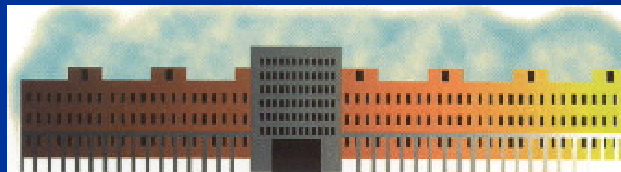


## Enfermedades Musculares en la Infancia y Adolescencia (X)



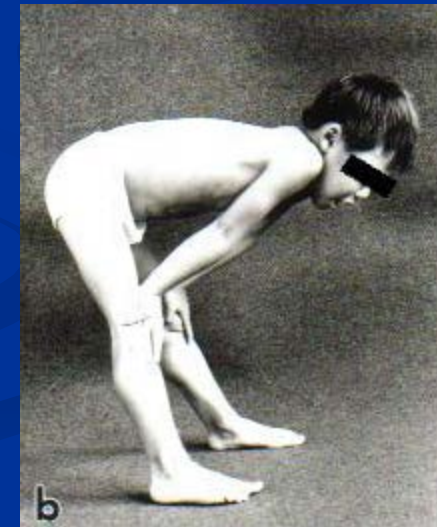
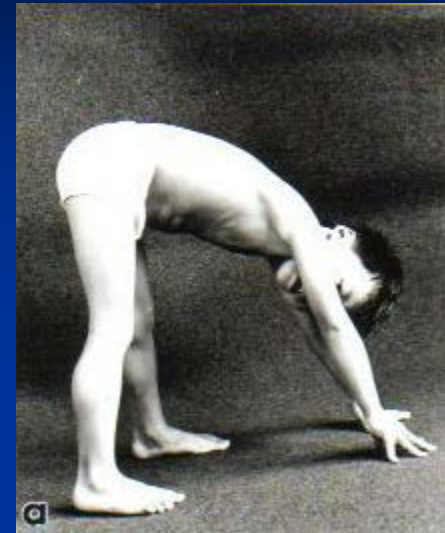
# AVANCES TERAPEUTICOS EN LAS DISTROFINOPATIAS

Dr. M. A. Martínez Granero  
Hospital Universitario Fundación Alcorcón



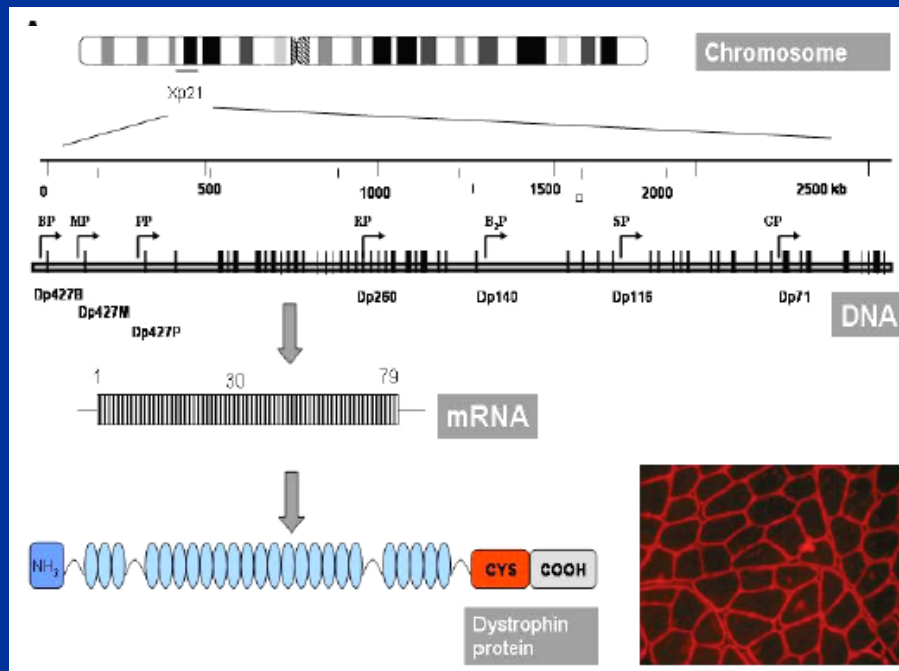
# Distrofia muscular de Duchenne

- 1/3500 RN varones
- Degeneración muscular progresiva
  - 2-5 a: debilidad, dificultades en la marcha
  - 9-13 años: incapacidad para caminar.
  - Escoliosis progresiva desde la pérdida de la marcha
  - Deterioro de función pulmonar desde los 9-11 años
  - Necesidad de ventilación nocturna desde los 15 años
  - Fallecimiento en 2º-3º década por insuficiencia respiratoria (75%) o cardiaca (25%).



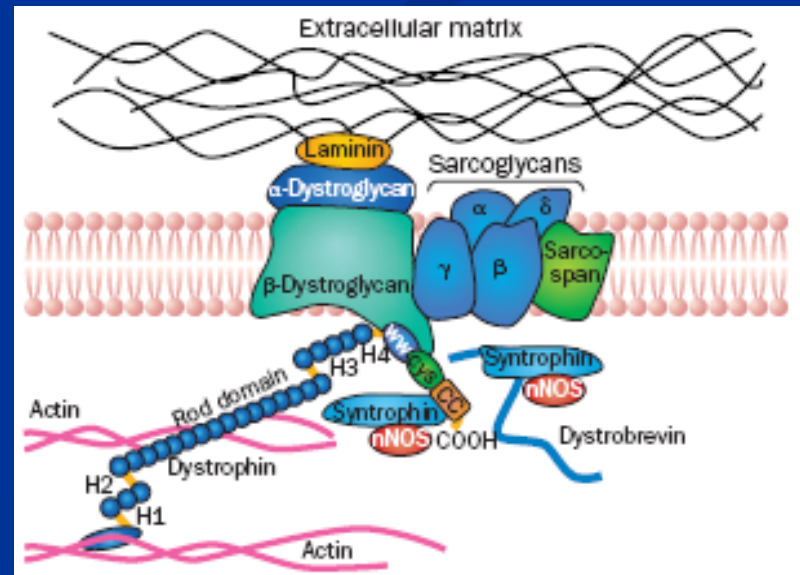
# Distrofia muscular de Duchenne (DMD) y de Becker (DMB)

- Mutación en el gen que codifica la distrofina (Xp21.2)
- Gen de gran tamaño
  - aprox 2,3 Mb (millones de pares de bases)
  - 79 exones.
  - Solo el 0,5% del gen (11.058 bases) codifica los 3.685 aminoácidos de la distrofina del músculo esquelético.  
RNAm de 14Kb



# Función de la distrofina

- Forma un vínculo entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular por medio del complejo DAP.
  - Distribución de las fuerzas mecánicas durante la contracción muscular
  - Disminuye el estrés mecánico de la célula
- Organización del complejo DAP, regulación de la entrada de calcio
  - Mantenimiento de la estabilidad de membrana del sarcolema



# Espectro genético

- Gran variabilidad en las mutaciones del gen
  - Mas de 4500 variantes en la base de datos de Leiden

- **Importancia del estudio genético**

- Diagnóstico DMD/DMB
- Estudio familiar
  - Portadoras
  - Dx prenatal
  - Dx preimplantacional

	Duchenne	Becker
Deletions	~60-65%	~85%
Duplications	5-10%	5-10%
Small mutations (insertions, deletions, nonsense, splice, etc.)	30-35%	5-10%

- *Selección de pacientes candidatos a terapias génicas que requieren el conocimiento exacto de la mutación*
  - Salto del exón
  - Lectura a través de stop-codon

- 2/3 mutations maternally inherited
- 1/3 apparently *de novo*

# Objetivos del tratamiento

- *Mejorar la calidad de vida*
  - Retrasar la debilidad y la pérdida de la marcha: *fisioterapia, corticoides*
  - Prevenir las contracturas y la escoliosis: *fisioterapia, ortesis, intervenciones quirúrgicas, corticoides*
  - Retrasar la insuficiencia cardiorrespiratoria: *fisioterapia respiratoria, intervención de escoliosis, BiPAP nasal; tratamiento de insuficiencia cardíaca, corticoides*
- *Curación:*
  - Se están desarrollando varias terapias génicas y celulares potencialmente curativas

# Posibilidades terapéuticas en la DMD

## Tratamiento farmacológico

Prevenir la degradación muscular (corticoides)

Estimular la regeneración muscular

## Actuar sobre el gen de la distrofina

Insertar el gen en las células musculares: **Transferencia génica**

Insertar células madre con el gen de la distrofina y capacidad para regenerar el músculo: **Terapia celular**

## Actuar sobre la producción de distrofina

Alterando el procesamiento del RNAm

**Salto del exón (AON)**

Alterando los mecanismos de transferencia del RNAm para suprimir una mutación

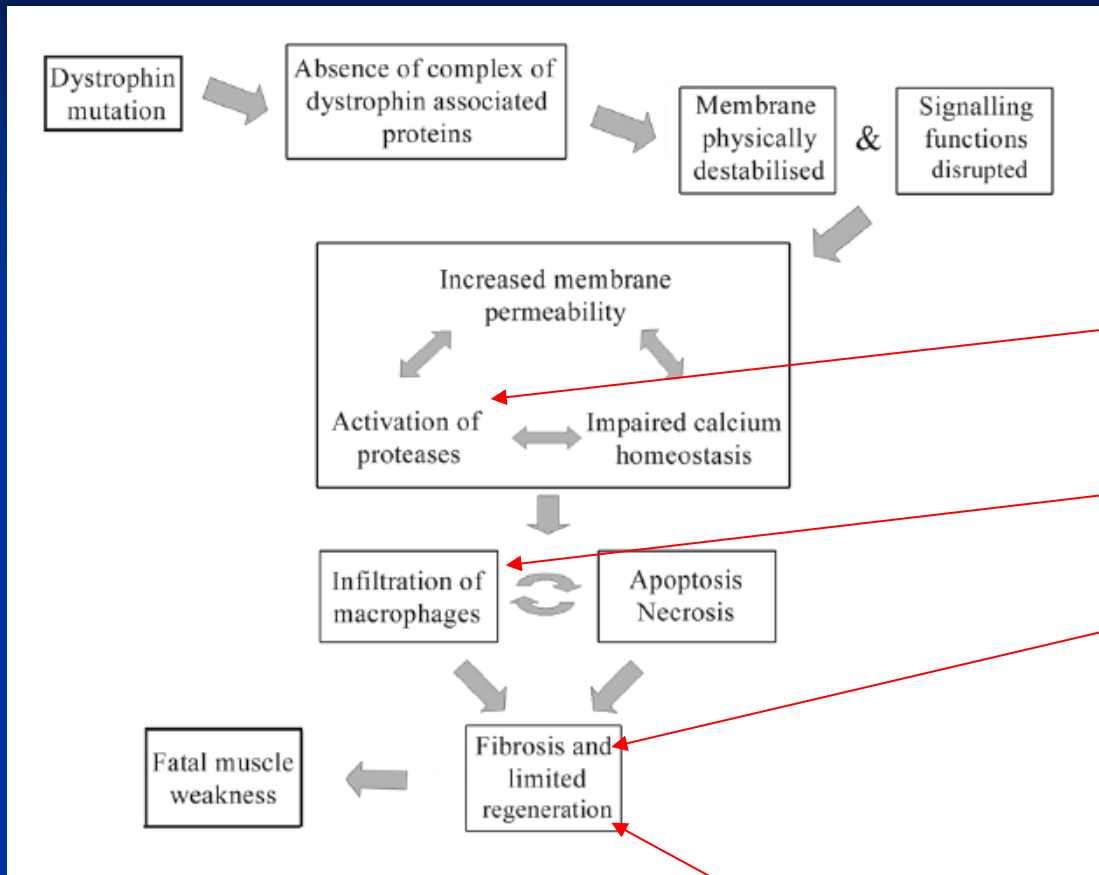
**Lectura a través de stop-codón prematuro: Ataluren**

