

## Lesen durch vorzeitige Stoppcodons mit PTC124. Suche nach neuen Duchenne-Medikamenten mit Projekt Katalyse.

### Interview mit Ellen Welch PhD., Diane Goetz, und Neil Almstead PhD. PTC Therapeutics, South Plainfield, New Jersey, USA

Dieses Interview wurde von mir, Dr. rer. nat. **Guenther Scheuerbrandt**, in der Firma PTC Therapeutics in South Plainfield, New Jersey (etwa 30 km westlich von New York) am 21. Juli 2008 aufgezeichnet nach der Jahrestagung des PPMD, des amerikanischen *Parent-Project Muscular Dystrophy* in Philadelphia. Der folgende Text ist die Übersetzung des bearbeiteten und verkürzten Textes des im Original englischen Interviews. Er wurde von PTC für die Information der Patienten, ihren Familien und Betreuern genehmigt. Meine Fragen sind kursiv geschrieben, die Antworten von **Ellen Welch**, Associate Director, Genetic Disorders; **Diane Goetz**, Director, Patient and Professional Advocacy; and **Neil Almstead**, Senior Vice President, Chemistry, in normaler Schrift. Die Kapitel über PTC124 und Projekt Katalyse (Project Catalyst) aus meinem letzten Bericht "Wege der Forschung nach einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie" sind am Ende dieses Textes wiederholt und sollten als Einführung zu diesem Interview gelesen werden..

*Dieses Interview wird vor allem von Duchenne-Patienten und ihren Familien gelesen werden. Wir brauchen nicht zu wiederholen, was ich in meinem letzten Duchenne-Forschungsbericht über PTC124 und Projekt Katalyse geschrieben habe, sondern sollten lieber sprechen über Ihre weiteren Entwicklungen von Therapien für die Duchenne-Muskeldystrophie. Dies sollte den Familien Hoffnungen machen, daß es einmal wirksame Behandlungen in der nicht zu fernen Zukunft geben wird.*

**Der Anfang von PTC Therapeutics.** *Meine erste Frage ist: Wann wurde PTC gegründet und warum wählten Sie Duchenne-Muskeldystrophie und Mukoviszidose als die ersten Ziele Ihrer Forschungen?*

Wir hatten gerade im April unseren zehnjährigen Geburtstag. Unsere Firma, PTC Therapeutics, wurde von Dr. **Stuart Peltz** und Dr. **Allan Jacobson** gegründet aufgrund Technologie, die sie in ihren eigenen Laboratorien anwendeten. Sie untersuchten damit, wie die RNAs, die Ribonukleinsäuren, die Proteine im Körper produzieren, und sie waren überzeugt, daß man mit Substanzen, die aus kleinen Molekülen bestehen, die Fehler der RNAs reparieren könnte, die erbliche Krankheiten verursachen.

Wir begannen über Mukoviszidose zu arbeiten, weil wir schon mit Dr. **David Bedwell** von der Universität von Alabama zusammenarbeiteten, der mit seiner klinischen Gruppe über Mukoviszidose forschte. Wichtig war vor allem, daß er eine Maus entwickelt hatte, die menschliche Mukoviszidose-Gene hatte, in denen eine "Nonsense"-Mutation enthielten, die ein vorzeitiges Stoppcodon verursachte. Und er konnte zeigen, daß sich mit dem Antibiotikum Gentamicin dieses Stoppsymbol ignorieren ließ, so daß das CFTR-Protein, das in Patienten mit Mukoviszidose fehlt, wieder produziert wurde.

Und wir begannen auch über Duchenne zu arbeiten, weil Professor **Lee Sweeney** von Universität von Pennsylvania 1999 mit **Beth Barton** gezeigt hatte - gerade nachdem unsere Firma gegründet wurde -, daß Gentamicin auch durch das vorzeitige Stoppsymbol im Exon 23 der

dystrophischen mdx-Maus lesen konnte. Diese Mäuse konnten dann wieder das normal-lange Dystrophin-Protein machen, und ihre Symptome waren verringert.

Deswegen riefen wir Lee einfach an und fragten ihn, ob er eine unserer Substanzen an seiner Maus testen würde. Er sagte: "Na klar, schickt die Substanz zu uns und wir werden sie für Euch testen". Lee ist ein wunderbarer Mensch, ihm ist es egal, ob er eine Veröffentlichung machen kann oder nicht, wichtig ist es für ihn, Medikamente für Patienten zu entwickeln.

**Die ersten Ziele: Duchenne Muskeldystrophie und Mukoviszidose.** *Dann begannen Sie also gleich am Anfang Ihrer Arbeiten, ein Medikament mit kleinen Molekülen für Duchenne und Mukoviszidose zu entwickeln.*

Und wir tun das immer noch. An diesen beiden Projekten arbeiten wir im gleichen Tempo. Diese beiden Krankheiten sind die häufigsten genetischen Krankheiten des Kindesalters. Gegen sie muß man unbedingt etwas finden. Und wir sind froh, daß wir Versuchstiere hatten, mit denen wir testen konnten, ob unsere Substanzen wirklich funktionieren. Das ist also der Grund, warum wir über diese beiden Krankheiten arbeiten.

