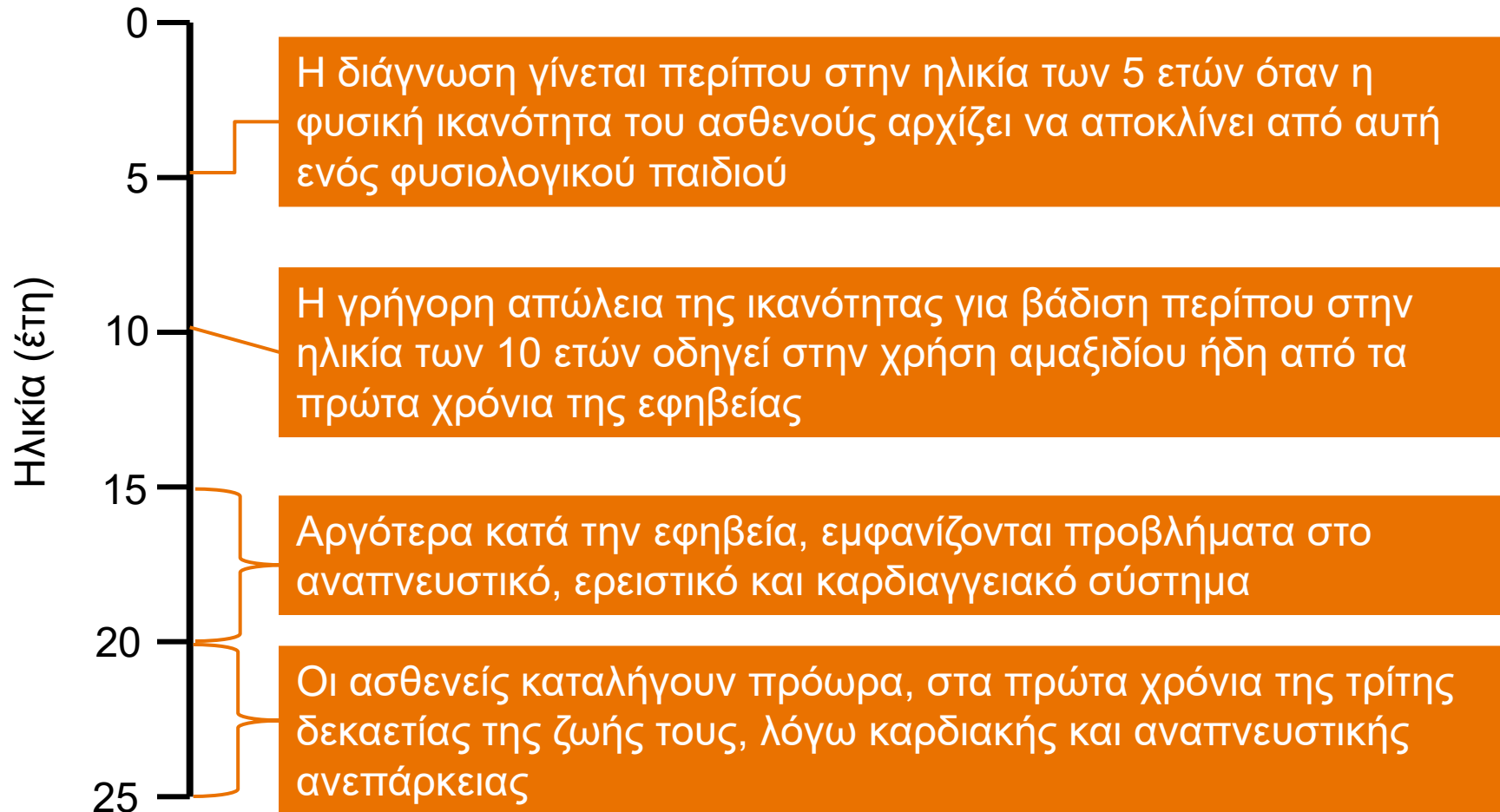


# Νεότερες εξελίξεις στην αντιμετώπιση της μουϊκής δυστροφίας στα παιδιά

Ε. Παύλου

Επικ. Καθηγητής ΑΠΘ

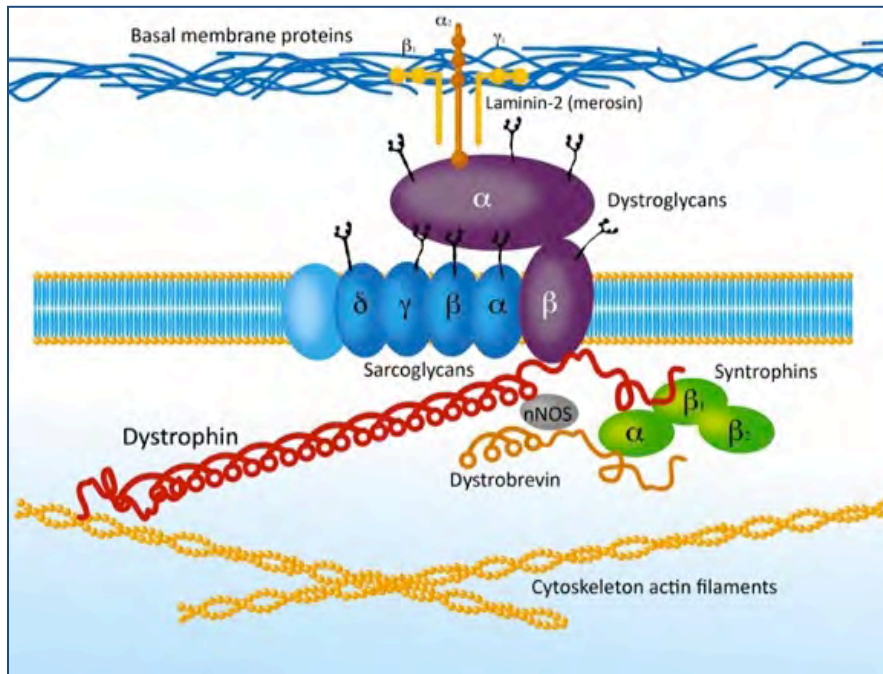
# Η DMD επιδρά προοδευτικά σε πολλά οργανικά συστήματα



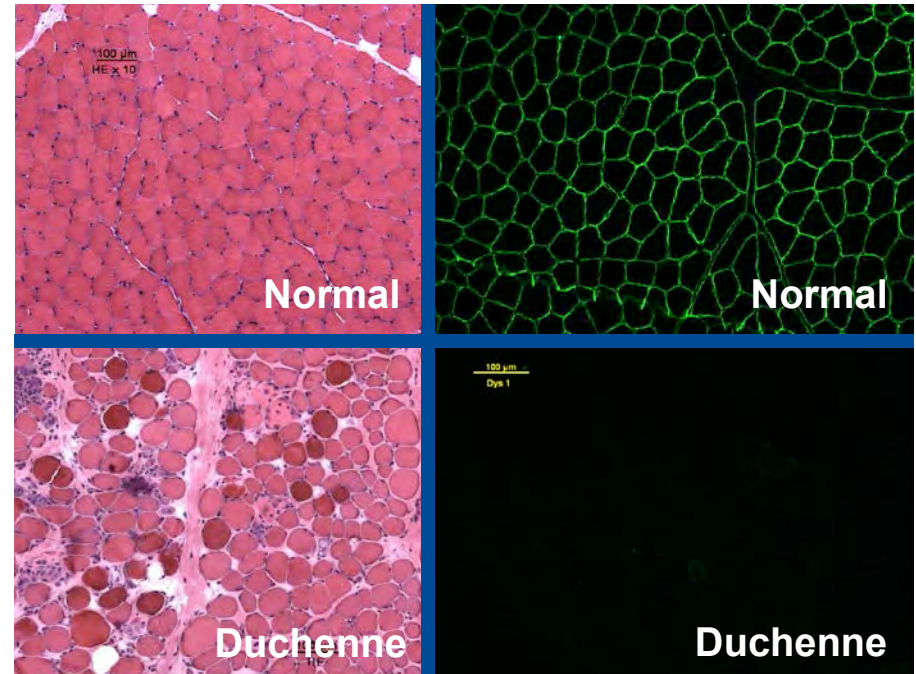
# Η έλλειψη δυστροφίνης στην DMD οδηγεί σε εκφυλισμό των μυών και αντικατάσταση από συνδετικό ιστό

- Η δυστροφίνη διατηρεί την ακεραιότητα των μυϊκών ινών
- Η DMD οφείλεται σε μια μετάλλαξη του γονιδίου της δυστροφίνης, που οδηγεί στην απώλεια της λειτουργικής δυστροφίνης<sup>1</sup>

Δομή δυστροφίνης και αλληλεπιδράσεις  
Reproduced from Wells DJ *et al.*<sup>2</sup> with permission



Ανοσο-ιστοχημική απεικόνιση της έκφρασης της δυστροφίνης σε μυϊκά κύτταρα από υγιείς εθελοντές και ασθενείς με DMD  
[Figure permission to be sought]



# Γενετική

| Η DMD προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της δυστροφίνης                                  | Συχνότητα μετάλλαξης σε ασθενείς με DMD |
|--|---|
| Διαγραφή ενός ή περισσότερων εξονίων <sup>1</sup>  | ~65%                                    |
| Διπλασιασμός ενός ή περισσότερων εξονίων <sup>1</sup>  | 7–10%                                   |
| Άλλες μεταλλάξεις π.χ προσθήκες ή μεταλλάξεις με λάθος νόημα (insertion or missense mutations) | 15–30%                                  |
| <b>Σημειακές Μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations)<sup>2</sup></b>                      | <b>10–15%</b>                           |

# Θεραπευτική Προσέγγιση



# Φαρμακευτική Παρέμβαση

Η κορτιζονοθεραπεία αποτελεί τη μοναδική διαθέσιμη φαρμακευτική αγωγή που:

- επιβραδύνει την επέλευση της μυϊκής αδυναμίας
- σταθεροποιεί την αναπνευστική λειτουργία
- μειώνει τον κίνδυνο σκολίωσης
- ίσως σταθεροποιεί την καρδιακή λειτουργία