**Inducir la producción de proteínas endógenas similares a la distrofina: utrofina**

# TERAPIA FARMACOLOGICA

1. Fármacos para combatir las consecuencias de la ausencia de distrofina en el músculo
2. Fármacos que estimulan la regeneración muscular





## 1. Disminuir el daño muscular

Inhibidores de proteasas  
Leupeptina  
BBIC y C101

Antiinflamatorios  
corticoides

Disminuir fibrosis  
L-arginina  
Inh TGF-alfa

## 2. Estimular la regeneración

IGF-I

Anti-miostatina

## PREDNISONE IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

D. B. DRACHMAN      K. V. TOYKA  
E. MYER

*Neuromuscular Unit, Department of Neurology,  
Johns Hopkins University, School of Medicine,  
Baltimore, Maryland 21205, U.S.A.*

**Summary** Fourteen patients with typical Duchenne muscular dystrophy were treated with prednisone for up to 28 months. Thirteen patients showed improvement in motor power and muscular activities while on prednisone. In eight of these, the improvement has been maintained for up to 28 months, while in five others deterioration has occurred while on medication. Creatine-phosphokinase levels did not correlate with the clinical status of the patients; in nine patients they fell by more than 45% at first, but subsequently returned to pre-treatment levels. Prednisone may provide a useful palliative treatment for some patients with the Duchenne form of dystrophy.

# Corticosteroides

## ■ Mecanismos de acción:

- propiedades antiinflamatorias y anabólicas.
- Suprimen la inmunidad celular y humoral y las células fagocíticas, causantes de la fibrosis
- Efecto sobre la concentración intracelular de calcio
- In vitro aumentan la expresión de proteína laminina, estabilizadora de membrana,
- In vitro activan las células satélite y la reparación muscular

## ■ Efectos beneficiosos:

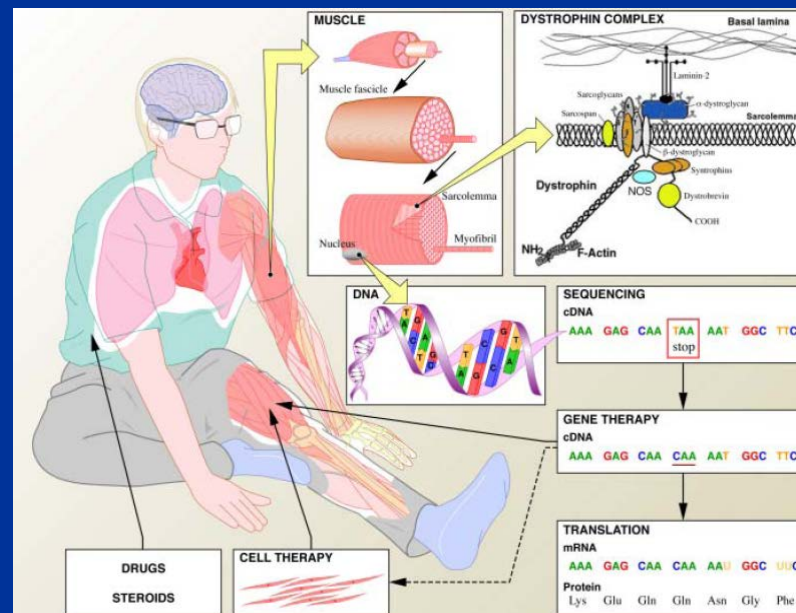
- Mejoran la fuerza y función a corto plazo (6 m a 2 años)
- retrasan la pérdida de la marcha entre 2 y 4 años
- reducen la progresión de la escoliosis
- retrasan el fallo cardiaco y respiratorio

# TERAPIAS GENICA Y CELULAR

- Objetivo: reemplazo del gen o de la proteína

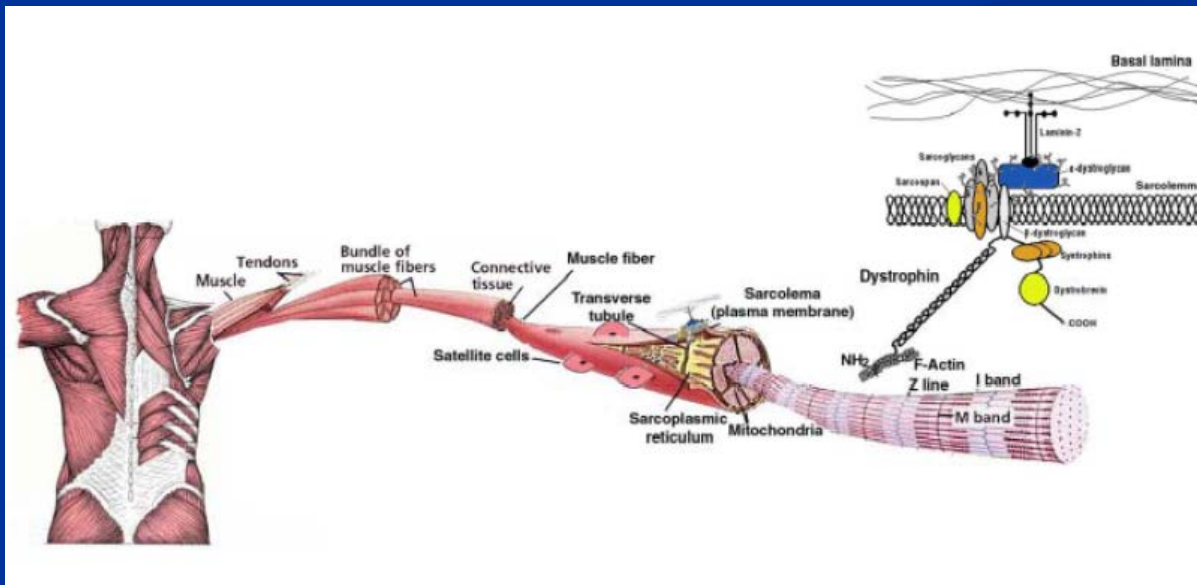
Para un tratamiento óptimo se requiere:

1. Que alcance a todas las células afectadas
2. Que cure la enfermedad sin efectos secundarios intolerables
3. Debe funcionar durante toda la vida del paciente



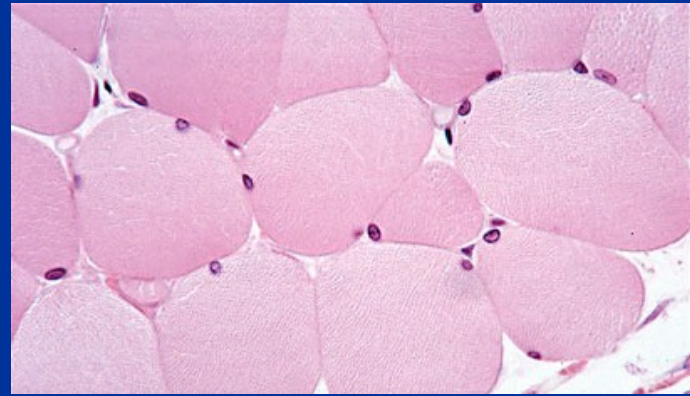
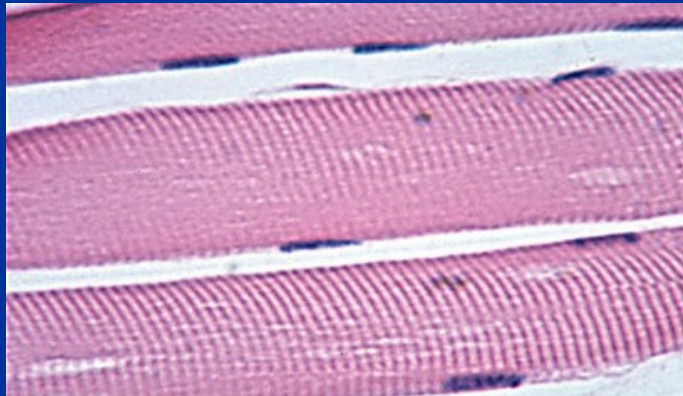
# Dificultades de la terapia génica y celular.

- Alcanzar todas las células afectadas
  - gran tamaño del tejido muscular (30-40% del tejido total)
    - 1 gramo de tejido muscular tiene 114 billones de moléculas de distrofina.
  - Inaccesibilidad directa de algunos músculos: corazón, m bronquiales, diafragma.
  - Se precisa un acceso sistémico eficaz



## ■ Problemas locales

- Músculo compuesto por grandes fibras multinucleadas, con núcleos sin capacidad de dividirse.
- Núcleos se encuentran en un citoplasma altamente estructurado y rodeado por una gruesa lámina basal que dificultan el acceso



Cualquier terapia génica o celular precisa restaurar la expresión adecuada del gen en miles de millones de núcleos de difícil acceso

# TERAPIA GENICA

- Transferencia génica
- Salto del exón
- Lectura a través de stop-codón prematuros

# TRANSFERENCIA GENICA

- Introducción del gen de la distrofina en el núcleo de las células musculares para que puedan directamente producir distrofina
- Se necesita
  - **construir** un cDNA que sea capaz de codificar una distrofina funcional
  - **transferirlo** al núcleo de las células musculares mediante **vectores**
  - lograr una adecuada expresión y persistencia de la proteína.



# Modelos animales en DMD

- Ratón mdx (*experimental muscular dystrophy*),
- Perro Golden Retriever (GRMD).