Etwa vor zwei bis drei Jahren gingen wir zur FDA (Federal Drug Agency) der amerikanischen Zulassungsbehörde, und erklärten, daß wir ein kleines Molekül hatten, das durch eine Nonsense-Mutation lesen kann, und daß wir es als Therapie für Muskeldystrophie und Mukoviszidose entwickeln wollten. Man sagte uns, daß wir ein solches Medikament für die beiden Krankheiten getrennt entwickeln müßten, und vor allem sollten wir beweisen, daß es sicher ist, weil die Patienten es lebenslang nehmen müßten. Deswegen arbeiteten wir klinische Studien aus, die jetzt für Duchenne und Mukoviszidose auch durchgeführt werden.

*Etwa 13% der Duchenne-Patienten könnten mit PTC124 behandelt werden. Wie ist die Situation bei der Mukoviszidose?*

Im allgemeinen tritt die Mukoviszidose nur in der weißen Bevölkerung auf, und etwa 10% der Patienten haben eine Nonsense-Mutation. Aber in Israel beträgt dieser Prozentsatz um die 60%, denn dort gibt es einen "Founder"-Effekt, nämlich daß sich eine Mutation von einem einzigen Patienten mit der Zeit in der Bevölkerung ausgebreitet hat.

Die genetische Situation bei der Mukoviszidose unterscheidet sich von der der Muskeldystrophie. Das Gen für Muskeldystrophie liegt auf dem X-Chromosom. Jungen haben nur ein Dystrophin-Gen. Bei der Mukoviszidose, englisch abgekürzt CF (cystic fibrosis), ist das CFTR-Gen auf beiden Chromosomen Nummer 7 betroffen. Jeder Patient hat also zwei mutierte Gene und die beiden CF-Mutationen können verschieden sein. Eine kann die sehr häufige Delta-F108-Mutation sein, die zu einer Deletion der kritischen Aminosäure Phenylalanin führt, und auf dem anderen Gen kann eine Nonsense-Mutation sein. Selbst wenn nur ein Stoppcodon auf einem Gen ist und eine andere auf dem anderen, wird PTC124 wahrscheinlich helfen können.

**Wie funktioniert PTC124?** *Bevor wir Projekt Katalyse diskutieren, habe ich eine biochemische Frage: Wenn PTC124 durch ein Stoppcodon hindurchliert, das aus einem Aminosäure-Codon durch Änderung eines seiner drei genetischen Buchstaben entstanden ist, wird dieses Codon nicht mehr für die Proteinsynthese verwendet. Hat dann nicht das Dystrophin-Protein oder das Mukoviszidose-Protein CFTR eine Aminosäure weniger?*

Nein, wenn das Ribosom, das ein Protein durch Übersetzen der messenger-RNA produziert, ein vorzeitiges Stoppcodon erreicht, wird es anhalten und es entsteht ein verkürztes Protein. Wenn PTC124 zugegen ist, veranlaßt es das Ribosom nicht, das vorzeitige Stoppcodon zu überspringen; es läßt das Ribosom eine andere Aminosäure einbauen, die normalerweise gut vertragen wird, es sei denn, das ändert eine kritische Stelle im Protein. Aber im allgemeinen ist das kein Problem. Über das Stoppcodon wird nicht einfach "rübergehoppst" wie beim Exon-Skiping. Es wird eine andere Aminosäure eingebaut.

*Ist bekannt, wie PTC124 auf molekularer Ebene reagiert?*

Der genaue molekulare Mechanismus ist nicht bekannt, aber wir können uns schon vorstellen, was PTC124 eigentlich macht. Die FDA verlangt nicht, daß wir den genauen Mechanismus kennen, um PTC124 weiterentwickeln zu können

*Sie haben wahrscheinlich getestet, ob PTC124 nicht noch etwas anderes tut als durch vorzeitige Stopps zu lesen. Sind Sie ganz sicher, daß es nicht irgend etwas mit den anderen unserer etwa 20.000 Genen macht? Und warum liest es nicht durch normale Stopps durch?*

Wir haben uns nicht alle die anderen 20.000 Gene angesehen. Was wir aber getestet haben, war, ob PTC124 auch durch ein normales Stoppszeichen am Ende der mRNA lesen kann. Deshalb prüften wir bei einigen Genen, ob PTC124 manchmal das entsprechende Protein länger werden läßt. Wir fanden aber nichts, es gab keine Verlängerungen. Dann verabfolgten wir PTC124 in extrem hohen Dosen an Ratten und Hunde und überprüften verschiedene Gewebe - Gehirn, Herz, Eingeweide -, um zu sehen, ob in dem lebenden Tier PTC124 durch die norma-

len Stoppcodons liest. Wir sahen wieder gar nichts. Deshalb sind wir sicher, daß PTC124 gezielt nur durch vorzeitige Stopps liest.