*Bushby K, et al Lancet Neurol 2010;9:77-93*

# Φαρμακευτική Παρέμβαση

- Πρεδνιζόνη (0.75mg/kg/ημερησίως)  
*(Griggs RC et al 1991)*
- Καθημερινή χορήγηση πιο αποτελεσματική από την μέρα παρά μέρα χορήγηση  
*(Fenichel GM et al 1991)*
- Deflazacort (0.9mg/kg/ημερησίως): παρόμοια αποτελεσματικότητα με ίσως ασφαλέστερο προφίλ  
*(Biggar WD et al 2004)*

# Φαρμακευτική Παρέμβαση

- Έναρξη αγωγής:
  - αναγνώριση των 3 σταδίων της νόσου:
    - α) κινητικής προόδου (έως 4-6 ετών)
    - β) στασιμότητας – plateau (μεταξύ 4-8 ετών)
    - γ) ταχείας επιδείνωσης
- Σε ασθενείς που έχουν χάσει τη δυνατότητα ανεξάρτητης βάδισης:
  - σχετική ένδειξη προς σταθεροποίηση της αναπνευστικής λειτουργίας
  - μεγαλύτερος κίνδυνος παρενεργειών



# Φαρμακευτική Παρέμβαση

**Κρεατίνη (Escolar et al 2005)**

**Συνένζυμο Q10**

**Καρνιτίνη**

**Αμινοξέα (γλουταμίνη, αργινίνη)**

**Αντιοξειδωτικά (βιτ. Ε, ιχθυέλαια, τσάϊ)**

**δε  
συστήνονται**

*Bushby K, et al Lancet Neurol 2010;9:77-93*

## Special Article:

# Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy

- *Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology*
- *David Gloss, MD, MPH&TM, Richard T. Moxley III, MD, Stephen Ashwal, MD and Maryam Oskoui, MD*
- *Neurology February 2, 2016 vol. 86 no. 5 465-472*

# ***Do corticosteroids have an effect on survival?***

- 4 Class III μελέτες:
  - 1<sup>η</sup>: δεν ανέδειξε σημαντική διαφορά
  - 2<sup>η</sup>: 5% ασθενών που έλαβαν deflazacort απεβίωσαν τη 2<sup>η</sup> δεκαετία vs 35% των ασθενών που δεν έλαβαν αγωγή
  - 3<sup>η</sup>: θνησιμότητα υψηλότερη (21%) στην ομάδα ασθενών που δεν έλαβε αγωγή σε σχέση με ασθενείς που έλαβαν deflazacort-treated group (3%) σε διάστημα παρακολούθησης 15 ετών
  - 4<sup>η</sup>: θνησιμότητα 43% σε ασθενείς που δεν έλαβαν αγωγή, 11% στην ομάδα ασθενών υπό deflazacort ή prednisone-treated group μετά follow-up 11 ετών
- **Συμπεράσματα:**
- Το Deflazacort προφανώς αυξάνει την επιβίωση όταν λαμβάνεται για 5–15 χρόνια (3 Class III studies).

## ***Do corticosteroids decrease the need for scoliosis surgery?***

- 10 Class III μελέτες
- Συμπέρασματα: Η κορτιζόνη πιθανόν επιβραδύνει την εμφάνιση της σκολίωσης και μειώνει την ανάγκη χειρουργείου στην ηλικία των 18 ετών

## ***Do corticosteroids have an effect on pulmonary function?***

Η πρεδνιζολόνη και το deflazacort προφανώς βελτιώνουν την αναπνευστική λειτουργία (2 Class II μελέτες και αρκετές Class III μελέτες)

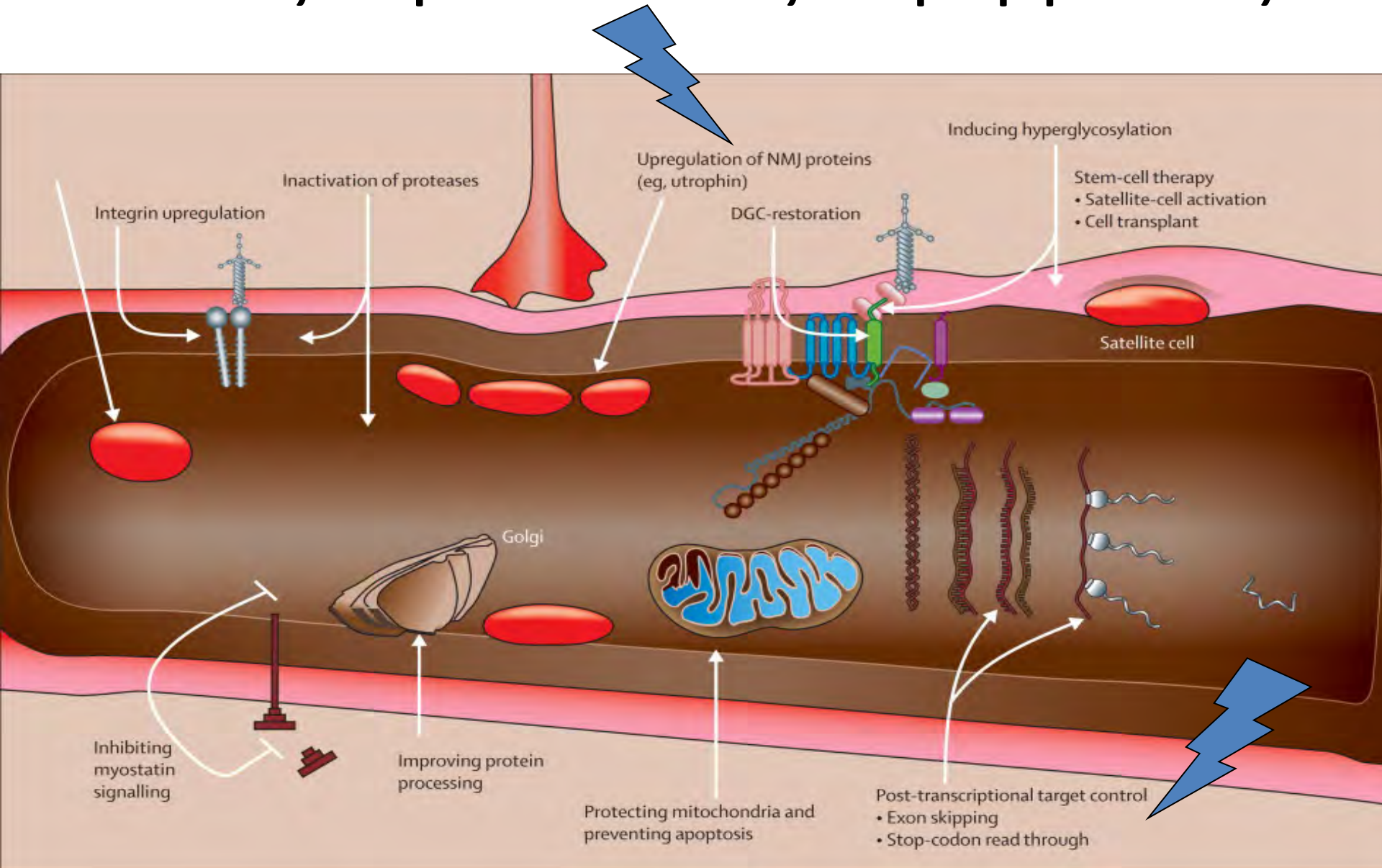
## ***Do corticosteroids have an effect on cardiac function?***

Τα κορτικοστεροειδή (deflazacort 0.9 mg/kg/d ή η prednisone 0.75 mg/kg/d) προφανώς καθυστερούν την εμφάνιση καρδιομυοπάθειας στους ασθενείς έως 18 ετών (αρκετές Class III μελέτες).

# PRACTICE RECOMMENDATIONS

- Prednisone 0.75 mg/kg/d has significant benefit in DMD management
- Prednisone 10 mg/kg/weekend is equally effective over a 12-month period, although long-term outcomes of this alternate regimen remain to be seen.
- The American College of Rheumatology Task Force osteoporosis guideline recommends calcium and vitamin D supplementation for patients taking corticosteroids (any dose with an anticipated duration of  $\geq 3$  months) in order to maintain a total calcium intake of 1,200 mg/d and vitamin D intake of 800 IU/d through dietary sources and supplementation.
- If a significant number of AEs develop, reducing the prednisone dose to 0.3 mg/kg/d may reduce the AE burden, albeit with less efficacy.
- The AE profiles of deflazacort and prednisone vary slightly. Weight gain and cushingoid appearance may occur more frequently with prednisone than deflazacort, but cataracts are more frequently reported with deflazacort.