## Virus recombinantes adeno-asociados (rAAV)

- Virus modificados, se reemplaza su genoma por el gen de la distrofina
- SEGURIDAD
  - No insertan el cDNA en el genoma, permanece en el núcleo fuera de los cromosomas: no riesgo de mutaciones
  - No patogénicos, no pueden reproducirse en ausencia de otro virus "helper"
  - Baja inmunogenicidad
- Pueden transducir a células que no están en división,
- Serotipos con gran tropismo por músculo
- Pueden penetrar la matriz extracelular de las fibras musculares (pequeño tamaño).
- Buena capacidad para extenderse a músculo esquelético y corazón por vía sistémica:

# Virus recombinantes adeno-asociados (rAAV)

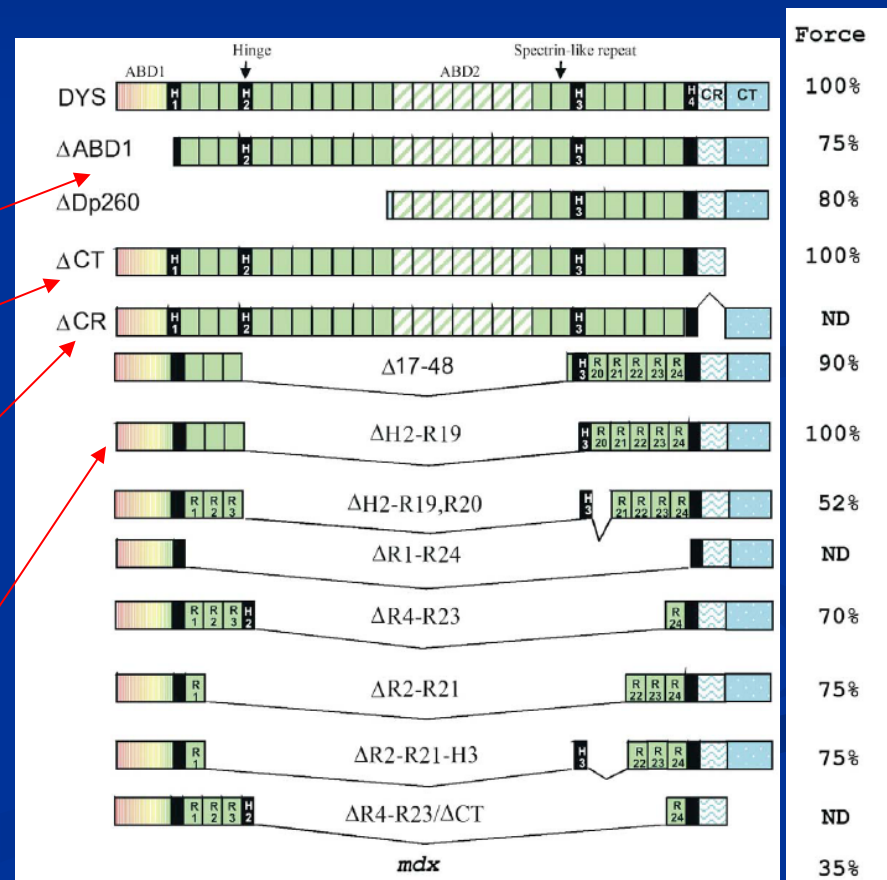
- Problemas:
  - Por su pequeño tamaño, tienen una capacidad limitada de 5 Kb para transportar cDNA (el gen codificante completo de la distrofina es de 14 Kb)
- Estrategias para solucionarlo
  - Reducción del tamaño del transgén de la distrofina
    - creación de mini y microdistrofinas.

- La distrofina está formada por varios dominios y mantiene una alta funcionalidad cuando diversas partes de estos se suprimen.
  - Descripción de distrofinas truncadas casi totalmente funcionantes en enfermos de DMB

Nature 1990,343:180-182

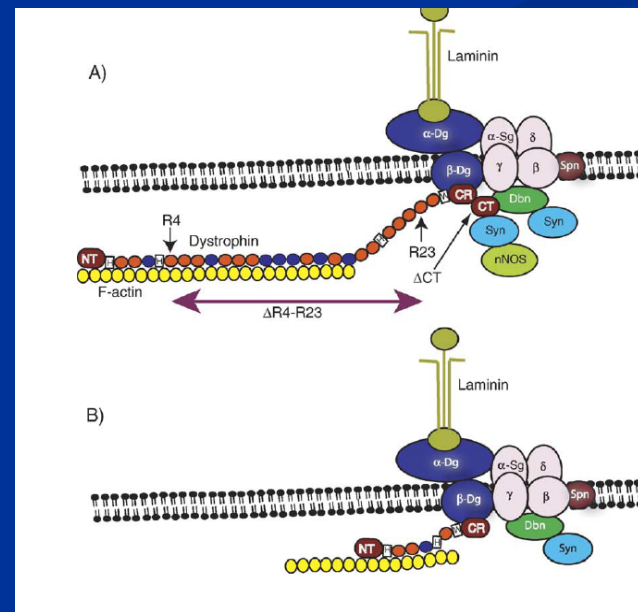
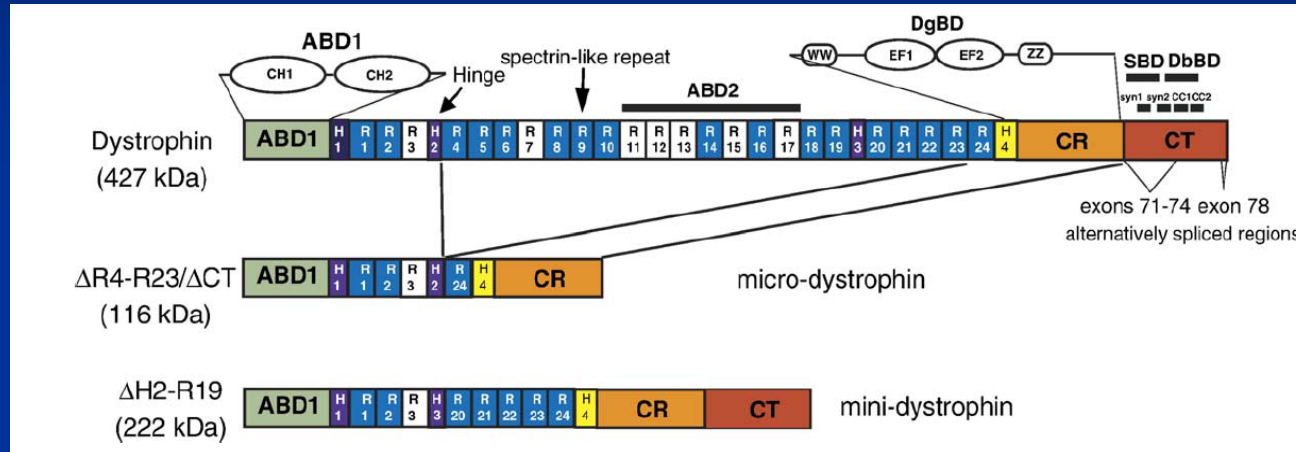
Se han "construido" ratones mdx con diferentes deleciones en los 4 dominios de la distrofina:

- Pérdida del dominio N-terminal se asocia con pérdida de función moderada
- El grupo C-terminal no es indispensable
- la deleción del dominio rico en cisteína, causa un fenotipo severo.
- La estructura central "rod" puede ser ampliamente reducida, si se mantienen las regiones "bisagra"



- Se han construido "minidistrofinas" y "microdistrofinas" de hasta 3,6 kb, que son suficientes para mantener una buena función

Nature Med 2002;8: 253-261

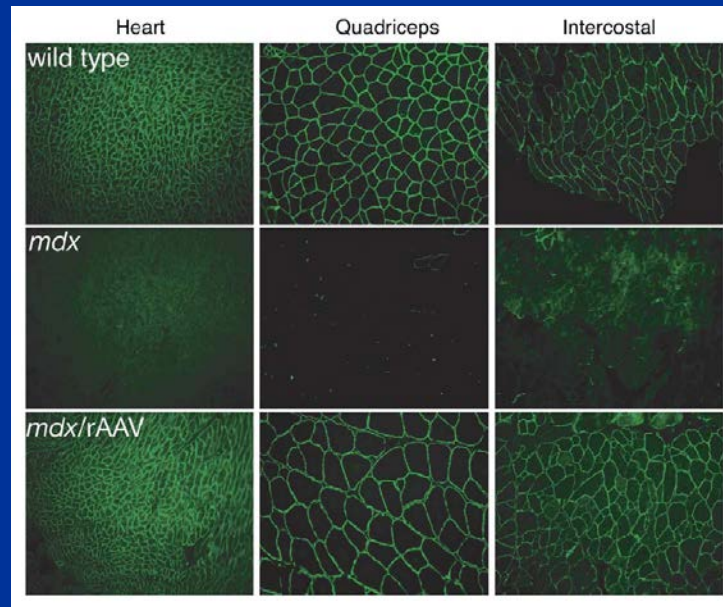


## Virus recombinantes adeno-asociados (rAAV)

- En ratones mdx la inyección sistémica produce una expresión extensa de distrofina, mejora la función muscular y cardiaca

Nat Med 2004;10:828-34

Mol Ther 2006;13:241-9



## Virus recombinantes adeno-asociados (rAAV)

### Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy

Jerry R. Mendell, M.D., Katherine Campbell, B.S., Louise Rodino-Klapac, Ph.D., Zarife Sahenk, M.D., Ph.D., Chris Shilling, M.S., Sarah Lewis, Dawn Bowles, Ph.D., Steven Gray, Ph.D., Chengwen Li, Ph.D., Gloria Galloway, M.D., Vinod Malik, Ph.D., Brian Coley, M.D., K. Reed Clark, Ph.D., Juan Li, M.D., Xiao Xiao, Ph.D., Jade Samulski, M.P.M., Scott W. McPhee, Ph.D., R. Jude Samulski, Ph.D., and Christopher M. Walker, Ph.D.

N Engl J Med 2010;363:1429-37.

- 6 pacientes DMD
- Transferencia de minidistrofina funcional mediante vectores rAAV, inyección local en biceps
  - Respuesta inmune de células T contra la minidistrofina
  - A los 90 días no se encuentra expresión del transgén

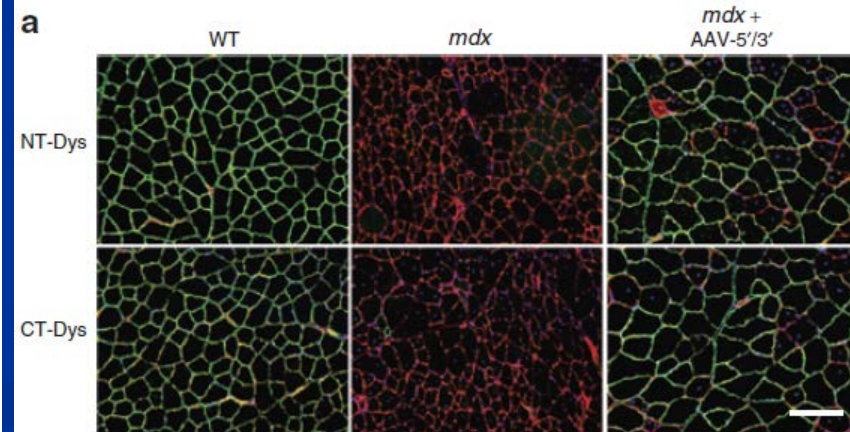
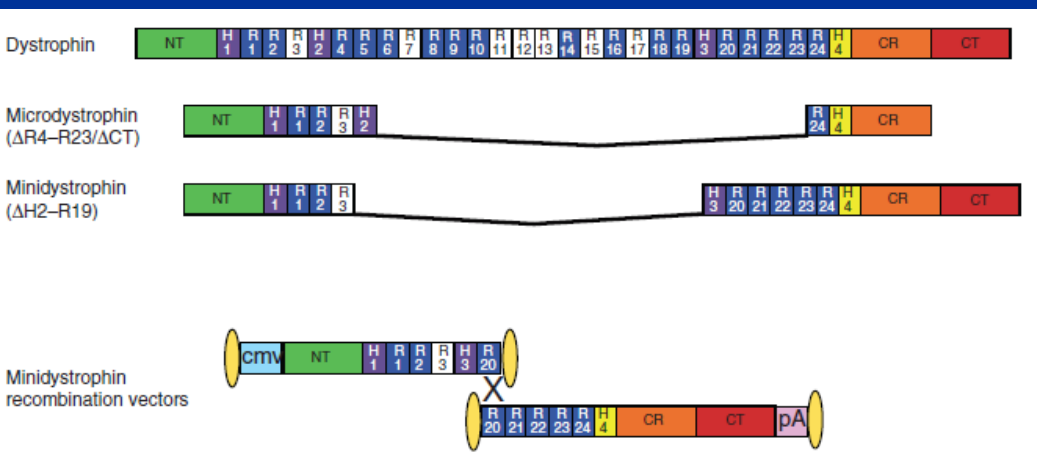
# Virus recombinantes adeno-asociados (rAAV)