Warum ist das so? Die Messenger-RNA hat keine gerade Struktur, sie ist kreisförmig, so daß ihr Anfang und ihr Ende zusammengelagert sind. Wenn das Ribosom zum normalen Endcodon kommt, ist es wieder in der Nähe des Anfangs der RNA. Beim vorzeitigen Stoppcodon ist das anders, es entsteht durch eine Nonsense-Mutation in einem Genabschnitt, in dem das Ribosom "übersetzt" und das Protein macht. Deshalb befinden sich die beiden Sorten von Stoppcodons, die normale und die vorzeitige, in ganz verschiedenen Umgebungen. Und das ist, was PTC124 so spezifisch macht, es ist sehr, sehr wählerisch!

**Projekt Katalyse.** *Bitte erklären Sie jetzt, was Sie im Projekt-Katalyse machen.*

Lee Sweeney war eigentlich derjenige, der vorschlug, daß wir mit **Pat Furlong**, der Präsidentin von PPMD, über Projekt Katalyse arbeiten, um weitere Medikamente gegen Duchenne zu finden, die bestimmte Substanzen hoch- oder herunterregulieren können.

Wie Sie in Ihrem Forschungsbericht erklärt haben, arbeiten wir jetzt an fünf Projekten, bis vor kurzem waren es sogar sechs. Aber eine der Substanzen, Phospholamban, das die Herzfunktion stabilisiert, konnten wir chemisch nicht optimieren. Deswegen arbeiteten wir hier nicht weiter, sondern versuchen jetzt, seinen Bindungspartner, SERCA2a, hochzuregulieren, was die Kontraktion des Herzmuskels verbessern sollte. Da viele Patienten Herzprobleme haben, manche sogar recht früh, dachten wir, daß wir etwas brauchen, das positiv auf das Herz wirkt, wenn wir eine Mischung von Medikamenten, einen therapeutischen Cocktail, entwickeln wollen.

Die anderen fünf Projekte sind das Hochregulieren des muskelspezifischen Wachstumsfaktors IGF-1 und das Herunterregulieren von Myostatin. Und dann möchten wir die Muskelmembran stärker machen, deswegen hoffen wir, das fehlende Dystrophin durch das Hochregulieren von Utrophin zu ersetzen. Und mehr Alpha-7-Integrin würde die Membran von außen her stabilisieren.

*Die möglichen Duchenne-Medikamente, die Sie in Projekt-Katalyse entwickeln, wären für 100% der Jungen, für alle, und nicht nur wie PTC124 für 13% von ihnen, nicht wahr?*

Ja, sie würden für alle Jungen sein. Und wir könnten sie mit PTC124 kombinieren, warum nicht?

**Automatisches Medikamenten-Screening.** *Wir wollen jetzt zur automatischen Suche, zum Screening, nach Medikamenten kommen. Wir sollten den Familien erklären, wie diese wissenschaftliche Arbeit wirklich getan wird. In Filmen, in denen Wissenschaftler vorkommen, werden sie immer gezeigt, wie sie etwas kochen oder irgendeine Flüssigkeit von einem Reagenzglas in ein anderes kippen. Heute ist das aber ganz anders, mit all den Computern und elektronischen Geräten. Können Sie etwas darüber sagen, ohne zu sehr in technische Einzelheiten zu gehen?*

Unser Weg, ein Medikament zu finden, ist, wie in größeren Firmen auch, so etwas wie Suche nach der berühmten Nadel im Heuhaufen. Wir haben eine "Bibliothek", eine Sammlung sehr kleiner Mengen von etwa 200.000 Substanzen. Man kann sie von Firmen kaufen, die

sich darauf spezialisiert haben, sie zusammenzustellen oder sie auch herzustellen. Wir wählen aus ihren Katalogen diejenigen Substanzen aus, die schon gewisse Eigenschaften von Medikamenten haben. Im allgemeinen sollten sie Pulver sein, die in Wasser löslich sind und deren Moleküle weniger als 500 atomare Masseneinheiten haben, das heißt, eines ihrer Moleküle sollte nicht schwerer als 500 Wasserstoffmoleküle sein. Und sie müssen auch noch andere Eigenschaften haben.

Wir bekommen diese Pulver in Gläschen, wir heben sie bei uns aber gekühlt in "Well Plates" auf, das sind durchsichtige rechteckige Kunststoff-Platten, etwa 6 mal 10 Zentimeter groß, mit 96 Vertiefungen wie kleine Reagenzgläser. Die "schnelle" automatische Screening-Maschine überträgt dann etwas Substanz aus allen Wells von jeweils vier dieser 96er Platten in größere Platten mit 284 Vertiefungen und verwendet diese für den Screeningprozeß.

Die Vertiefungen haben Strichcode-Markierungen, um ihren Inhalt identifizieren zu können. Dies ist wichtig, weil nach dem Testen die Vertiefungen gefunden werden müssen, in denen sich "Hits", die Treffer, befinden, nämlich die Substanzen, die die gewünschten Aktivitäten zeigten. Wir besorgen uns dann mehr von dem Material der Hits für die folgenden chemischen Untersuchungen und Veränderungen.