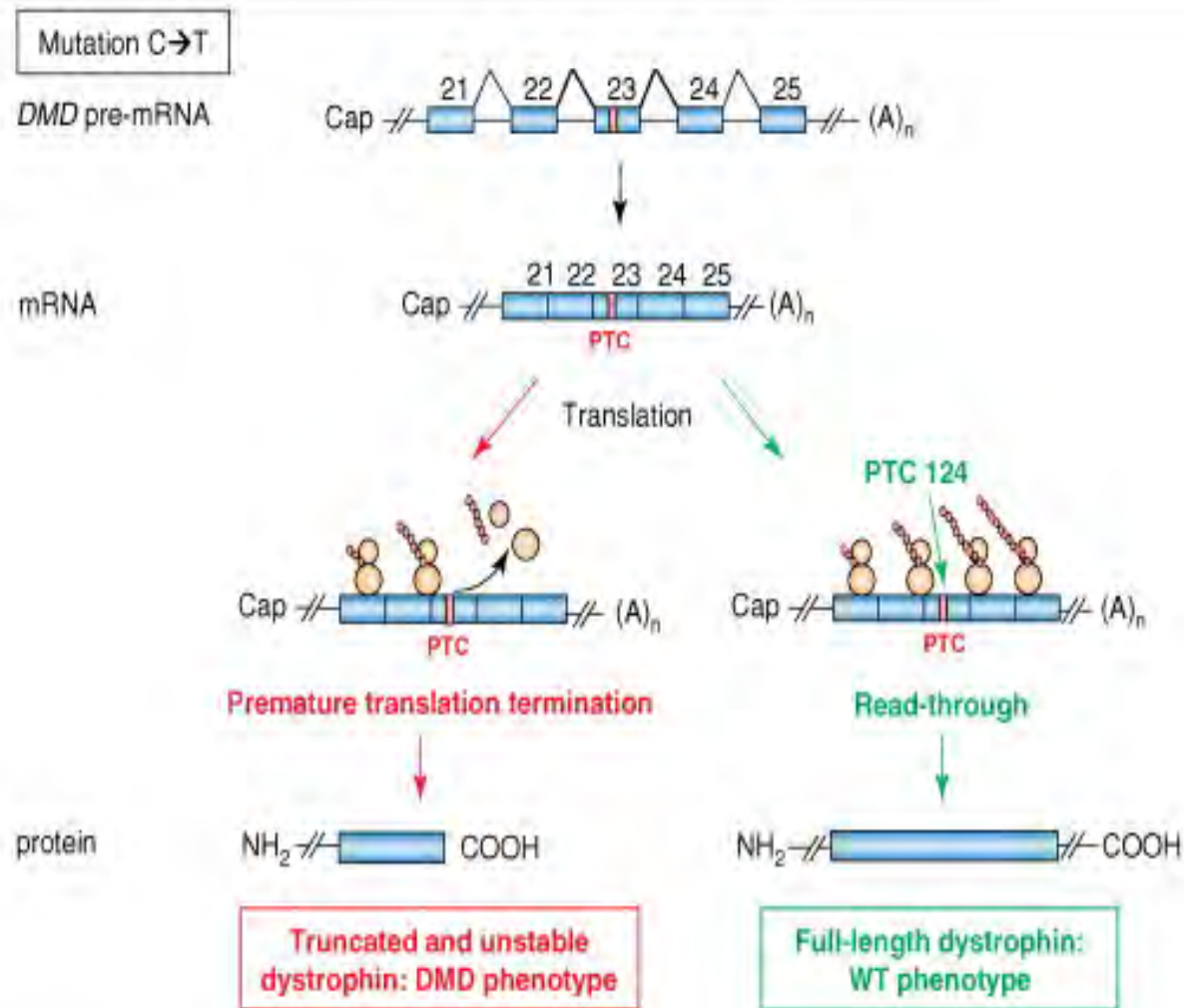
# Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις



# Experimental treatments for Duchenne muscular dystrophy

| Cell membrane repair        | Exon skipping         |
|-----------------------------|-----------------------|
| Gene repair                 | Gene transfer         |
| Muscle or stem cell therapy | Myostatin inhibition  |
| Stop condon read through    | Utrophin upregulation |

# Stop codon read through therapies: Αμινογλυκοσίδες – PTC 124(Ataluren)



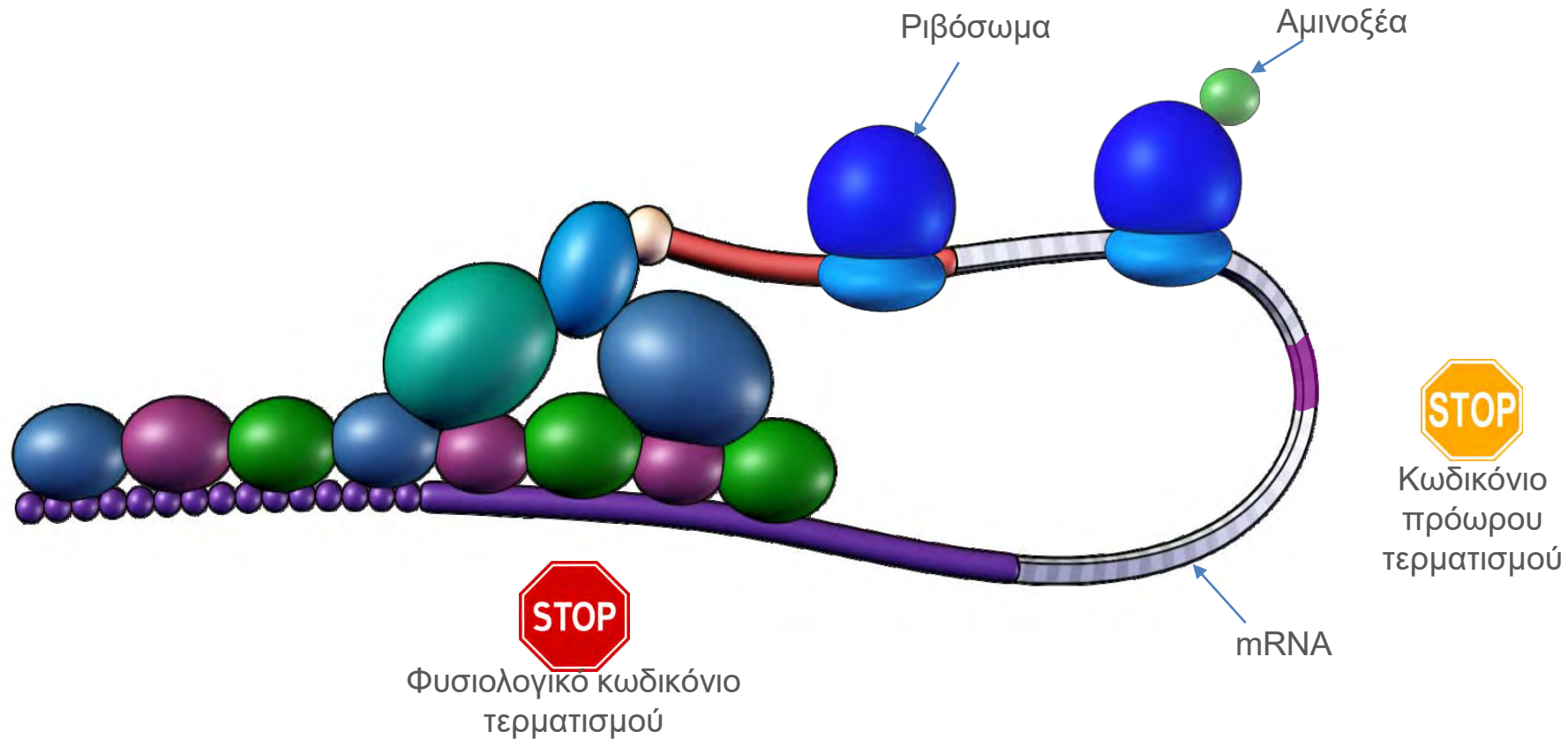


# Translarna

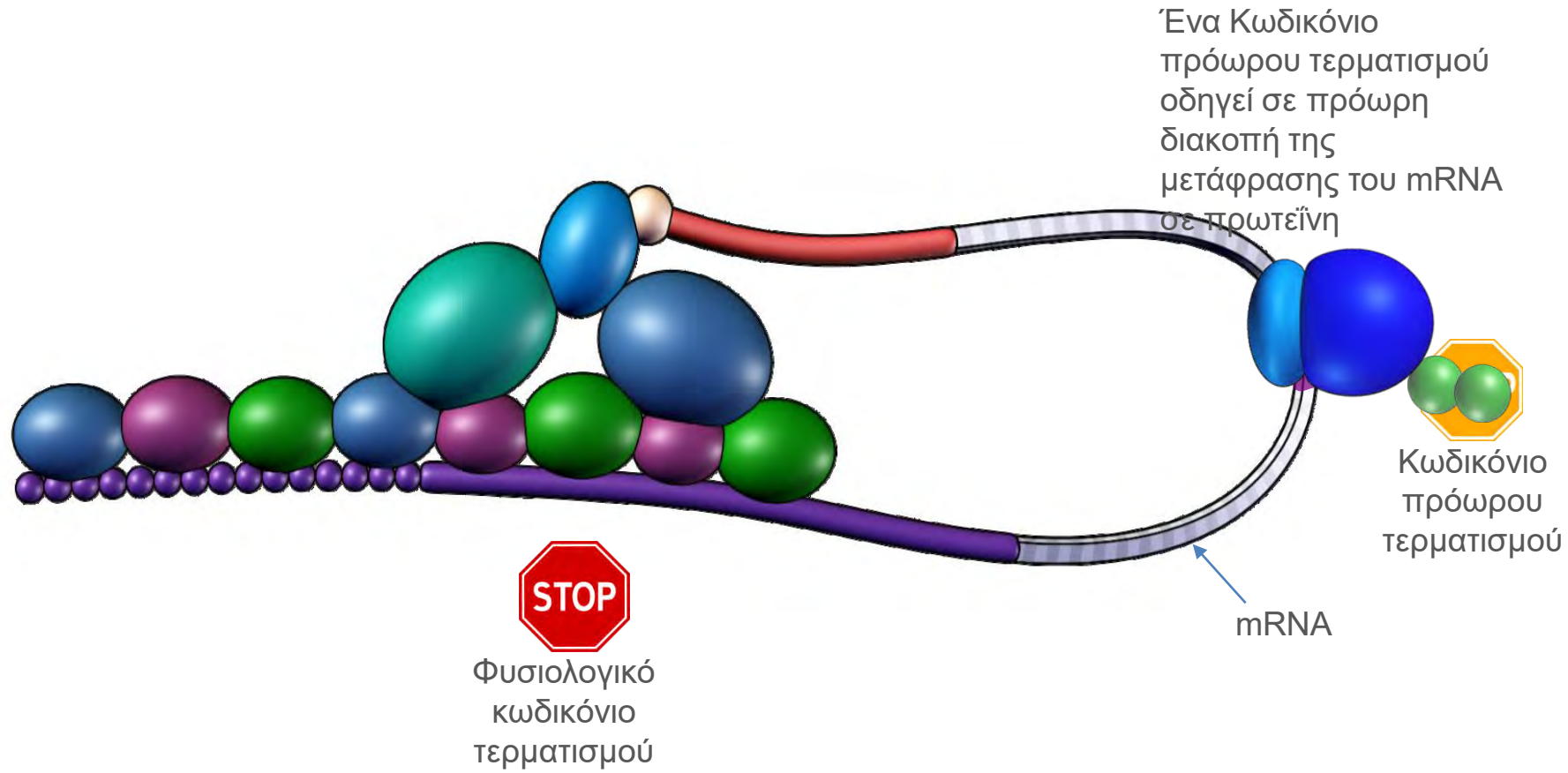
---

- Παράγων που βοηθά στο να συνεχιστεί η μετάφραση του mRNA σε σημεία που υπάρχει nonsense mutation
- Συνδέεται με το ριβόσωμα και έτσι συνεχίζεται η μετάφραση στα σημεία που υπάρχουν κωδικόνια που φέρουν μετάλλαξη που οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό και έτσι παράγεται λειτουργική πρωτεΐνη (δυστροφίνη)
- Καταστέλλει την έκφραση όλων των nonsense mutations σε όλα τα κωδικόνια (UAG, UGA and UAA) διαμέσου όλων των εξωνίων
- Έχει υψηλή εξειδίκευση σε nonsense μεταλλάξεις, χωρίς να επηρεάζει την έκφραση κωδικονίων που φέρουν φυσιολογικές αλληλουχίες τερματισμού