## Gene Therapy of *mdx* Mice With Large Truncated Dystrophins Generated by Recombination Using rAAV6

Guy L Odom<sup>1</sup>, Paul Gregorevic<sup>1,\*</sup>, James M Allen<sup>1</sup> and Jeffrey S Chamberlain<sup>1-3</sup>

Mol Ther 2011;19:36-45

- Ratón *mdx*.: administran 2 vectores rAAV, cada uno con una secuencia diferente del genoma de la distrofina, y logran su reconstitución "in vivo" mediante recombinación
- Logran transferir una minidistrofina altamente funcional de tamaño del trangen superior a la capacidad de transporte del vector rAAV





## Virus recombinantes adeno-asociados (rAAV)

- Limitaciones actuales:
  - En ensayos preclínicos se requieren grandes cantidades de virus: Estrategias para incrementar la eficiencia de la transducción
  - Causan respuestas inmunes contra la cápside del rAAV y la distrofina.
    - Tratamientos inmunosupresores?
    - Uso de utrofina (proteína distrofina-like )?

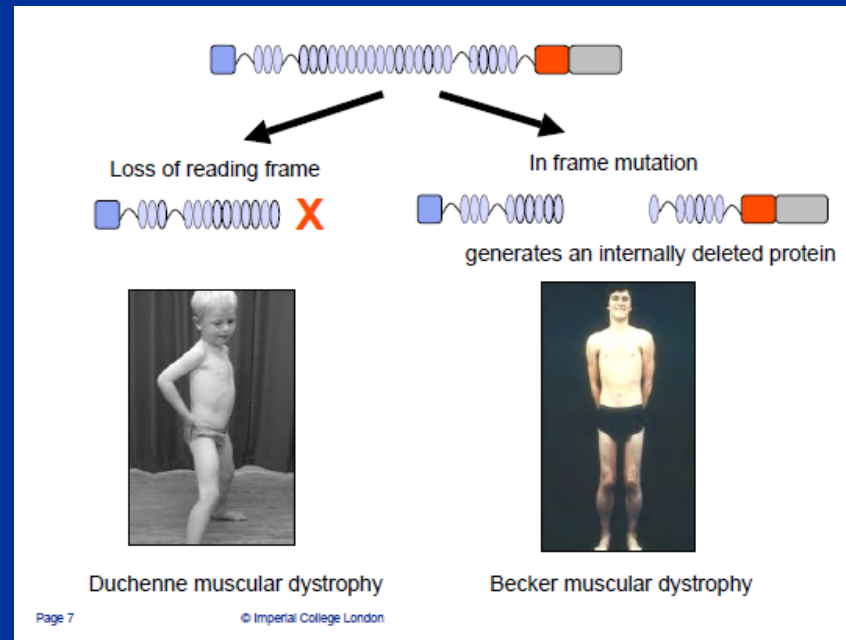
*Hum Gene Ther* 2007;18:18

- Persistencia baja a medio plazo en músculos distróficos

# SALTO DE EXON

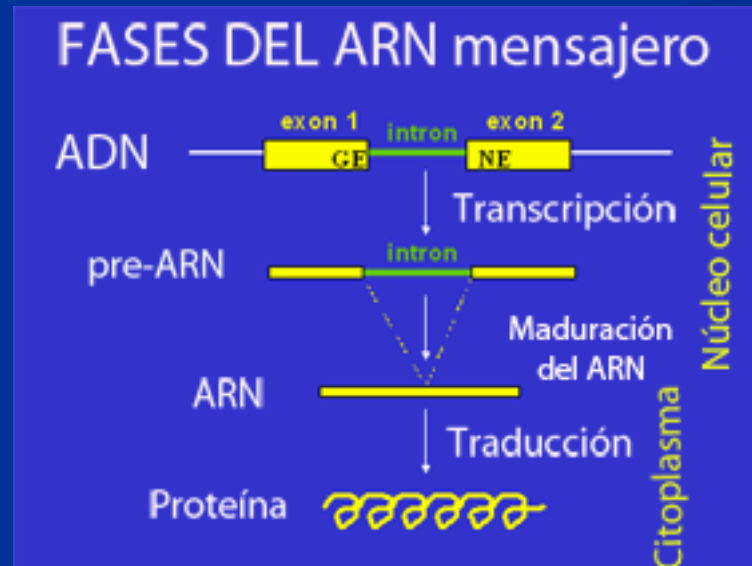
- Basada en la hipótesis del mantenimiento o afectación de la pauta de lectura (explica el 90% de los fenotipos DMD/DMB)

Mónaco. *Genomics* 1988

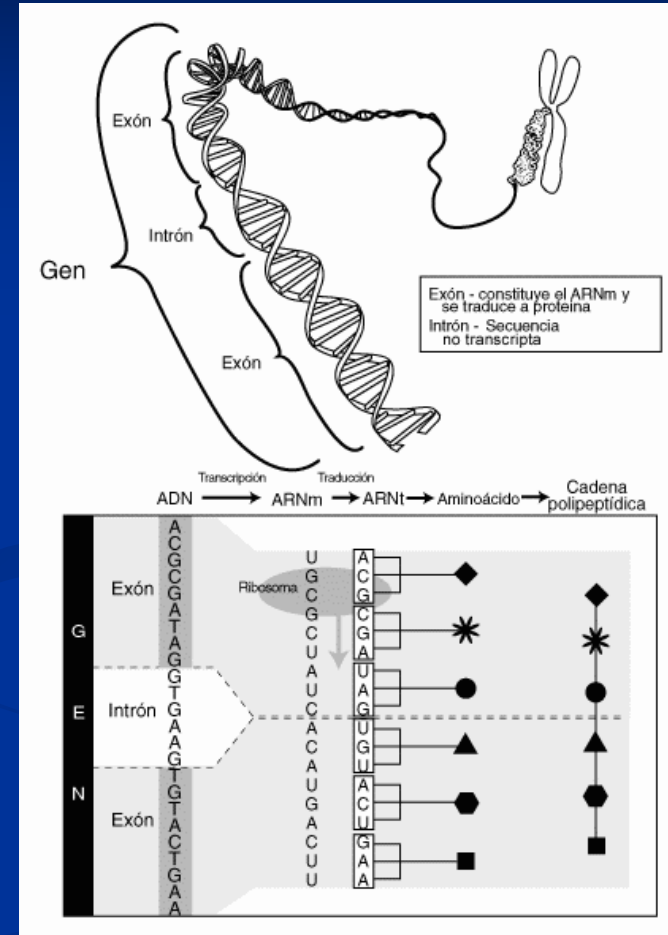


Las manifestaciones clínicas de las DM no se correlacionan con el tamaño de la mutación, sino por la afectación de la pauta de lectura

- Los Genes constan de regiones codificantes (exones) y no codificantes (intrones)
- La información de los genes se transcribe al pre-RNAm.
- Los intrones son eliminados del pre-RNAm y los exones ensamblados juntos para formar el RNAm.
- El RNAm llega a los ribosomas, donde se sintetizan las proteínas.



- En el RNAm, tres bases consecutivas forman un triplete o codón, específicos para cada aminoácido
- En los ribosomas estos codón son "leídos" uno tras otro y conducen al ensamblaje de aminoácidos para formar la proteína.
- Los tripletes UAA, UAG y UGA son stop-codon, y finalizan el ensamblaje de aminoácidos y la síntesis de la proteína.



- **Mutación con conservación de la pauta de lectura (in frame):**
  - Deleciona o adiciona codón completos de tres bases
  - La pauta de lectura no se interrumpe, se puede continuar con la transcripción correcta de aminoácidos (salvo la ausencia de los correspondientes a los tripletes delecionados)
  - La distrofina formada será anómala pero, si la mutación no afecta a zonas esenciales de la distrofina, conservará parte de su funcionalidad (DMB).
  
- **Mutación con pérdida de la pauta de lectura (out of frame):**
  - No cambia tripletes completos
  - La pauta de lectura correcta se interrumpe: se incorporan un número de aminoácidos incorrectos hasta alcanzar un stop-codon  
La proteína formada no es funcionante (DMD).

THE BAD AND OLD DOG ATE THE FAT CAT

THE BAD ~~AND~~ OLD DOG ATE THE FAT CAT

THE BAD OLD DOG ATE THE FAT CAT

IN FRAME

THE BAD AND LDD OGA TET HEF ATC AT

OUT OF  
FRAME



# SALTO DE EXON

- **Finalidad:**
  - restablecer la pauta de lectura
  - Se forma una proteína funcional
  - Cambia mutación "Duchenne" en una mutación "Becker".
- **Técnica:**
  - Altera el ensamblaje de exones del pre-RNAm al RNAm eliminando uno o mas exones directamente antes o después de la deleción/duplicación o el exón que contiene la mutación puntual
  - No altera el gen
  - Interfiere en el procesamiento de la información genética del gen a la proteína,
- Potencialmente aplicable al 60-80% de DMD

- **Herramientas: Oligoribonucleótidos antisentido (AONs)**
  - RNA de 20-30 nucleotidos
  - diseñados para adherirse a su secuencia complementaria en el exón que se quiere suprimir
  - Interfieren con el ensamblaje de forma que el exón "diana" se "salta" en el RNAm.
  - Debe ser específico para el exón que se quiere eliminar (no omisión en otros genes)

```

      End Exon 44 | Start Exon 45           End Exon 45 | Start Exon 46
--UGG-UAU-CUU-AAG | GAA-CUC-CAG-GAU---AGA-AAA-AAG-AG | G-CUA-GAA-GAA-
  trp tyr leu lys | glu leu gln asp   arg lys lys arg|   leu glu glu

hidden stop code                antisense oligoribonucleotide
                                GUC-GUU-GAU-UUU-UUU-UUC-G           End Exon 46 |
--AAU-GAA-UUU---AAA-GAG-CAG-CAA-CUA-AAA-GAA-AAG-CUU-GAG-CAA-GUC-AAG |
  asn glu phe   lys glu gln gln leu lys glu lys leu glu gln val lys |

| Start Exon 47
| UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
| leu leu val glu glu leu