Wir wollen jetzt erklären, mit welcher Testmethode die Screening-Maschine die Hits findet, die Substanzen, die dann später nach ihrer Optimierung die gewünschten Eigenschaften haben werden. Da es nicht praktisch ist, ihre normalen biologischen Reaktionen zu messen, zum Beispiel das Hochregulieren von Utrophin oder das Herunterregulieren von Myostatin, verwenden wir eine einzige biochemische Signalsubstanz, einen Indikator, der es uns erlaubt, die Aktivitäten aller fünf Zielsubstanzen zu bestimmen, und der uns auch geholfen hat, PTC124 zu finden. Dieser Indikator ist das Enzym Luziferase, das in Glühwürmchen das Licht erzeugt. Für unseren Test kombinieren wir das Gen der Zielsubstanz mit dem Gen der Luziferase, so daß die Aktivitätsänderungen der fünf Zielsubstanzen in isolierten Muskelzellen durch die getesteten Verbindungen auch eine entsprechende Hoch- bzw. Herunterregulierung der Luziferase verursacht. Es ist viel einfacher, die Intensität des Lichtes zu messen, die von diesem Glühwürmchen-Enzym produziert wird, als die Ergebnisse komplizierter biologischer Reaktionen.

Um den Screeningtest durchzuführen, werden die isolierten Muskelzellen und das Indikator-System in die Screening-Maschine gegeben. Dann wird eine ganze Serie der 384er-Platten, die die zu testenden Substanzen enthalten, in den Eingang der Maschine gestellt. Die Maschine holt alle paar Sekunden eine Platte nach der anderen, füllt in jede Vertiefung Muskelzellen und Indikator-System, und dann nacheinander eine der zu testenden Substanzen und läßt das Ganze eine Zeitlang bei einer bestimmten Temperatur miteinander reagieren, sie "inkubiert" die ganze Mischung. Am Ende der Reaktion wird das Glühwürmchenlicht in allen Vertiefungen einer Platte mit photographiert, und die Lichtintensitäten automatisch gemessen und zu einem Computer geschickt, der die endgültigen Ergebnisse berechnet und aufzeichnet.

**Optimierung der aktiven Verbindungen.** *Und wie kommen Sie jetzt an die Hits und wie verarbeiten Sie sie*

*weiter?*

Am Ende einer Testserie gehen wir zurück zu den ursprünglichen 96er Platten, von denen wir jetzt wissen, daß sie einige aktive Verbindungen enthalten, die Hits, und wir wissen auch, wo sie sind. Die holen wir mit einem sog. Kirschenpflücker heraus, mit der die Maschine eine kleine Menge jedes Hits in eine Vertiefung einer neuen Platte transferiert. Diese neue Platte wird dann nur Hits enthalten. An ihnen wiederholen wir den Screeningtest noch einmal, um zu bestätigen, daß die Aktivität wirklich noch da ist. Wenn das so ist, machen wir jetzt eine Konzentrationskurve, indem wir die Aktivität mit verschiedene Mengen der Hit-Substanz messen. Wenn wir eine gute Dosisabhängigkeit finden, das heißt eine größere Aktivität mit mehr Substanz, dann wissen wir, daß dieser Hit sich bereits von Anfang an ein bißchen wie ein Medikament verhält.

*Wie viele Hits finden Sie?*

Normalerweise finden wir ungefähr 1.000 bis 2.000 Hit-Verbindungen unter 200.000 getesteten Substanzen. Und etwa 50% davon geben reproduzierbare Dosisabhängigkeiten.

Und dann führen wir weitere Untersuchungen durch. Dafür testen wir die wirkliche biologische Reaktion der Zielsubstanzen und nicht der Luziferase, um zu sehen, ob ein solcher reproduzierbarer Hit nicht nur im ursprünglichen Screeningtest aktiv ist, sondern wirklich die Aktivität der Zielsubstanz beeinflusst. Nur 20 bis 50% der verbliebenen Verbindungen werden auf diese Weise bestätigt. Wir wollen eben sicherstellen, daß sie wirklich das tun, was wir wollen

*Und danach werden sie also optimiert?*

Ja, weil jetzt die Chemiker mit ihrer Arbeit beginnen. Der erste Schritt ist festzustellen, ob diese Substanzen wirklich die Eigenschaften haben, die es uns erlauben, sie zu Medikamenten weiterzuentwickeln. Wir bestimmen ihre Toxizität in Zellkultur, und wir stellen sicher, daß sie leicht zu synthetisieren sind. Wenn sie Naturprodukte sind, kann es sein, daß sie kompliziert sind. Wir testen, ob sie genügend wasserlöslich sind, damit sie im Magen schnell gelöst und absorbiert werden. Im allgemeinen folgen wir den Empfehlungen für die Eigenschaften von potentiellen Medikamenten.