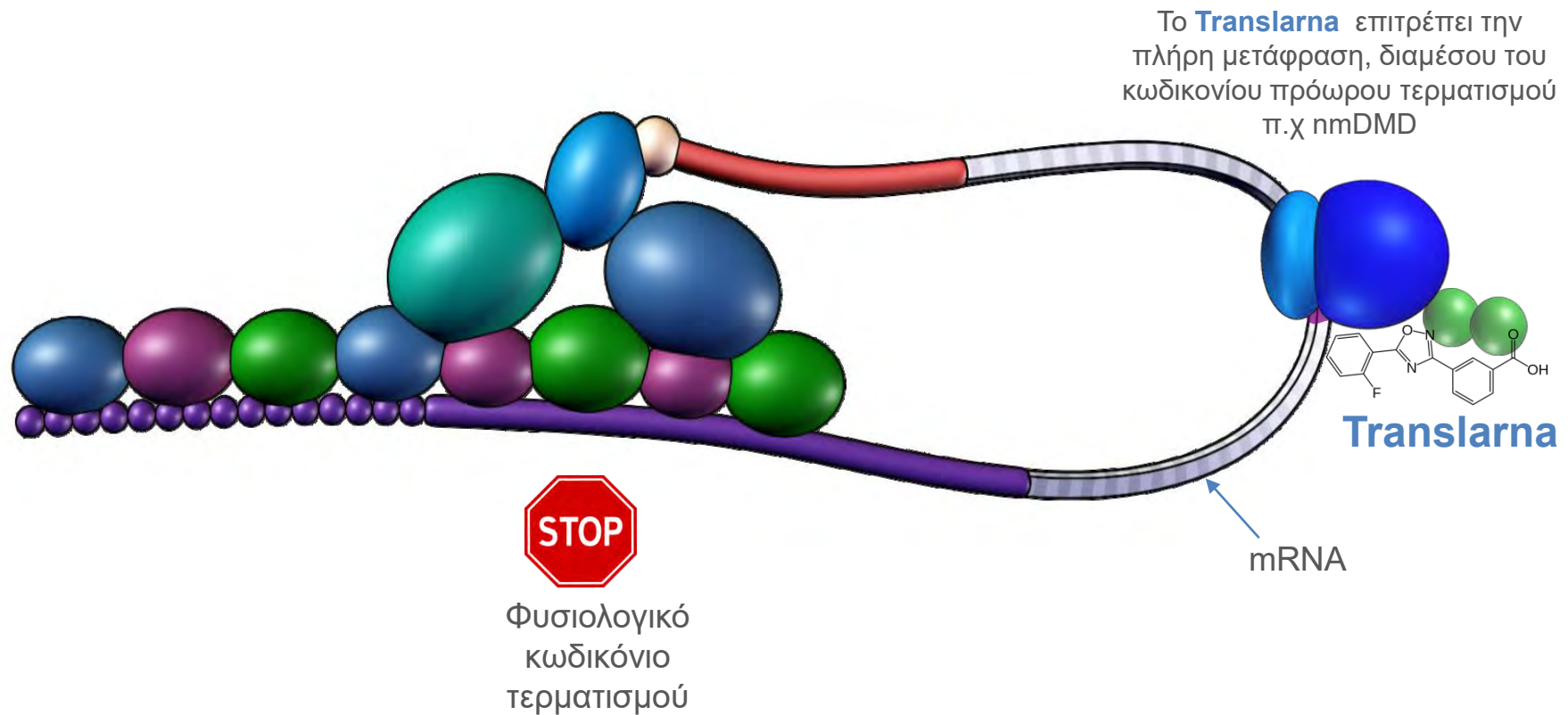
**Το Translarna βοηθά στο να συνεχιστεί η μετάφραση του mRNA στα σημεία όπου υπάρχουν κωδικόνια πρόωρου τερματισμού έτσι ώστε να παραχθεί λειτουργική δυστροφήνη**



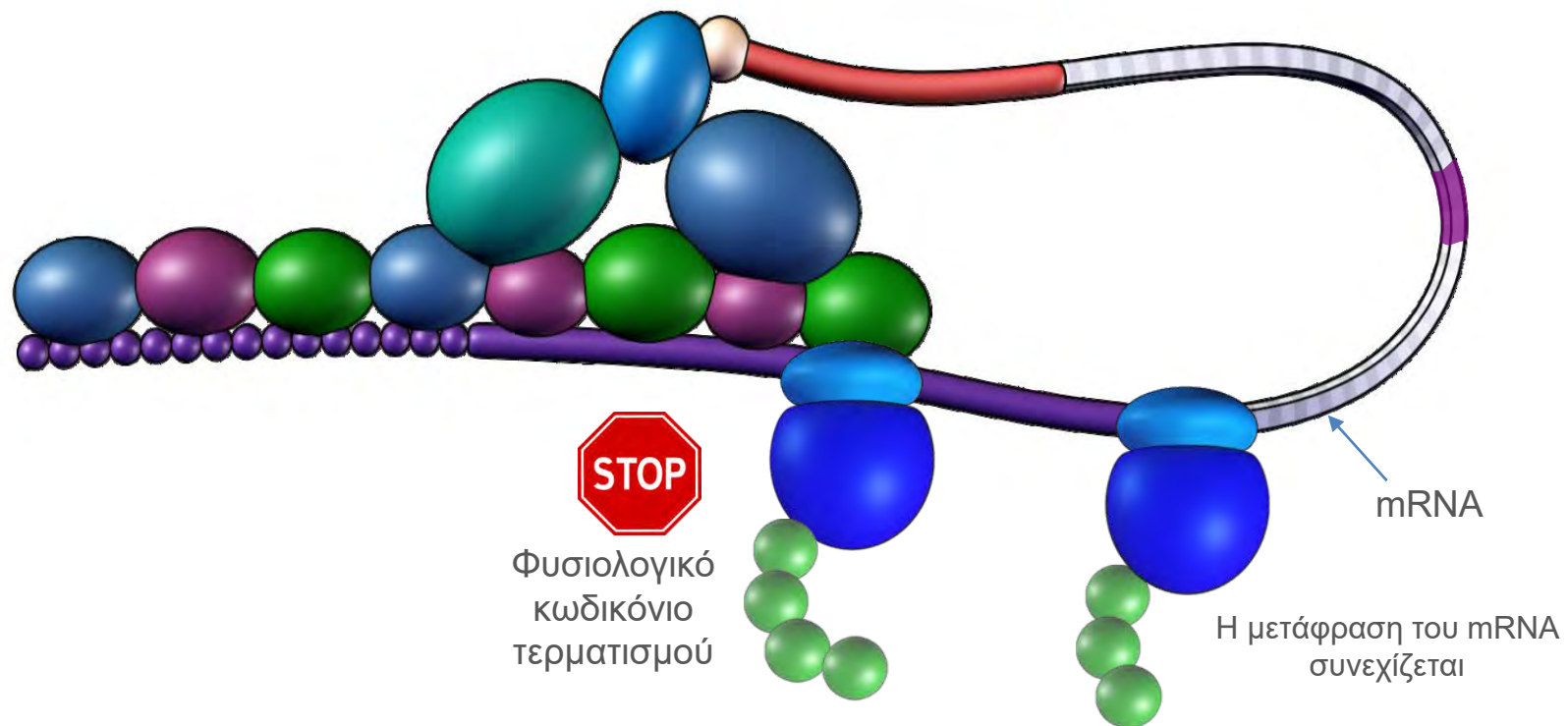
# Το Translarna βοηθά στο να συνεχιστεί η μετάφραση του mRNA στα σημεία όπου υπάρχουν κωδικόνια πρόωρου τερματισμού έτσι ώστε να παραχθεί λειτουργική δυστροφίνη



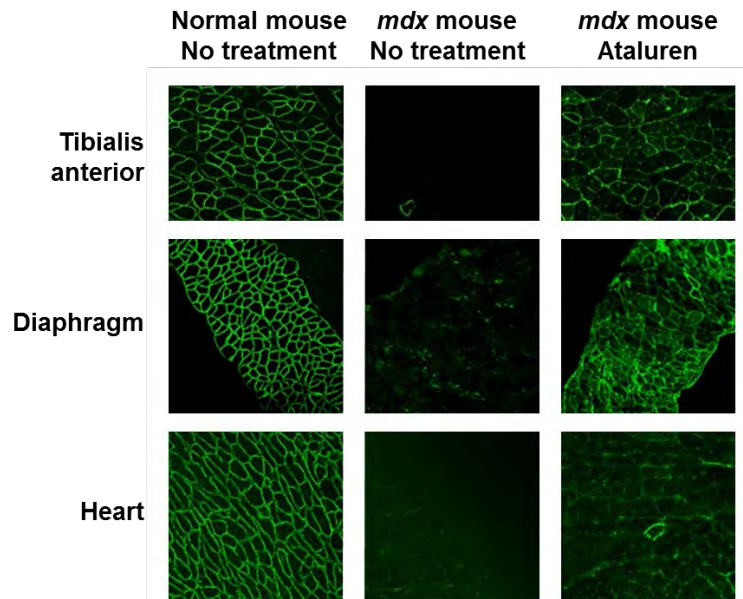
# Το Translarna βοηθά στο να συνεχιστεί η μετάφραση του mRNA στα σημεία όπου υπάρχουν κωδικόνια πρόωρου τερματισμού έτσι ώστε να παραχθεί λειτουργική δυστροφίνη



**Το Translarna βοηθά στο να συνεχιστεί η μετάφραση του mRNA στα σημεία όπου υπάρχουν κωδικόνια πρόωρου τερματισμού έτσι ώστε να παραχθεί λειτουργική δυστροφίνη**