```

## ORIGINAL ARTICLE

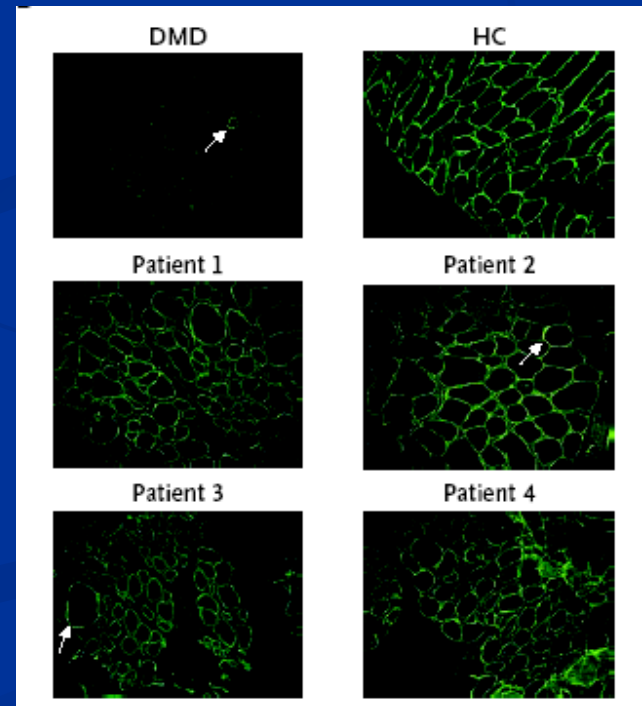
## Local Dystrophin Restoration with Antisense Oligonucleotide PRO051

Judith C. van Deutekom, Ph.D., Anneke A. Janson, B.S., Ieke B. Ginjaar, Ph.D.,  
Wendy S. Frankhuizen, B.S., Annemieke Aartsma-Rus, Ph.D.,  
Mattie Bremmer-Bout, B.S., Johan T. den Dunnen, Ph.D., Klaas Koop, M.D.,  
Anneke J. van der Kooi, M.D., Ph.D., Nathalie M. Goemans, M.D., Ph.D.,  
Sjef J. de Kimpe, Ph.D., Peter F. Ekhart, M.Sc., Edna H. Venneker, M.D.,  
Gerard J. Platenburg, M.Sc., Jan J. Verschuuren, M.D., Ph.D.,  
and Gert-Jan B. van Ommen, Ph.D.

NEJM 2007;357:2677

- Expresión de distrofina
  - 64-97% de las fibras
- Ningún efecto adverso

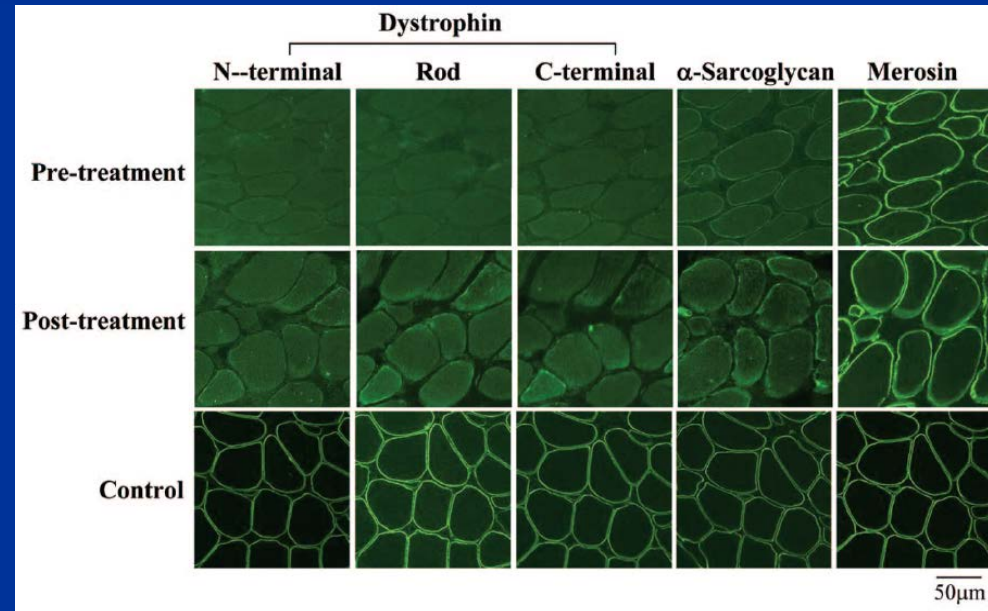
4 niños DMD 10-13 años.  
AON contra exón 51  
Inyección en m. tibial anterior

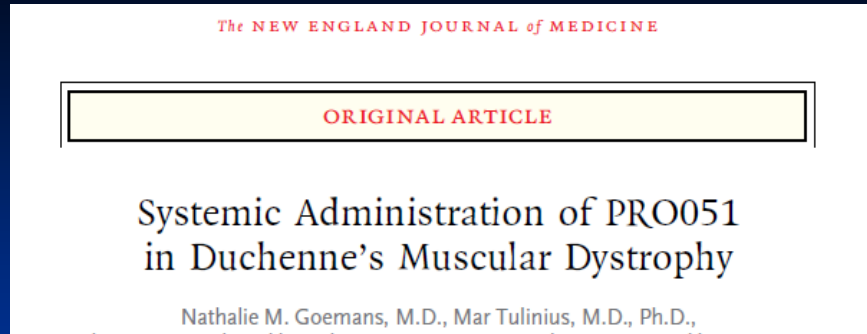


## Intravenous Infusion of an Antisense Oligonucleotide Results in Exon Skipping in Muscle Dystrophin mRNA of Duchenne Muscular Dystrophy

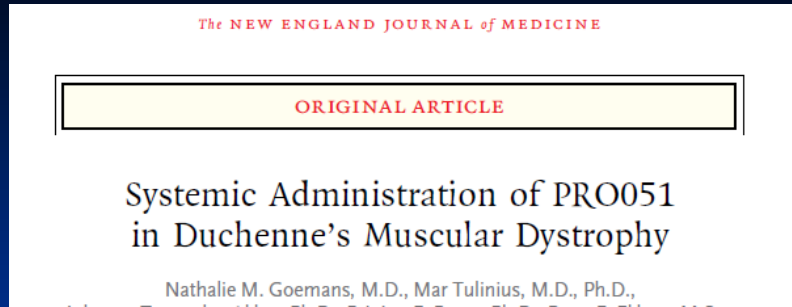
YASUHIRO TAKESHIMA, MARIKO YAGI, HIROKO WADA, KAZUTO ISHIBASHI, ATSUSHI NISHIYAMA, MIKIO KAKUMOTO, TOSHIYUKI SAKAEDA, RYUICHI SAURA, KATSUHIKO OKUMURA, AND MASAFUMI MATSUO

- Primer niño tratado con AON por via IV
  - 10 años, deleción exon 20
  - AON contra exon 19.
  - Resultados:
    - Biopsia muscular a la semana de inyección IV:
      - Expresión de distrofina en el sarcolema
      - Sólo un 6% del RNAm detectado era "nuevo"
    - No efectos tóxicos graves
    - No beneficios funcionales



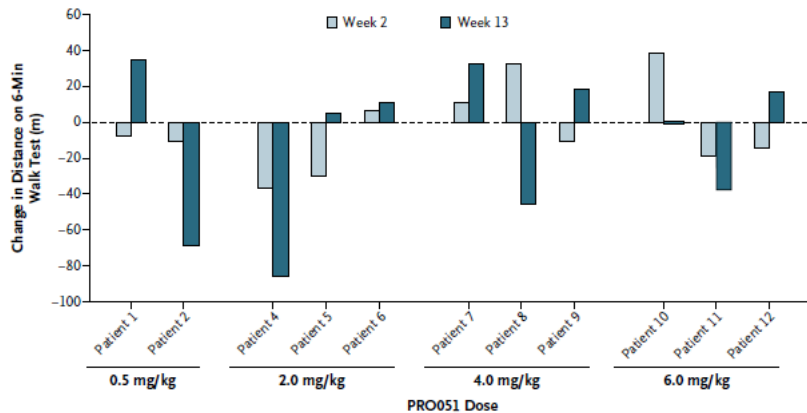


- 12 pacientes DMD
  - Inyección subcutánea semanal de AON (exón 51) en 4 dosis diferentes, 5 semanas (escalada de dosis)
  - A los 6-15 meses: Estudio de extensión, con la dosis mayor, 12 semanas
- 
- Resultados
    - No efectos adversos significativos
    - Expresión de distrofina en 60-100% de las fibras musculares en 10/12 pacientes
      - Efecto dosis-dependiente

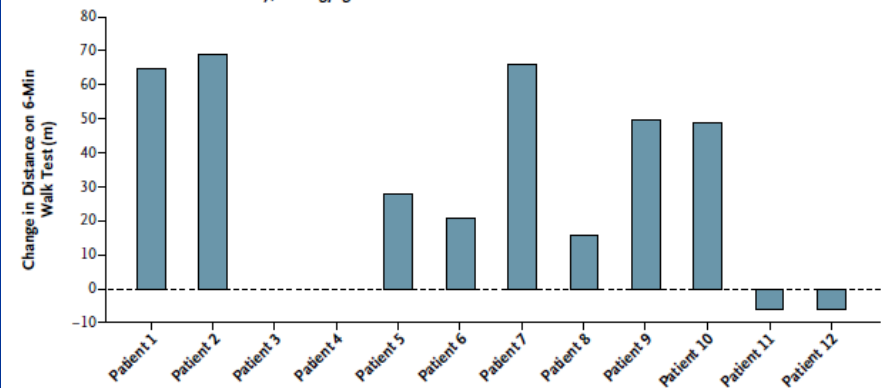


- Resultados (test de 6 min walk)
  - Disminución de 37 m antes del inicio del estudio de extensión (6-15 meses tras escalada de dosis)
  - Mejoría funcional discreta en el estudio de extensión: 35.2 +/- 28.7 m (estabilización)
  - 3 pacientes mejoran >65 metros

A Dose-Escalation Study



B Continued 12-Wk Treatment Study, 6.0 mg/kg



## Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study

Sebahattin Cirak\*, Virginia Arechavala-Gomez\*, Michela Guglieri, Lucy Feng, Silvia Torelli, Karen Anthony, Stephen Abbs, Maria Elena Garralda, John Bourke, Dominic J Wells, George Dickson, Matthew J A Wood, Steve D Wilton, Volker Straub, Ryszard Kole, Stephen B Shrewsbury, Caroline Sewry, Jennifer E Morgan, Kate Bushby, Francesco Muntoni

- 19 pacientes DMD 5-15 años
- AON (exon 51) IV, semanal, a diferentes dosis (escalada de dosis), **12 semanas**
- Resultados
  - No efectos adversos importantes
  - Expresión de distrofina en 7/19, dependiente de la dosis (15, 21 y 55% en los pacientes con mayor dosis)
  - Disminución de infiltrado inflamatorio por células T en el músculo y no detectan inmunidad humoral.
  - No mejoría funcional en 6 min walk test