Die Chemiker gehen dann wieder an unsere Bibliothek und schauen nach, ob sie auch noch ähnliche Substanzen wie die Hits enthält und testen die dann auch. Sie beginnen dann, diese Moleküle zu synthetisieren, bestätigen wieder die Aktivität, und schließlich modifizieren sie ihre Struktur, was ihre Aktivität verbessern kann oder auch nicht. Am Ende dieser Arbeiten, die mehrere Jahre dauern können, haben wir von 100 Verbindungen vielleicht nur noch 5 bis 10 wirklich vielversprechende für jede Zielsubstanz. Das ist ein ganz schön steiler Absturz über die Klippen hinunter!

*Wie viele optimierte oder zu optimierende mögliche Medikamente haben Sie jetzt für jedes der fünf Ziele von Projekt Katalyse? Und wie lange wird es dauern, bis klinische Studien an Duchenne-Patienten begonnen werden können?*

Zur Zeit haben wir mehrere interessante Substanzen für jedes der therapeutischen Ziele identifiziert. Wir sind dabei, diese Moleküle an Tiermodellen der Krankheit zu testen. Wir werden diese Substanzen weiter optimieren, bis

wir mit ihrer Aktivität und ihrer Sicherheit zufrieden sind. Es müssen noch viele Schritte getan werden zwischen heute und dem Beginn von klinischen Versuchen, deswegen ist es schwierig, die Zeit dafür genau vorauszusagen, es wird aber sicher noch einige Jahre dauern.

**Die internationale klinische PTC124-Studie.** *Kommen wir zurück zu PC124. Die Einzelheiten Ihrer internationalen Langzeitstudie habe ich in meinem letzten Bericht beschrieben (siehe Auszug am Ende des Interviews). Kurz gesagt: 165 Patienten werden in drei Gruppen 48 Wochen lang mit zwei Dosen von PTC124 und Placebo behandelt. Hat dieser Versuch inzwischen begonnen?*

Er ist in 38 Kliniken begonnen worden, und etwa 20 wählen jetzt noch ihre Patienten aus. Wir haben ein Expertenkomitee zur Überwachung der Studie und für die Auswertung der Ergebnisse. In Europa gehören dazu Drs. **Kate Bushby** in Newcastle und **Thomas Voit** in Paris und in den USA Drs. **Valerie Cwik** von der MDA und **Giovanna Spinella** vom PPMD. Jeder Patient wird fast ein Jahr lang behandelt. Danach können alle Jungen, auch die, die Placebo bekommen haben, das Medikament während einer Verlängerung der Studie bekommen. Wahrscheinlich werden sie die höchste Dosis bekommen, 80 mg/kg/Tag in drei täglichen Portionen von 20, 20 und 40 mg/kg.

Die endgültigen Ergebnisse werden wahrscheinlich im Winter oder Frühjahr 2010 zur Verfügung stehen. Wir werden also in etwa zwei Jahren bei der FDA einen NDA ("new drug application", Antrag für ein neues Medikament) stellen. Da man uns eine beschleunigte Bearbeitung zugesagt hat, sollten wir - aber das ist keine Garantie - etwa innerhalb von sechs Monaten danach die Zulassung haben. Natürlich kann so manches noch schief gehen und die Zulassung verhindern.

*Wir können also die Zulassung für Ende 2010 erwarten?*

Ja, Ende 2010. Und wir werden auch einen Antrag bei der EMEA stellen, der "European Medical Agency", für die europäischen Länder. In vielen anderen Ländern müssen wir uns mit deren Genehmigungsverfahren auseinandersetzen. Aber vieles können wir in Zusammenarbeit mit unserem neuen Partner machen, mit der Firma Genzyme, die eine viel größere Firma als PTC ist und Niederlassungen in vielen Ländern der Welt hat.

*Wird PTC124 teuer sein?*

Es ist heute einfach zu früh, um über den Preis von PTC124 nachzudenken. Jetzt konzentrieren wir uns erst einmal auf die klinische Studie. Wenn wir wissen, daß PTC124 wirkt und sicher ist, können wir über den Preis sprechen.

**Was ist PTC124?** *Eine letzte Frage: Was bedeutet der*

Als Einführung zu diesem Interview sind hier zwei Kapitel über PTC124 und Projekt Katalyse angefügt, die Teil meines letzten Forschungsberichtes "Wege der Forschung nach einer Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie" sind, den ich im Juni 2008 veröffentlicht habe. Den vollständigen Bericht auf Deutsch, Englisch und Spanisch, sowie die drei vorangegangenen Berichte, können Sie im Internet unter [www.duchenne-information.eu](http://www.duchenne-information.eu) sehen und herunterladen. In diesen Berichten habe ich auch die biochemischen und genetischen Grundlagen der Duchenne-Muskeldystrophie erklärt.

Diejenigen, die meine zukünftigen Berichte und Interviews per e-Mail erhalten möchten, sobald sie fertig sind, schicken mir bitte ihre Adresse an [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de).