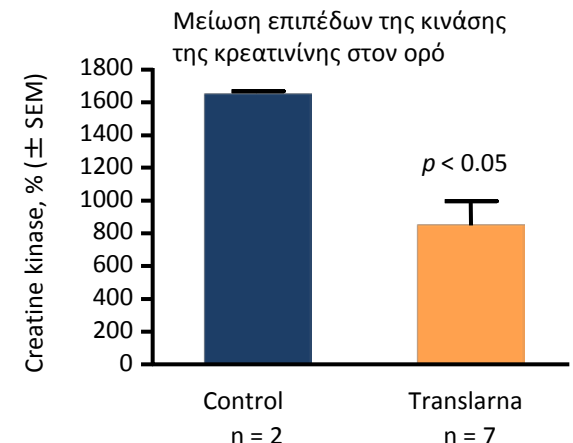
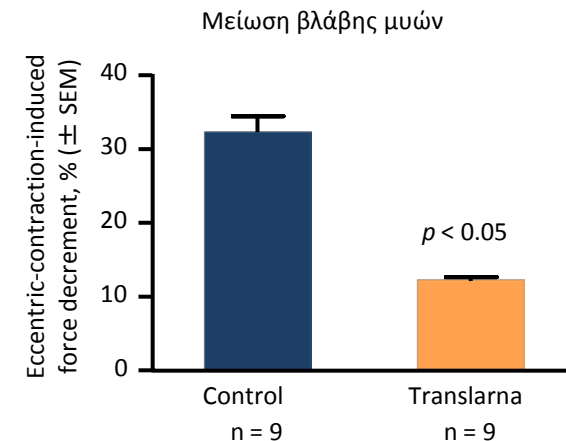


# Translarna: Προ-κλινικές μελέτες σε mdx ποντίκια



- Το Translarna επανέφερε μερικά την δυστροφίνη σε διαφορετικές ομάδες μυών, συμπεριλαμβανομένων του διαφράγματος και της καρδιάς και βελτίωσε την λειτουργία των μυών<sup>1,2</sup>
- Το Translarna έχει βρεθεί επίσης ότι ενισχύει την έκφραση της δυστροφίνης σε άλλα προ-κλινικά μοντέλα σε nmDMD<sup>3,4</sup>

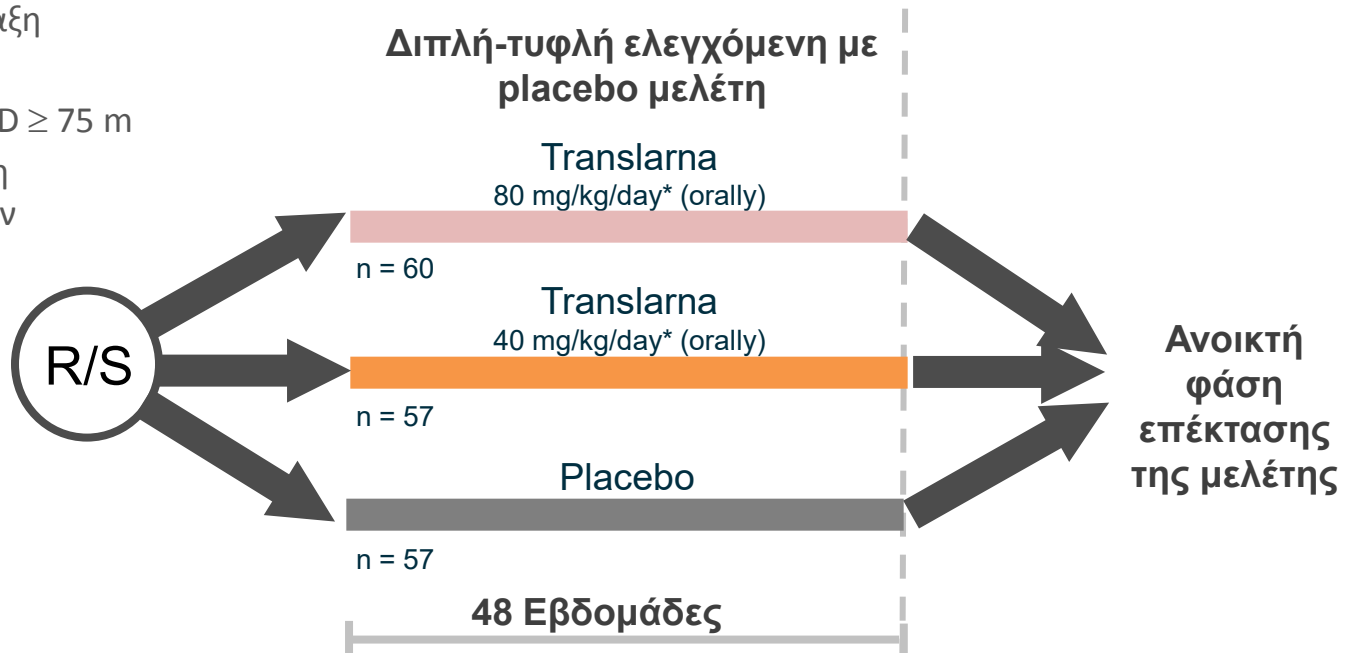
1. Welch EM *et al.* *Nature* 2007;447:87–91; 2. Kayali R *et al.* *Hum Mol Genet* 2012;21:4007–20;  
3. Li M *et al.* *FASEB J* 2014;28:1593–9; 4. Peltz SW *et al.* *Annu Rev Med* 2013;64:407–25



# Translarna: Μελέτη φάσης 2β σε περιπατητικούς ασθενείς με nmDMD – σχεδιασμός μελέτης

## Κριτήρια επιλογής ασθενών:

- Nonsense μετάλλαξη
- Άρρενες  $\geq 5$  years
- Βασική τιμή 6MWD  $\geq 75$  m
- Σταθερή χορήγηση κορτικοστεροειδών (αν λαμβάνουν)