- Estudio de extensión del anterior, randomizado, doble ciego, controlado con placebo, AON (exon 51), IV, dosis altas, **12 meses** (estudio completo no publicado)
  - 17th international Congress of the World Muscle Society (abstract en Neuromusc Disord 2012;22:771-922)
  - <http://investorrelations.sareptatherapeutics.com/phoenix.zhtml?c=64231&p=irol-newsArticle&ID=1741044&highlight> (UpTpDate 2013)
- Expresión de distrofina en 47% de fibras musculares
- **Mejoría funcional en 6 min walk test de 89 m respecto a placebo (p<0,016)**



## ■ Inconvenientes

- No es eficaz en mutaciones que alteran la pauta de lectura cuando afectan a secuencias críticas de la distrofina
- Baja eficacia en músculo cardiaco (mdx)
  - AON conjugados con péptidos que favorezcan la transducción al corazón
    - Mdx, transduce al 100% m esquelético y 40% fibras cardiacas  
Mol Ther 2010;18:1822
- Precisan administraciones repetidas (no modifican el gen)
- AON son diseñados específicamente para cada mutación: se necesitan diferentes AON para distintos paciente (encarecimiento)
  - Desarrollo de terapias "multi salto"

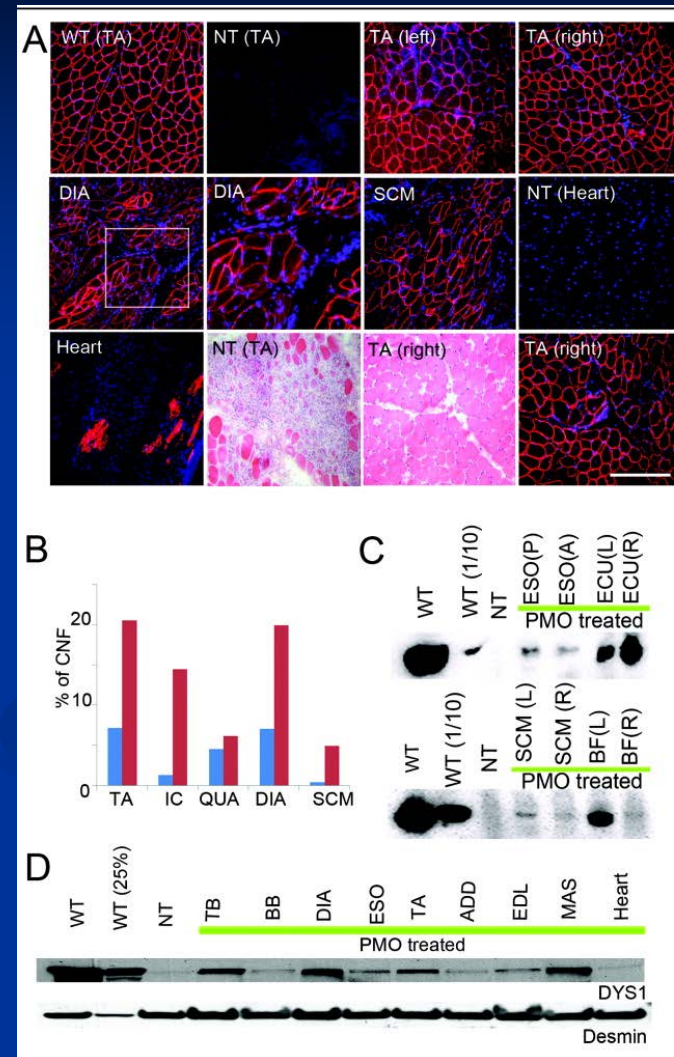
Table 3 | Overview of therapeutic exon skipping for a series of DMD-causing deletions

Skippable exon	Therapeutic for DMD deletions (exons)	Percentage of deletions in LDMD database
2	3-7, 3-19, 3-21	2.9
8	3-7, 4-7, 5-7, 6-7	4.5
17	12-16, 18-33, 18-41, 18-44	1.8
43	44, 44-47, 44-49, 44-51	3.7
44	14-43, 19-43, 30-43, 35-43, 36-43, 40-43, 42-43, 45, 45-54	7.8
45	12-44, 18-44, 44, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, 46-55	11.2
46	21-45, 45, 47-54, 47-56	5.6
50	51, 51-53, 51-55	5.2
51	45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63	17.5
52	51, 53, 53-55	4.0
53	10-52, 45-52, 46-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, 52	7.5
55	45-54, 48-54	1.8
Total	12 AONs	73.5

This series of Duchenne muscular dystrophy (DMD)-causing deletions were reported in the Leiden DMD (LDMD) database. Antisense oligonucleotide (AON)-induced skipping of just 1 of the 12 skippable exons listed would (theoretically) restore the reading frame in a series of DMD patients that were affected by different deletions.

- Terapia de multi salto de exón, combinando varios AONs
  - Reduce la especificidad de mutación a la que es aplicable
  - Aumenta el numero de pacientes potencialmente tratables con una determinada combinación
    - Salto de exones 45-55 sería aplicable al 50% de DMD
    - Salto de exones 2-20, al 15% de DMD.

- Estudio en perros GRMD
- Uso de oligonucleotidos sencillos y en cocktails (multiexon 6-9)
- Resultados ( admción IV del cocktail de AON)
  - Expresión de distrofina (26% de niveles normales)
  - Disminución de signos inflamatorios en histología.
  - Mejoría o estabilización de los signos clínicos
  - Ausencia de toxicidad.



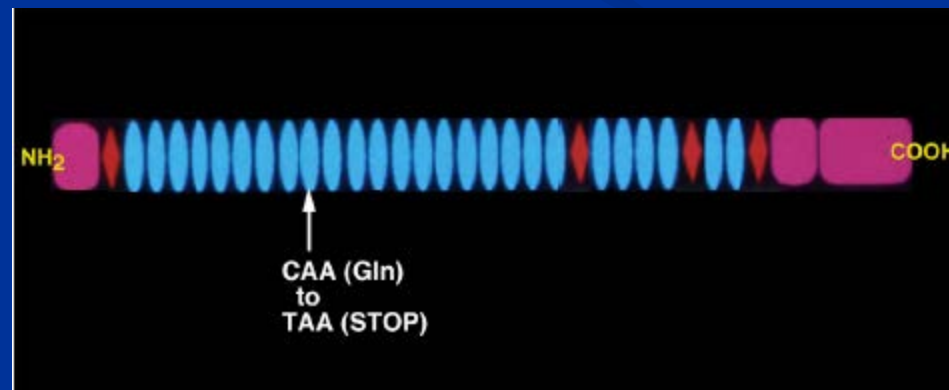
# LECTURA A TRAVES DE STOP- CODON PREMATURO

# Lectura a través de stop-codón prematuros

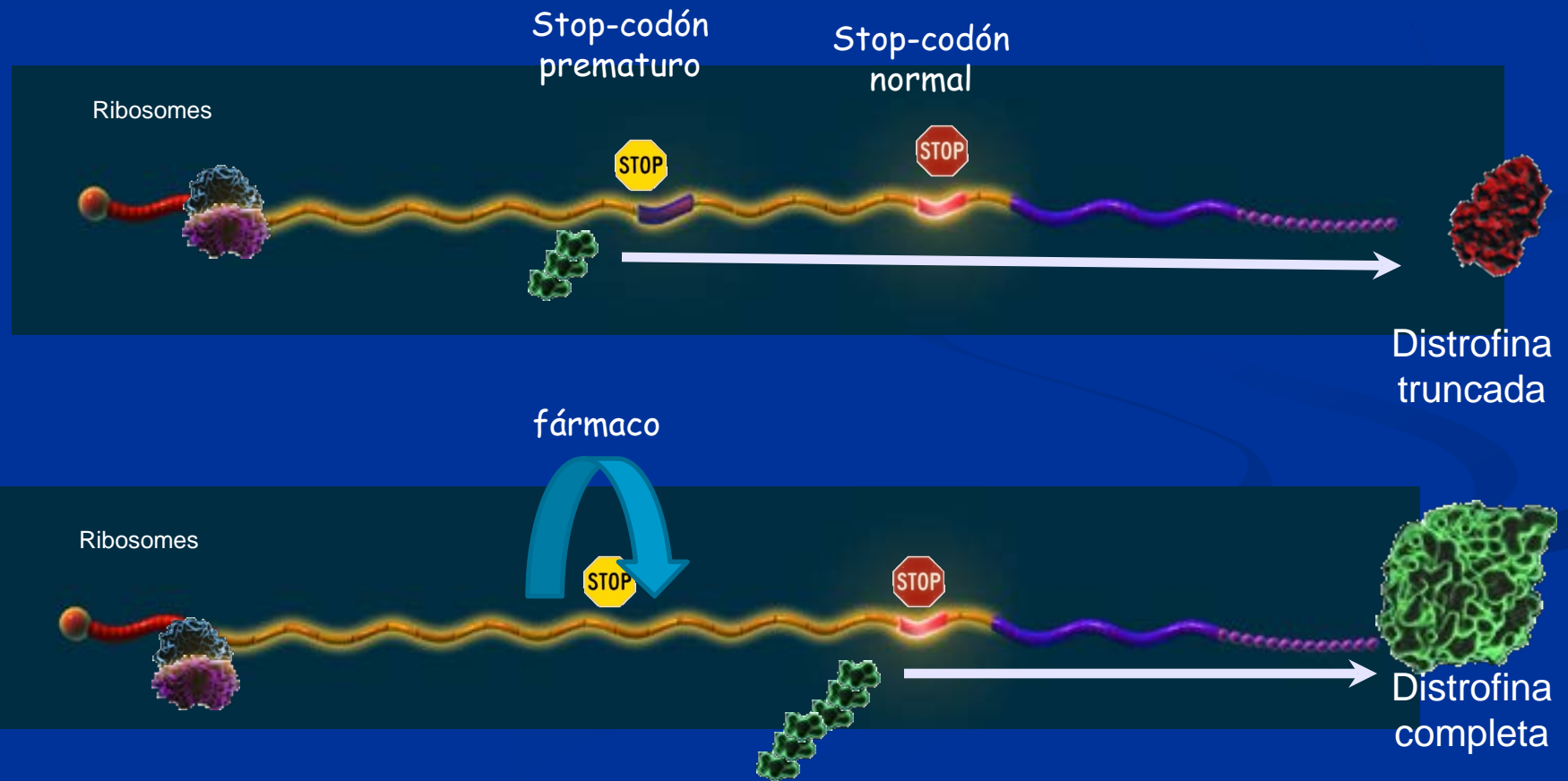
- 13-15% de los pacientes DMD tienen una mutación puntual en el gen de la distrofina que cambia la secuencia para un aminoácido por un stop-codón e impide concluir la síntesis de la proteína (mutación nonsense)

THE BAD AND OLD DOG RUN AND RUN ~~AND RUN AND RUN~~ END

THE BAD AND OLD DOG RUN AND RUN END



- Objetivo terapeutico: conseguir que el ribosoma "lea a través" del stop-codón prematuro