**Durchlesen durch vorzeitige Stoppcodons mit PTC124.** In 13 bis 15% aller Duchenne-Patienten wird die Krank-

*Name PTC124??*

PTC ist die Abkürzung für "post transcriptional control" (Kontrolle nach der Transkription), und 124 kommt von seinem chemischen Namen: Es ist ein 1,2,4-Oxidiazol, ein fünfgliedriger Ring aus zwei Kohlenstoff-, einem Sauerstoff- und zwei Stickstoff-Atomen, an dem zwei Benzolringe hängen mit zwei kleinen Seitenketten. Die Struktur wurde in der ausführlichen Veröffentlichung in der Zeitschrift Nature erwähnt, und sie ist natürlich patentiert.

**Einige abschließende Worte.** *Ich denke, Sie sollten jetzt einige ermutigende Worte zum Abschluß dieses Interviews sagen.*

Wir freuen uns natürlich sehr über den Fortschritt, den wir mit PTC124 gemacht haben. Wir versuchen, so schnell wir können, weiter voranzukommen, um es für alle Duchenne-Jungen fertig zu haben, die es brauchen. Wir freuen uns auch über die Aussichten von Projekt Katalyse. Für die Jungen, die keine Nonsense-Mutation haben, ist es wichtig, daß wir diese anderen Medikamente für alle 100% von ihnen fertig entwickeln. Selbstverständlich arbeiten wir auch hier so schnell wir können. Ihre Entwicklung wird schneller gehen als die für PTC124, weil der klinische Weg zu ihnen nicht sehr verschieden ist, und wir haben jetzt auch mehr Erfahrungen. Aber das hängt auch von den Ergebnissen der internationalen Studie mit PTC124 ab.

Wir konzentrieren unsere Arbeit aber nicht nur auf die Duchenne-Muskeldystrophie, sondern auch auf mögliche Medikamente, die andere Krankheiten behandeln können, wie die Spinale Muskelatrophie, die myotone Dystrophie und weiterhin die Mukoviszidose. Dies unterscheidet uns von großen pharmazeutischen Firmen, die sich viel mit Lifestyle-Medikamenten beschäftigen. Bei PTC tun wir jedoch alles, um Therapien für vielleicht nicht so häufige Krankheiten zu finden, für wirklich ernste, die schwierig zu behandeln sind. Das ist und bleibt wichtig für uns alle.

*Wenn ich mit Duchenne-Familien spreche oder ihnen schreibe, sehe ich, was wirkliche Probleme sind. Wenn ich die mit meinen Problemen vergleiche, die ich lösen kann, selbst wenn das schwierig ist, dann verstehe ich, daß sie gar nichts sind im Vergleich mit denen, die ein Junge mit Duchenne für viele Jahre mit sich bringt.*

Das ist auch die Motivation für unsere Forscher, die sich mit einer solchen Krankheit beschäftigen. Das gibt unserer Arbeit einen besonderen Sinn, und vielleicht wird man sich auch später noch daran erinnern.

*Ganz herzlichen Dank, auch im Namen der vielen Familien und allen anderen, die das, was Sie uns hier erklärt haben, sicher mit Interesse lesen werden.*

heit durch eine Nonsense-(Unsinn)-Mutation im Dystrophin-Gen verursacht. Diese Art einer Punktmutation ist

eine Veränderung einer einzelnen Base in der DNA, die ein vorzeitiges Stoppcodon in der Dystrophin-mRNA verursacht, das zum Abbruch der Proteinsynthese führt, bevor das neue Dystrophin aus seinen Aminosäuren fertig zusammengesetzt ist. Das unfertige Dystrophin ist zu kurz für eine normale Funktion, es wird zerstört, und Duchenne-Muskeldystrophie entwickelt sich.

Die Firma *PTC Therapeutics Inc.* in South Plainfield, New Jersey, hat unter der Leitung von Dr. **Langdon Miller** das Medikament PTC124 entwickelt, das es dem Proteinsynthetisierenden System in der Zelle ermöglicht, durch ein vorzeitiges Stoppcodon *hindurchzulesen*, so daß ein Protein normaler Länge entstehen kann. Diese Art der Behandlung ist weder eine Gentherapie noch Exon-Skiping. Um zu entscheiden, ob ein Junge mit Duchenne-Muskeldystrophie mit PTC124 behandelt werden kann, muß durch eine genetische Analyse bewiesen sein, daß er ein vorzeitiges Stoppcodon - TGA, TAG oder TAA - in einer der Exons seiner Dystrophin-mRNA hat.

Eine ausführliche Veröffentlichung über dieses neue Medikament einschließlich seiner molekularen Struktur ist im Mai 2007 mit einem Kommentar in der Zeitschrift *Nature* erschienen.

PTC124 ist ein weißes kristallines Pulver, das, in Wasser oder Milch aufgerührt, einfach geschluckt werden kann. PTC124 wurde als eine der aktivsten Substanzen in einem automatischen Suchprogramm unter etwa 800.000 Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht entdeckt, die auf ihre Durchlese-Fähigkeit geprüft wurden. Sie wurde dann chemisch optimiert und im Laboratorium intensiv getestet. In vorklinischen Experimenten konnte in Muskelzellkulturen Dystrophin produziert werden. Mit *mdx*-Mäusen, die ein vorzeitiges Stoppcodon im Exon 23 ihres Dystrophin-Gens haben, konnte gezeigt werden, daß durch PTC124 wieder normal-langes Dystrophin erschien, das zu einer verminderten Schädigung durch Muskelkontraktionen führte und zu einer Erniedrigung der Creatinkinase-(CK)-Aktivität im Blut. Das bedeutet, daß PTC124 den Muskeln helfen könnte, eine der genetischen Ursachen der Duchenne-Muskeldystrophie zu überwinden.