## Τυχαιοποίηση & κατάταξη:

- Ηλικία
- Χορήγηση κορτικοστεροειδών
- Βασική τιμή 6MWD

## Μέτρηση πρωταρχικού σημείου έκβασης

- 6MWD

\*Χορηγούμενα σε 3 δόσεις/ημέρα

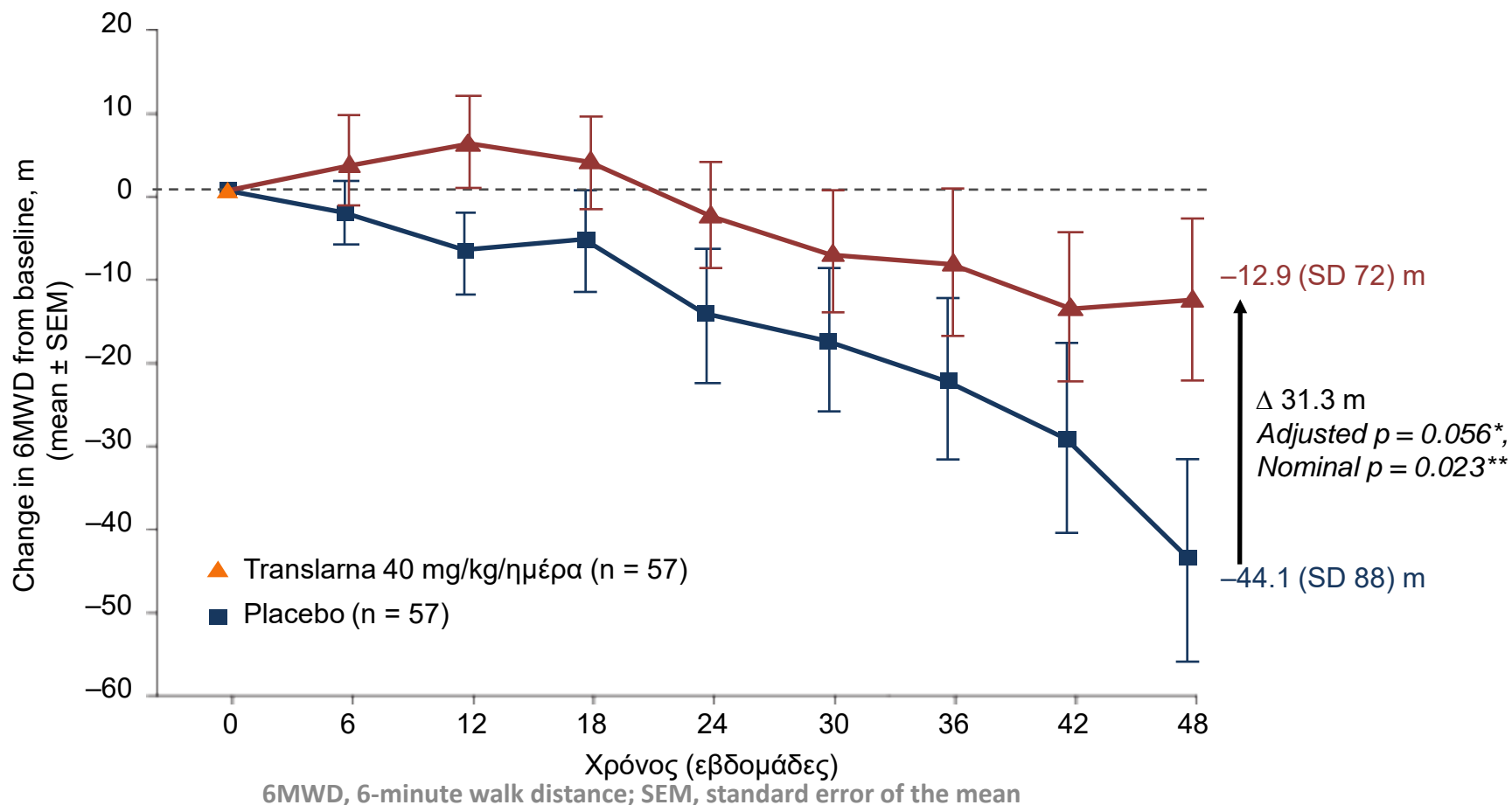
80 mg/kg/ημέρα = 20, 20, 40 mg/kg/ημέρα

40 mg/kg/ημέρα = 10, 10, 20 mg/kg/ημέρα

6MWD, απόσταση που περπατούν σε 6 λεπτά

Συνολικός αριθμός ασθενών: 174, 37 κέντρα παγκόσμια, 11 χώρες

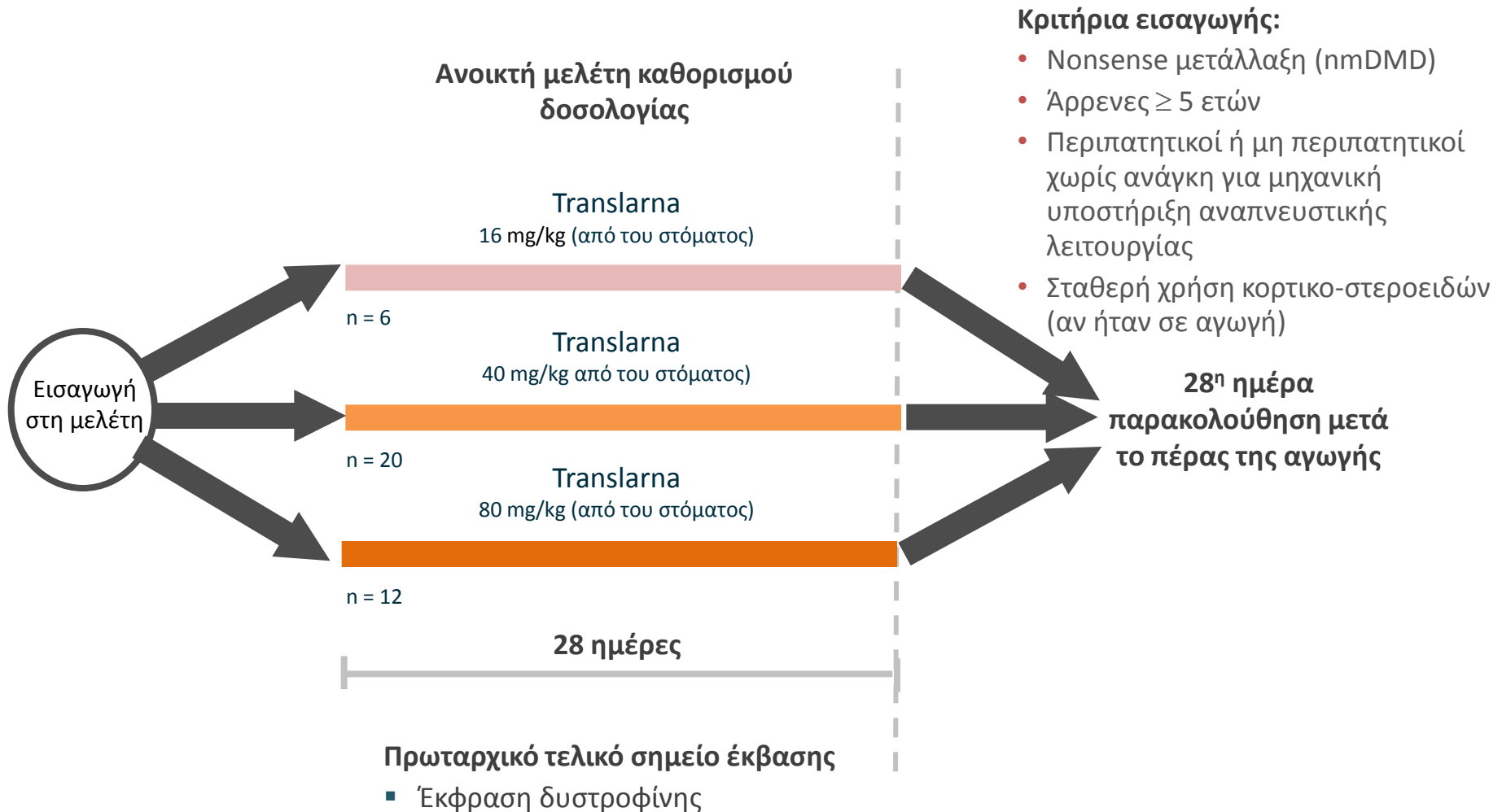
**Στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε Translarna 40 mg/kg/ημέρα παρατηρήθηκε μικρότερη μείωση στην ικανότητα βάρδισης στις 48 εβδομάδες χορήγησης σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν σε αγωγή με placebo<sup>1</sup>**



- **Adjusted p value from analysis of all data across 3 treatment arms with 80 mg/kg/day not different from placebo; corrected ITT population: \*\*Nominal p value for 2 arm study Translarna 40 mg/kg/day vs. placebo p = 0.023.**

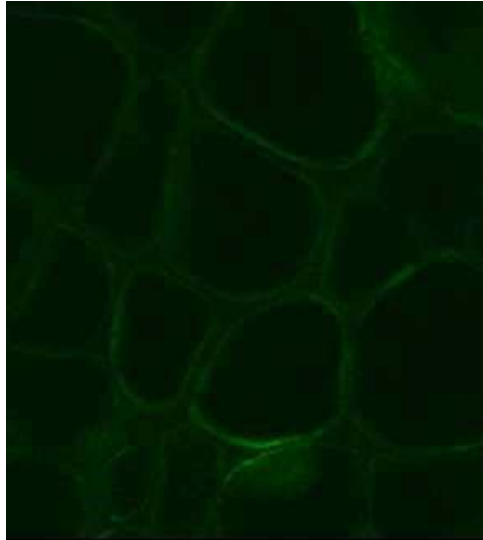


# Μελέτη φάσης 2α: Σχεδιασμός μελέτης

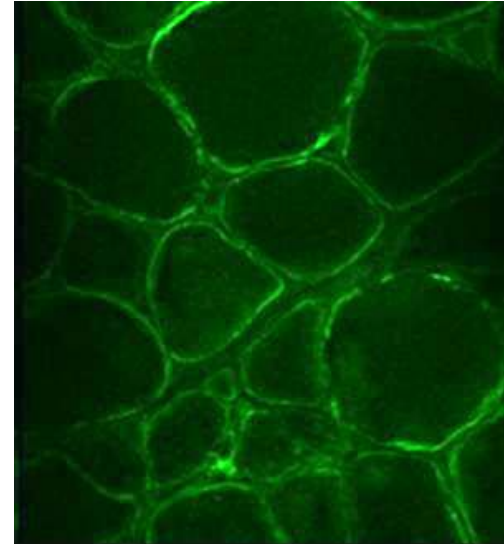


# Translarna: Αύξηση στην έκφραση της δυστροφίνης σε ασθενείς με nmDMD

Προ αγωγής



Μετά το πέρας της αγωγής (ημέρα 28)

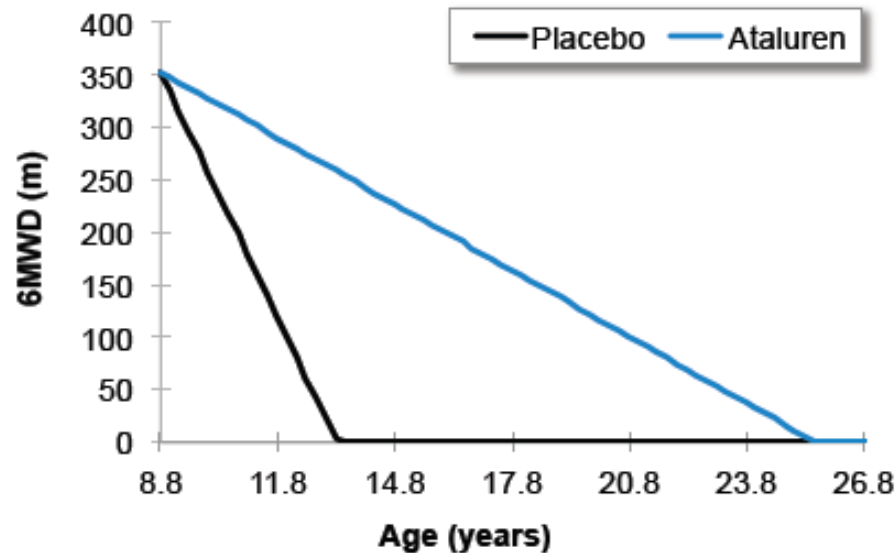


Immunohistochemistry of muscle cross-sections to visualize dystrophin expression in extensor digitorum brevis at baseline and after 28 days of treatment with Translarna 40 mg/kg/day

- Βελτίωση στην δυστροφίνη παρατηρήθηκε σε ~60% των ασθενών μετά από 28 ημέρες αγωγής με Translarna 16 mg/kg/ημέρα, 40 mg/kg/ημέρα ή 80 mg/kg/ημέρα\*
- Μέση μεταβολή της έκφρασης της δυστροφίνης 11% παρατηρήθηκε μετά από 28 ημέρες αγωγής με Translarna ( $p = 0.008$ , συζευγμένο t test)
- Δεν παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη συσχέτιση

\*Το 67% των ασθενών ήταν υπό αγωγή με 16 mg/kg/ημέρα (n = 6), το 55% των ασθενών με 40 mg/kg/ημέρα (n = 20) και το 67% των ασθενών με 80 mg/kg/ημέρα (n = 12). Αναπαραγωγή από Finkel RS *et al.* *PLoS One* 2013;8:e81302

## Υπολογισμός της παράτασης της περιπατητικότητας βάση του 6MWD- γραμμική υπόθεση



Στην γραμμική υπόθεση, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τις υποομάδες με βασική τιμή στο 6MWD μεταξύ 300-400m (Βέλτιστο εύρος τιμών)  
Η μέση ηλικία απώλειας της περιπατητικότητας για τους ασθενείς με Translarna αναμένεται να είναι στα 25.6 έτη, γεγονός που συνεπάγεται την καθυστέρηση απώλειας της περιπατητικότητας για 12.2 έτη, σε σχέση με τους ασθενείς που λάμβαναν Placebo

**Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που παρουσιάστηκαν σε ποσοστό >10%, ήταν παρόμοιες μεταξύ των ομάδων όπου χορηγήθηκε Translarna και placebo**

| Ανεπιθύμητη ενέργεια           | Placebo<br>n = 57 | Translarna<br>40 mg/kg/ημέρα<br>n = 57 | Translarna<br>80 mg/kg/ημέρα<br>n = 60 |
|--------------------------------|-------------------|--|--|
| Έμετος                         | 39                | 56                                     | 45                                     |
| Κεφαλαλγία                     | 25                | 39                                     | 25                                     |
| Πυρετός                        | 21                | 25                                     | 12                                     |
| Ρινοφαρυγγίτιδα                | 23                | 23                                     | 17                                     |
| Διάρροια                       | 25                | 19                                     | 28                                     |
| Πτώση                          | 12                | 19                                     | 10                                     |
| Βήχας                          | 19                | 16                                     | 22                                     |
| Άλγος άνω κοιλιακής χώρας      | 16                | 16                                     | 22                                     |
| Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού | 18                | 16                                     | 18                                     |
| Πόνος στην πλάτη               | 9                 | 16                                     | 10                                     |
| Ναυτία                         | 12                | 14                                     | 17                                     |
| Κοιλιακός πόνος                | 7                 | 12                                     | 17                                     |
| Πόνος στα άκρα                 | 11                | 12                                     | 13                                     |
| Πόνος κατά τη διαδικασία       | 12                | 11                                     | 13                                     |
| Γρίπη                          | 14                | 11                                     | 12                                     |

# Σε ποιους ασθενείς μπορεί να χορηγηθεί το Translarna

- Ασθενείς που πάσχουν από Μυική δυστροφία Duchenne και είναι φορείς nonsense μετάλλαξης στο γονίδιο της δυστροφίνης όπως αυτό προσδιορίζεται από γενετικό έλεγχο
- Νέο-διαγνωσθέντες και υπάρχοντες ασθενείς
- Ηλικίας 5 ετών και άνω
- Περιπατητικοί



# Γονιδιακή παρέμβαση

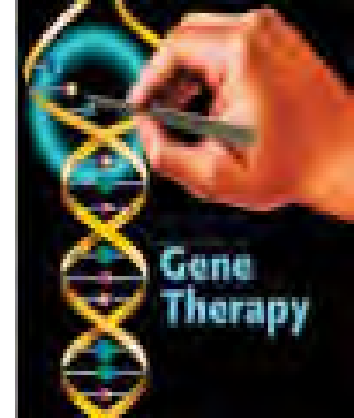
- Μέθοδοι:

## **Γονιδιακή μεταφορά με τη χρήση ικών φορέων**

- μεταφορά mini γονιδίου δυστροφίνης με AAV φορέα
- χορήγηση γυμνού πλασμιδιακού DNA

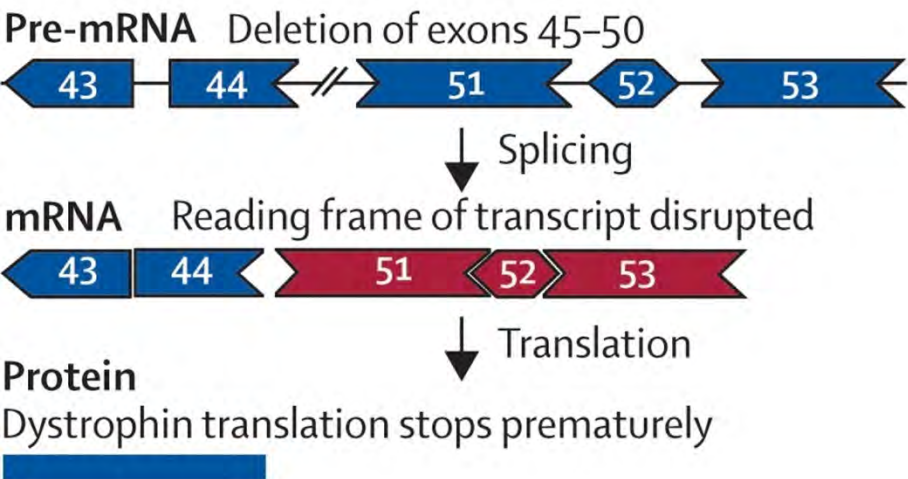
## **Γονιδιακή τροποποίηση μέσω RNA επιδιόρθωσης**

- exon skipping,
- spliceosome-mediated RNA trans-splicing-SMaRT

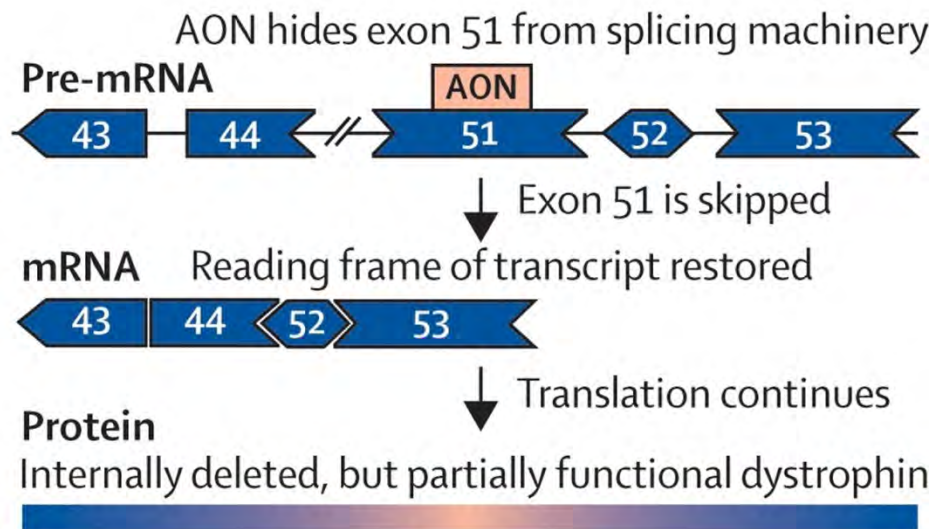


# Παράλλειψη εξωνίου (**exon skipping**) με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides – AON)

## Duchenne muscular dystrophy



## Exon skipping to reframe transcripts



Έλλειψη των εξωνίων 45-50 διακόπτουν το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου της Δυστροφίνης με αποτέλεσμα να διακόπτεται η μετάφραση της πρωτεΐνης

Η παρεμβολή του ολιγονουκλεοτιδίου οδηγεί σε διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης και στην παραγωγή τροποποιημένης αλλά εν μέρει δραστηκής πρωτεΐνης

# Drisapersen

- 2'-O-methyl φωσφορο-θειικο ολιγονουκλεοτίδιο που αλλάζει τον τερματισμό του RNA μεταγράφου της δυστροφίνης, απαλείφοντας το εξόνιο 51 από το ώριμο mRNA της δυστροφίνης
- Απευθύνεται στο 13% του πληθυσμού των ασθενών με DMD
- Έχουν ολοκληρωθεί μελέτες Φάσης III αλλά δεν κατάφερε να φτάσει το πρωτογενές τελικό σημείο.
- Σε μελέτη 48 εβδομάδων με καθημερινή υποδόρια χορήγηση σε 18 ασθενείς, με διακοπτόμενη χορήγηση 9 δόσεων σε διάστημα 6 εβδομάδων σε 17 ασθενείς εμφάνισε αύξηση της απόστασης βάρδισης για 35 μέτρα σε σχέση με τους ασθενείς (18) στην ομάδα placebo
- Τον Ιανουάριο του 2016, ο FDA απέρριψε την αίτηση για κυκλοφορία του drisapersen λόγω ΑΕ (**πρωτεΐνουρία**) που αναγκαστικά περιορίζει την δοσολογία και επομένως την αποτελεσματικότητα

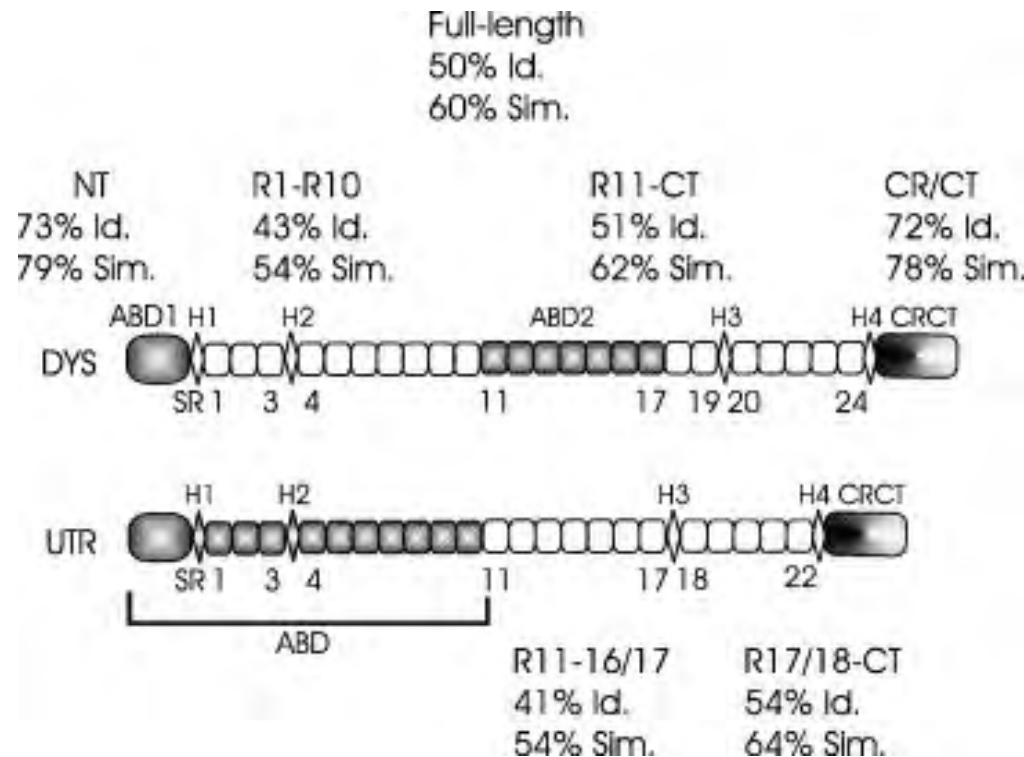


# Eteplirsen

- Phosphorodiamidate morpholine oligomer (PMO) chemistry
- Στοχεύει στην παράκαμψη του μεταλλαγμένου εξονίου 51
- Αποτέλεσμα του exon 51 skipping είναι η αποκατάσταση της ικανότητας του γονιδίου να παράγει ένα συντομότερο, πλην όμως λειτουργικό, μόριο δυστροφίνης με την μετάφραση του αγγελιοφόρου RNA
- Απευθύνεται στο 13% του πληθυσμού των ασθενών με DMD
- Διπλή Τυφλή Μελέτη 12 ασθενών : 3 ομάδες:  
1<sup>η</sup>: 30mg/kg iv εβδομαδιαίως, 2<sup>η</sup> : 50mg/kg iv εβδομαδιαίως, 3<sup>η</sup> placebo. Διάρκεια 48 εβδομάδες, Βιοψία μύος: αύξηση της δυστροφίνης κατά 40-50%. Κλινικώς αύξηση απόστασης βάρδισης 67 μέτρα
- Τον Απρίλιο του 2016 ο FDA απέρριψε την αίτηση για κυκλοφορία του eteplirsen λόγω έλλειψης αποδεικτικών στοιχείων της αποτελεσματικότητάς του