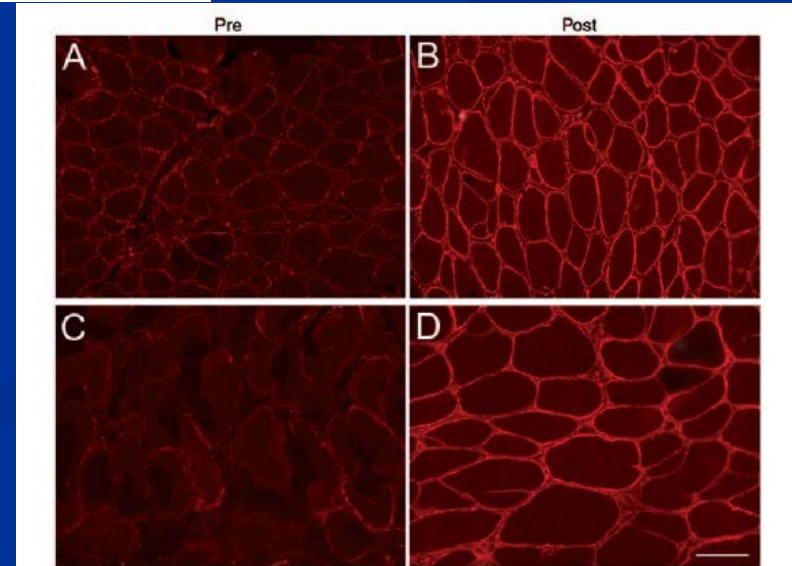
- La **gentamicina** interfiere con los mecanismos de transferencia del RNAm de forma que se "ignoran" los stop-codón prematuros
- Logró restaurar la expresión de distrofina en el ratón mdx

J Clin Invest 1999;104:375-381



- Ensayo en niños DMD con gentamicina IV
  - 3/16 producción de distrofina a niveles 13-15%
  - Estabilización de la fuerza
  - "se necesitan dosis mayores"

Ther Adv Neurol Disord 2010;3:379-89



## ■ Problemas con gentamicina

- Efecto a nivel de la síntesis de proteína en el ribosoma, precisa administraciones repetidas
- Gentamicina requiere administración IV,
- Muchos efectos secundarios, toxicidad renal
- Eficacia varía según el stop-codón implicado.

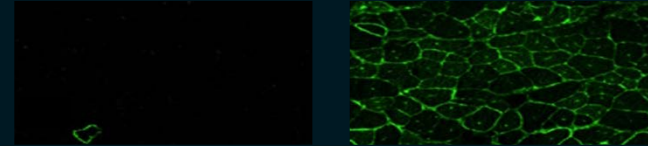
Se buscan fármacos más seguros y que puedan administrarse por vía oral



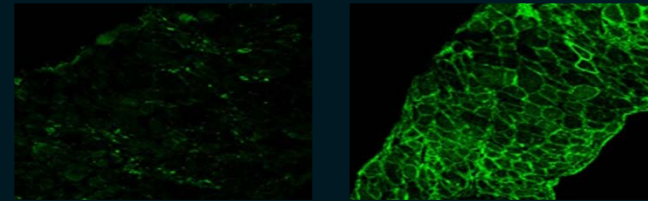
## Ataluren (PTC124)

- En estudios en el ratón mdx
  - se encuentra distrofina en mas del 25% de las fibras musculares tras la administración oral
  - No se detectaron lecturas a través de stop-codon normales ni efectos tóxicos importantes.

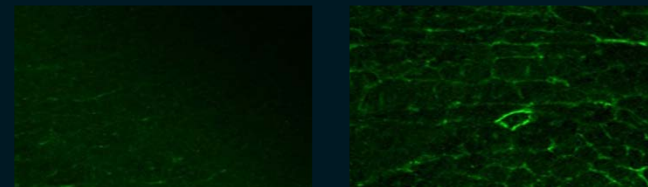
Tibialis anterior



Diafragma



Músculo cardiaco

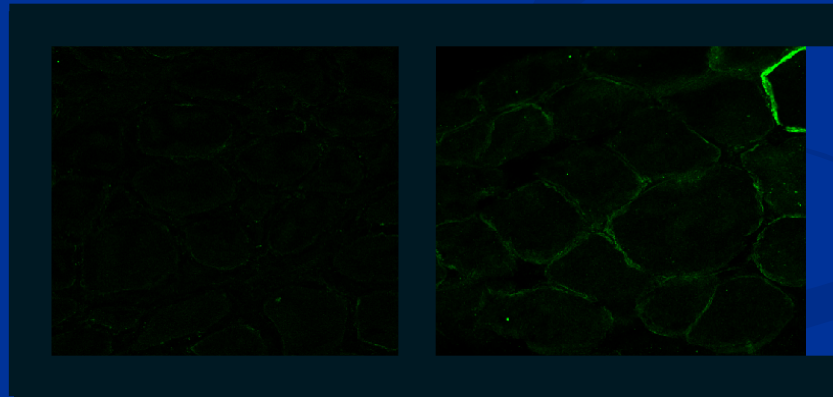


Welch et al, Nature, 2007

- Ventajas
  - Se administra por vía oral,
  - Pocos efectos secundarios
  - Su eficacia no varía según el stop-codón

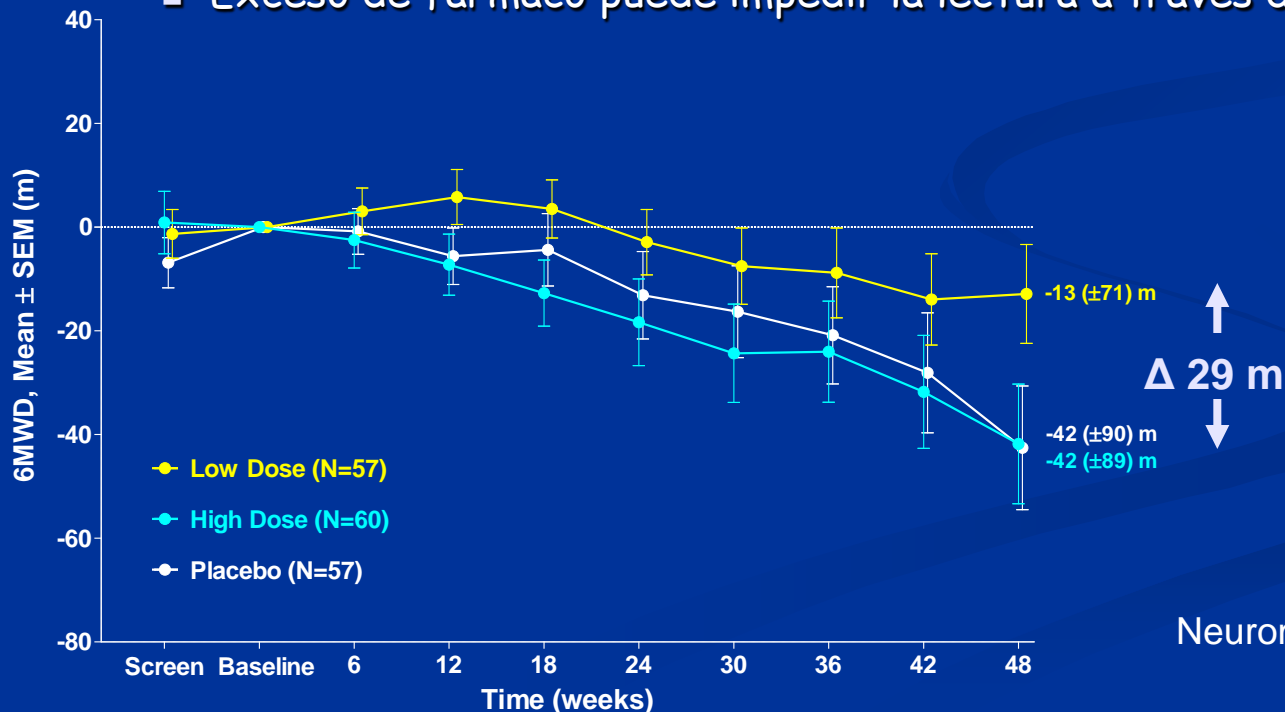
- Estudios fase II en DMD/DMB
  - 28 días de tratamiento
  - Aumenta la expresión de distrofina en 23/38, incremento medio de 11%

Extensor  
Digitorum  
Brevis



## ■ Estudio fase II, randomizado, doble ciego, controlado con placebo

- 48 semanas de tratamiento
- 3 grupos: Ataluren a dosis alta/baja y placebo
- Conclusiones:
  - No efectos adversos significativos
  - Menor decremento (aunque no estadísticamente significativa) en 6 min walk test en grupo de Ataluren a dosis bajas
  - Exceso de fármaco puede impedir la lectura a través del stop-codón



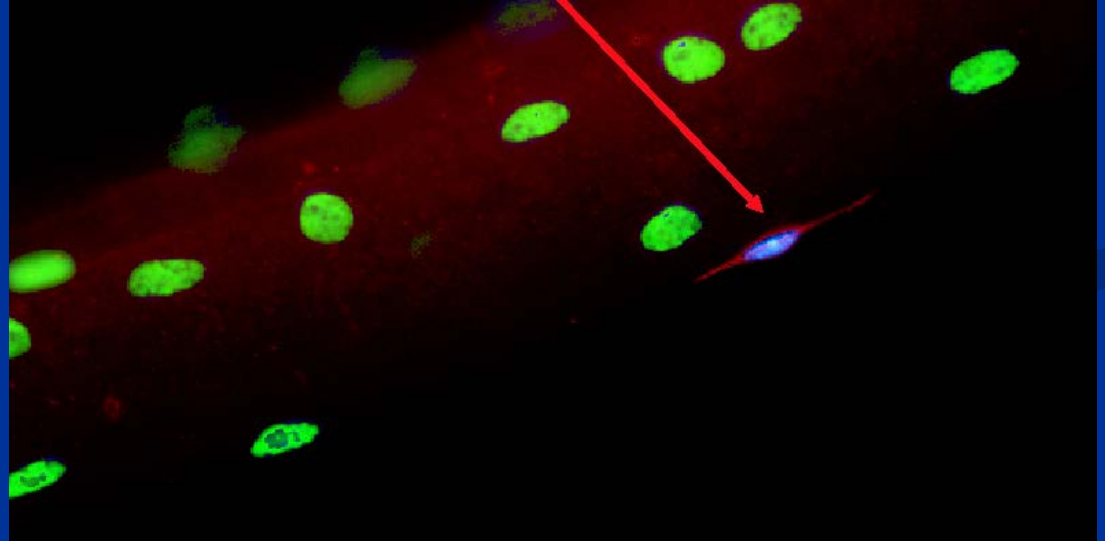
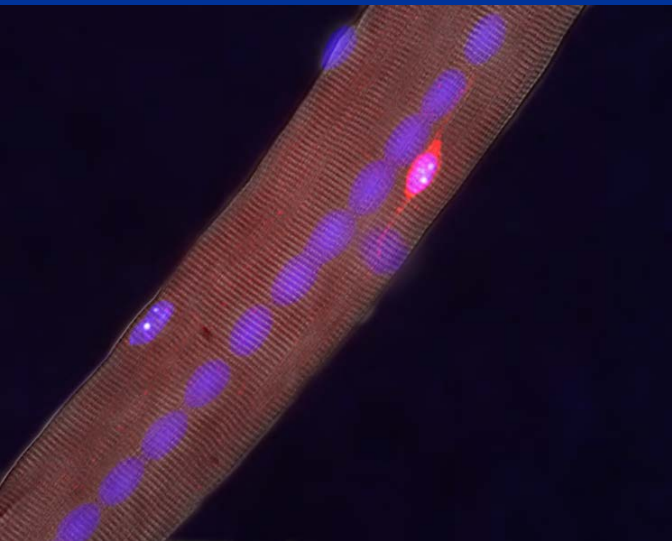
- Otros productos en estudio
  - RTC13 (read-through compound 13)
    - Estudios en mdx, administración sistémica
    - Aumenta la expresión de distrofina en músculo, diafragma y corazón
    - Mejora la fuerza y disminuye CPK
  - Comparado con gentamicina y Ataluren, es superior

# TERAPIA CELULAR

# TERAPIA CELULAR

- Transferencia de células miogénicas
- Transplante de células madre multipotenciales

- Las células madre adultas para la formación y reparación del tejido muscular son las células satélite o mioblastos, con capacidad de multiplicarse, migrar y diferenciarse en células musculares cuando se produce una lesión miofibrilar
- El músculo cardíaco no tiene células satélite.
- En la DMD, a los 4-5 años el músculo agota su capacidad de regeneración, las fibras dejan de ser reparadas y se reemplazan por grasa y tejido fibroso.