PTC124 liest nicht durch normale Stoppcodons hindurch, die eine andere strukturelle Umgebung haben, verglichen mit vorzeitigen Stoppcodons. Studien zur Toxizität in Mäusen, Ratten und Hunden mit hohen Dosen zeigten akzeptable Ergebnisse für eine Fortführung der weiteren Entwicklung dieses potentiellen Medikaments.

Eine klinische Phase-I-Studie mit PTC124 wurde mit 61 gesunden, 18 bis 30 Jahre alten erwachsenen Freiwilligen durchgeführt, die das Medikament dreimal pro Tag zwei Wochen lang erhielten. Mit dieser Behandlung konnte eine Konzentration im Serum von 2 bis 10 Mikrogramm/ml aufrechterhalten werden, von der bekannt war, daß sie in *mdx*-Mäusen wirksam ist. Eine Dosis von bis zu 100 mg/kg/Tag wurde von diesen gesunden Erwachsenen ohne Nebenwirkungen gut vertragen. Diese Dosis ist größer als die, die für Duchenne-Jungen vorgesehen ist.

Diese Ergebnisse erlaubten den Beginn einer klinischen Phase-IIa-Studie, die zwischen Dezember 2005 und Mai 2007 durchgeführt wurde, und an der 38 Duchenne-Jungen im Alter von 5 bis 17 Jahre teilnahmen. Sie waren eine repräsentative Gruppe von Patienten: 33 konnten noch gehen, 29 erhielten Steroide, 26 hatten UGA, 6 UAG und 6 UAA als vorzeitige Stoppcodons in den Exons 6 bis 70.

Mit der Studie sollte noch keine therapeutische Wirkung erzielt werden. Sechs Jungen erhielten 16 mg/kg/Tag PTC124, 20 Jungen 40 mg/kg/Tag und 12 Jungen 80 mg/kg/Tag aufgeteilt in drei Portionen pro Tag. Die Patienten wurden bis zu 21 Tage vor der Behandlung klinisch überwacht und getestet, erhielten dann das Medikament an 28 Tagen, und wurden schließlich noch einmal 28 Tage klinisch untersucht und getestet. Muskelgewebe wurde in Biopsien vor und nach der Behandlung vom *Extensor-digitorum-brevis*-(EDB)-Fußmuskel entnommen und auf neues Dystrophin normaler Länge getestet.

Vor der Behandlung war Muskelgewebe von den ersten Biopsien im Laboratorium mit PTC124 behandelt worden. Die von der Dosis abhängige Produktion von normallangem Dystrophin konnte im Muskelgewebe von allen Jungen nachgewiesen werden.

Bei den Analysen des Muskelgewebes aus den Biopsien nach der Behandlung wurde in 19 der 38 Jungen neues Dystrophin in kleinen Mengen gefunden. Warum es nicht in allen Jungen und nicht in größeren Mengen gefunden wurde, könnte daran gelegen haben, daß die Behandlung nicht genügend lange erfolgte und daß der EDB-Muskel möglicherweise nicht der beste Muskel für die Analyse war, weil seine Degeneration und Regeneration sehr langsam verläuft.

Jedoch alle Jungen zeigten eine Erniedrigung ihrer hohen CK-Werte während der Behandlung. Sie erhöhten sich nach der Behandlung wieder, wie es bei einem Medikament erwartet war, das dauernd genommen werden muß.

Einige Eltern und Lehrer bemerkten zwei bis vier Wochen nach der ziemlich kurzen Behandlung, daß die Jungen aktiver waren, größere Ausdauer hatten, und weniger müde waren als vor der Behandlung.

Obleich diese anekdotischen Beobachtungen mit Vorsicht betrachtet werden müssen, deutet der zeitliche Verlauf dieser symptomatischen Veränderungen auf eine medikamentöse Wirkung hin. Einige milde bis mäßige negative Effekte wurden auch beobachtet, sie waren aber nicht eindeutig von PTC124 verursacht worden und klinisch belanglos.

Um die Vor- und Nachteile von PTC124 über einen längeren Zeitraum zu bestimmen, ist jetzt mit einer randomisierten und kontrollierten klinischen Langzeit-Phase-IIb Studie (mit einer Doppelblindstudie) begonnen worden. An dieser Studie werden 165 Patienten teilnehmen, die mindestens 5 Jahre alt sind und noch 75 Meter oder mehr laufen können. Jungen, die bereits Steroide bekommen, können sie weiterhin nehmen. Die Teilnehmer werden randomisiert (nach dem Zufall) einer von drei Studiengruppen zugeteilt: entweder bekommen sie eine hohe oder eine niedrige PTC124-Dosis oder ein Placebo. Die Behandlung wird 48 Wochen dauern. Gemessen wird während der Behandlung vor allem die Entfernung, für die die Jungen sechs Minuten brauchen („primary outcome measurement“), und mit der gleichen Messung vor der Behandlung verglichen. Zusätzlich werden 10 weitere Messungen („secondary outcome measurements“) vorgenommen. Nach der Studie werden alle Patienten, auch diejenigen, die Placebo bekommen hatten, an einer Langzeit-Therapie mit der hohen PTC124-Dosis teilnehmen können.