# Επαύξηση της δράσης ομόλογων πρωτεϊνών όπως η Ουτροφίνη

- Πριν τη γέννηση οι μύες περιέχουν μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Ουτροφίνη, ομόλογη σε δομή και λειτουργία με τη δυστροφίνη.
- Σταδιακά η Ουτροφίνη αντικαθίσταται από τη δυστροφίνη σε όλες τις μυικές ίνες εκτός από αυτές που περιβάλλουν τις νευρομυικές συνάψεις.
- Προσπάθεια ενίσχυσης της παραγωγής και δράσης της Ουτροφίνης ώστε να αντιρροπεί τη έλλειψη της δυστροφίνης



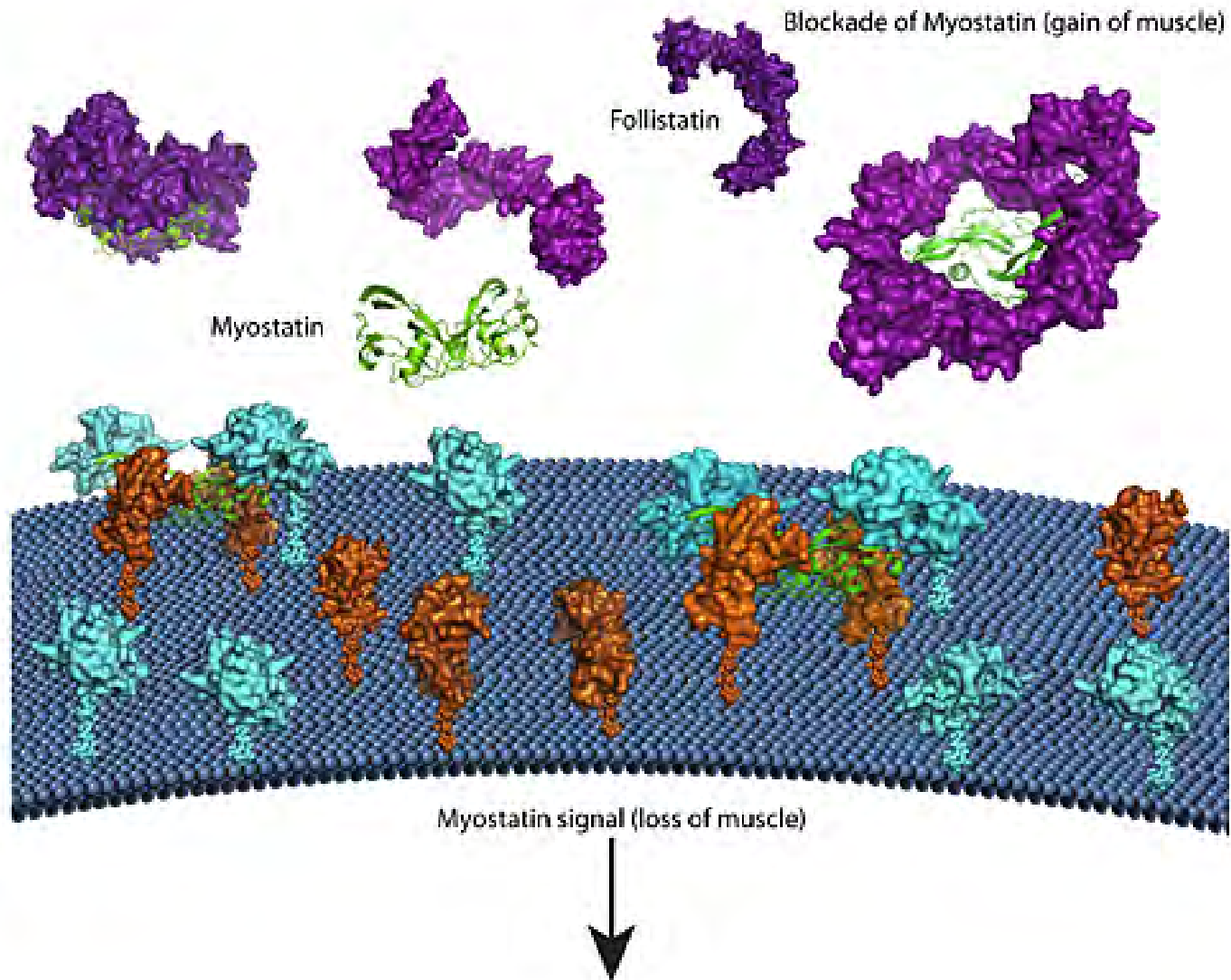
# Utrophin

- Το φαρμακευτικό μόριο SMT C1100 είναι επαγωγέας της παραγωγής της πρωτεΐνης utrophin, μια πρωτεΐνη παρόμοια με την δυστροφίνη
- Η πρωτεΐνη utrophin παράγεται στα πρώτα στάδια της κατασκευής των μυϊκών ινών, αλλά η έκφρασή της αποσιωπείται αργότερα στις ώριμες μυϊκές ίνες, όπου πλέον παράγεται η δυστροφίνη
- Σκοπός του SMT C1100 είναι η διατήρηση της παραγωγής της utrophin ώστε να εξισορροπήσει το αποτέλεσμα που προέρχεται από την έλλειψη της δυστροφίνης στους DMD ασθενείς.
- Απευθύνεται στο σύνολο των DMD ασθενών
- Είναι σε εξέλιξη μελέτη φάσης Ib

# Idebenone

- Αντιοξειδωτικό και αναστολέας οξείδωσης λιπιδίων με ικανότητα διέγερσης της ροής των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και ενίσχυσης της παραγωγή του ATP.
- Καρδιοπροστατευτική δράση
- Μελέτη φάσης II (DELPHI) και επιβεβαιωτική μελέτη φάσης III (DELOS) απέδειξαν ότι το Idebenone μείωσε σημαντικά την επιδείνωση της αναπνευστικής λειτουργίας σε DMD ασθενείς ηλικίας 8–18 ετών που δεν λάμβαναν συγχρόνως κορτικοστεροειδή.
- Αναμένεται η έγκριση της κυκλοφορίας του στην ΕΕ

# Αναστολείς Μυοστατίνης

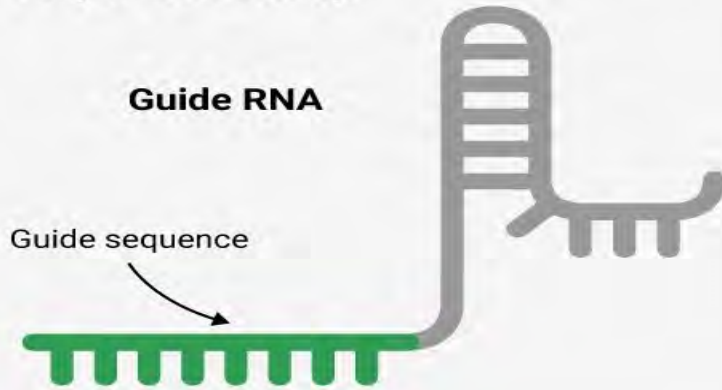


# Myostatin inhibition

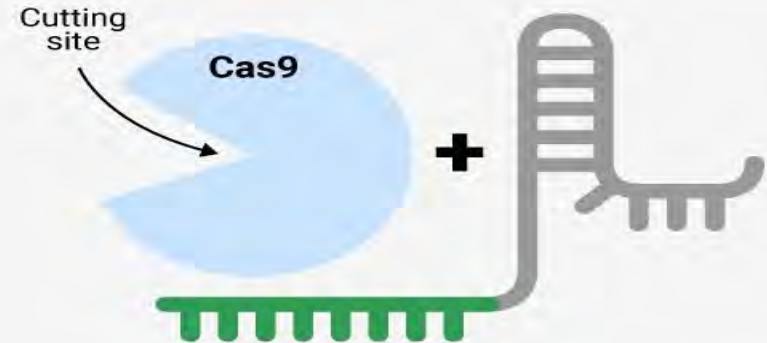


# EDITING A GENE USING THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE

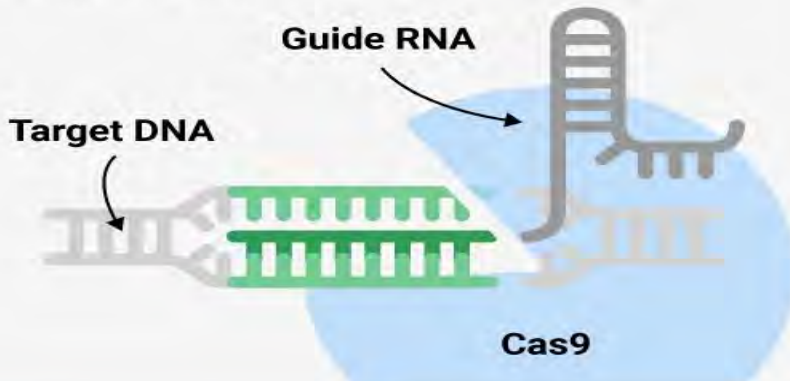
- 1** Scientists create a genetic sequence, called a “guide RNA,” that matches the piece of DNA they want to modify.



- 2** This sequence is added to a cell along with a protein called Cas9, which **acts like a pair of scissors** that cut DNA.



- 3** The guide RNA homes in on the target DNA sequence, and Cas9 **cuts it out**. Once their job is complete, the guide RNA and Cas9 leave the scene.



- 4** Now, another piece of DNA is swapped into the place of the old DNA, and **enzymes repair the cuts**. Voilà, you’ve edited the DNA!



# Παρεμβάσεις και QOL