# TERAPIA CELULAR

- Emplea células satélite musculares o células madre multipotenciales.
  - **Transplante heterólogo** (células de donantes sanos)
    - expresan el gen normal
    - inducen una reacción inmunológica en el receptor
  - **Transplante autólogo**: aislar células del paciente, modificarlas genéticamente "in vitro" para que codifiquen la distrofina y reintroducirlas en el paciente.



# Transferencia de mioblastos

- Limitaciones:
  - No cruzan el endotelio muscular (deben inyectarse localmente)
  - La expansión in vitro reduce su capacidad de diferenciación in vivo
  - provocación de respuestas inmunológicas que precisan inmunosupresión
  - baja supervivencia post-transplante (10%)
  - La células supervivientes se dividen muy lentamente

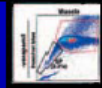
# Transplante de células madre multipotenciales

- Se buscan las **células madre ideales**:
  - Presentes en tejidos postnatales fácilmente accesibles.
  - Capacidad de expandirse in vitro sin perder sus propiedades
  - Capacidad de distribuirse por todo el tejido muscular mediante vías sistémicas
  - Que se diferencien exclusivamente en células musculares y no en otros tejidos o tumores.
  - No causen reacción inmunológica.



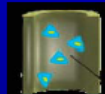
Pericytes

Dellavalle et al, 2007



SP (muscle)

Frank et al, 2006

MAPCs (bone marrow)  
Mesenchymal stem cells

Reyes et al 2001

Dezawa et al, 2005

Mesenchymal stem  
cells

De Bari et al 2003

Adipocyte derived  
mesenchymal stem cells

Rodriguez et al 2005

## Mesoangioblastos / células derivadas de pericitos

- Células madre localizadas en la aorta embrionaria (mesoangioblastos) y en el endotelio de pequeños vasos del tejido muscular, que originan la capa de músculo liso de los vasos (pericitos).
- Pueden aislarse fácilmente, proliferar "in vitro" y llegar al músculo esquelético por vía intraarterial
- **Estudio en ratones mdx**
  - Obtienen pericitos de biopsias musculares de humanos sanos y también de niños con DMD
  - Los procedentes de DMD los modifican genéticamente para producir minidistrofinas
  - Inyectan por arteria en ratones mdx inmunodeficientes
  - Resultados
    - pueden cruzar las paredes de los vasos hacia el tejido muscular
    - producción significativa de distrofina humana y mejoría funcional.

# Mesoangioblastos o células derivadas de pericitos

- **Estudio en perros GRMD** (Nature 2006;444:574-579)
  - Aislan mesoangioblastos de perros sanos y distróficos
  - Transfieren el gen de una microdistrofina mediante vectores virales (tx autólogo)
  - Los tratados de donante son inmunosuprimidos (tx heterólogo)
  - Inyectan por vía arterial
  
- **Resultados:**
  - 4 perros con tx autólogo: no beneficios ¿tamaño corto de la microdistrofina?
  - 6 perros con tx heterólogo:
    - Presencia de distrofina en músculos
    - Mejoría funcional, en algún caso recuperan movilidad
  - Mejoran los que recibieron células de donante ¿efecto del tto inmunosupresor?
  - Discordancia entre el grado de expresión de distrofina y la mejoría funcional

**Table 1 | Summary of treatment**

Dog no.	Dog name	Cell treatment	Lentiviral vector	Onset of treatment	Immune suppression (time)	Dystrophin expression	Motility	Outcome of experiment (at time P400)
01A	Ucal	Autologous, gene therapy	CK- $\mu$ dys-ires-GFP	P118	-	+/-	Loss	Euthanasia (P272)
02H	Vrillie	Heterologous, WT donor	-	P80	CYC A (P78)	+	Loss	Euthanasia (P235)
03H	Valgus	Heterologous, WT donor	-	P75	CYC A (P73)	+++	No decline	Alive and well
04H	Varus	Heterologous, WT donor	-	P75	RAP (P73)	+++	Modest decline	Alive and well
05H	Viko	Heterologous, WT donor	-	P77	RAP + IL-10 (P74)	ND	ND (sudden death)	Myocarditis (P186)
06A	Vaccin	Autologous, gene therapy	MLC1F- $\mu$ dys	P113	-	++	Major decline	Euthanasia (P326)
07A	Valium	Autologous, gene therapy	MLC1F- $\mu$ dys	P113	-	ND	Loss	Pneumonia (P245)
08A	Vampire	Autologous, gene therapy	MLC1F- $\mu$ dys	P113	-	++	Major decline	Pneumonia (P154)
09H	Azur	Heterologous, WT donor	-	P159	CYC A (P157)	++	Restored	Alive and well
10H	Azor	Heterologous, WT donor	-	P159	CYC A (P157)	+++	Restored	Alive and well
11U	Akan	None	-	-	-	-	Loss	Euthanasia (P380)
12U	Vulcano	None	-	-	-	-	Loss	Euthanasia (P376)
13U	Viking	None	-	-	-	-	Loss	Euthanasia (P340)

**INDUCCION DE PROTEINAS  
DISTROFINA-LIKE:  
UTROFINA**

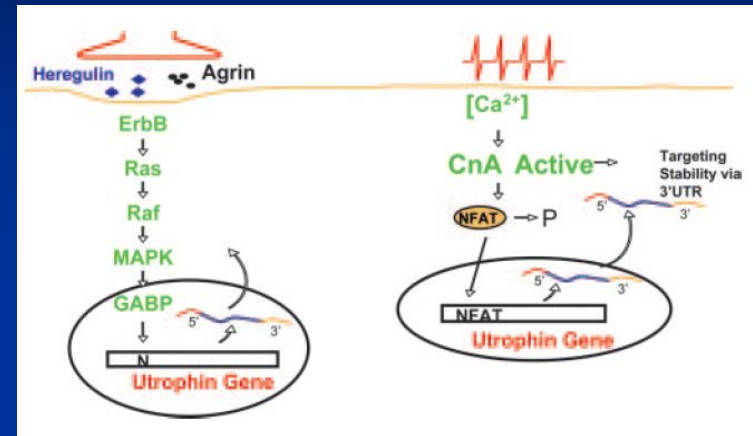


# Aumento de la expresión de utrofina

- Utofina se encuentra en todas las miofibras del músculo que se está regenerando (aparece en el músculo en DMD)
- Correlación positiva entre niveles de expresión altos de utrofina en biopsias de pacientes DMD y la edad de pérdida de la marcha  
Hum Molec Genet 2006; 15:1623-8
- Proteína endógena. No riesgo de rechazo inmunológico
- Base teórica: la sobreexpresión de esta proteína puede compensar la ausencia de distrofina asumiendo sus funciones.

- El acúmulo de utrofina en las sinapsis neuromusculares se debe a factores secretados por la neurona que estimulan la transcripción del gen de la utrofina, actuando sobre los promotores.

- Agrina
- Heregulina
- Calcineurina
- Oxido nitrico



## ■ Estrategia terapéutica:

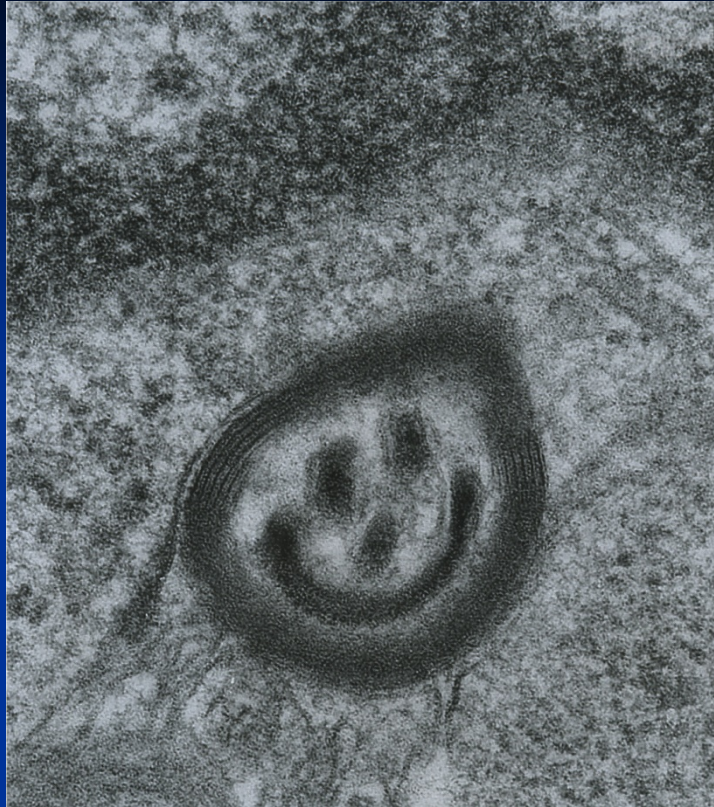
- aumentar la cantidad de utrofina en el músculo estimulando la transcripción del gen.
  - se necesita un fármaco que actúe como promotor del gen.
- 
- Estudios en mdx: enlentecen la evolución
  - La administración de biglicano recombinante humano aumenta la expresión de utrofina en miofibras cultivadas.



# CONCLUSIONES

# Conclusiones

- **Importancia del estudio genético:** el conocimiento de la mutación exacta es necesario para seleccionar los pacientes candidatos a muchas de las nuevas terapias
- Las terapias génica y celular han mostrado **resultados prometedores en modelos animales**
- Todas las estrategias descritas presentan **limitaciones** que deben de ser perfeccionadas.
- **El mayor avance en el tratamiento de la DMD lo representa la terapia de salto de exón** ( con beneficios funcionales demostrados en algunos estudios), y la lectura a través de stop-codón (beneficios clínicos, aunque los resultados no son estadísticamente significativos)



GRACIAS