Für diese Studie ist ein internationales Komitee gegründet worden, das die Zusammenarbeit vieler klinischer

Zentren in Europa, Australien, Israel, Kanada und den Vereinigten Staaten organisieren und beaufsichtigen wird. Die Professoren **Kate Bushby** und **Thomas Voit** sind die europäischen Experten in dem Komitee. Die Studie wird in den USA bereits durchgeführt, in den anderen Ländern wird sie vorbereitet. Falls diese umfangreiche Phase-IIb-Studie gute therapeutische Wirkungen zeigt, wird die Zulassung zur Vermarktung von den Behörden FDA in den USA und EMEA in Europa beantragt werden.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations (PTC124 therapiert genetische Krankheiten, die von Unsinn-Mutationen verursacht werden). *Nature* 2007; 447; 87-91. Schmitz A, Famulok M. Ignore the nonsense (Kümmere Dich nicht um den Unsinn!). *Nature* 2007; 447; 42-3.

**Projekt Katalyse** ist ein Programm der Firma *PTC Therapeutics* zur Identifizierung und Entwicklung von kleinmolekularen chemischen Substanzen als mögliche Medikamente zur Therapie der Duchenne-Muskeldystrophie.

Unter der Leitung von Dr. **Ellen Welch** wurde das Projekt im Mai 2004 gestartet mit dem Ziel, unter mehreren Hunderttausend Substanzen mit automatischen Test-

#### **PTC Therapeutics, Inc.**

100 Corporate Court  
South Plainfield, NJ 07080, USA  
Tel. \*1-908-222-7000  
Email: [patientinfo@ptcbio.com](mailto:patientinfo@ptcbio.com)  
Internet: [www.ptcbio.com](http://www.ptcbio.com)

Ich danke dem *European Neuromuscular Network TREAT-NMD* für die Übernahme der Kosten, die durch meinen Besuch bei PTC Therapeutics in New Jersey, entstanden sind. Der Dank geht auch an das amerikanische Parent Project Muscular Dystrophy, für die Einladung zur Teilnahme an der Jahrestagung in Philadelphia, 16. bis 20. Juli 2008. Beiden Organisationen danke ich auch für die Beteiligung an den Kosten für das Schreiben und Bearbeiten dieses Interview sowie meiner Duchenne-Forschungsberichte.

#### **TREAT-NMD Neuromuscular Network**

Institute of Human Genetics, Newcastle University  
Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK  
Email: [info@treat-nmd.eu](mailto:info@treat-nmd.eu)  
Internet: [www.treat-nmd.eu](http://www.treat-nmd.eu)

methoden diejenigen zu finden, die die Produktion, die *Expression*, von vier Proteinen in Muskelzellen herauf- oder herunterregulieren, die die Muskelstruktur in Duchenne-Patienten erhalten oder verbessern können.

Das Herunterregulieren von *Myostatin* und das Hochregulieren des muskelspezifischen *insulinartigen Wachstumsfaktors* (IGF-1) würde das Muskelwachstum und die Regeneration fördern. Das Hochregulieren von *Utrophin* und *Alpha7-Integrin* würde die Muskelmembranen stabilisieren und dadurch die Muskelfunktion verbessern.

Die automatischen Methoden zum Auffinden dieser potentiellen Duchenne-Medikamente verwenden ein neu entwickeltes Testverfahren, bei dem die Lichtintensität eines Reporter-Proteins gemessen wird, des Enzyms Luziferase aus Glühwürmchen. Eine kleine Zahl von Substanzen mit wenigstens einigen der erwünschten Eigenschaften sind gefunden worden und wurden auch bereits im Laboratorium chemisch optimiert. Außerdem wurde mit Arbeiten an einem anderen Protein begonnen, der *sarkoplasmatischen Reticulum-Ca-ATPase* (SERCA2a), die helfen könnten, die kontraktile Funktionen des Herzens zu erhalten.

Alle diese sehr aussichtsreichen potentiellen Medikamente werden weiter optimiert, so daß klinische Phase-I-Studien in naher Zukunft beginnen könnten.

#### **Dr. rer. nat. Günter Scheuerbrandt**

Im Talgrund 2  
79874 Breitnau, Deutschland  
Email: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de)  
Internet: [www.duchenne-information.eu](http://www.duchenne-information.eu)

#### **Parent Project Muscular Dystrophy**

1012 North University Blvd.  
Middletown, Ohio 45042, USA  
Tel.: 001-513-424-0696,  
Internet: [www.parentprojectmd.org](http://www.parentprojectmd.org)