisch, Deutsch und Spanisch im auf meinen Internetseiten www.duchenne-forschung.de.

Den Bericht werde ich mit den Informationen vom ActionDuchenne-Treffen im November 2007 in London und aus neuen Veröffentlichungen im Frühjahr 2008 aktualisieren. Wer alle meine zukünftigen Berichte per e-Mail erhalten möchte, sobald sie fertig sind, der schicke mir bitte seine e-Mail-Adresse.

Dr. rer. nat. Guenter Scheuerbrandt, Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, e-mail: gscheuerbrandt@t-online.de