

## Acercamientos de investigación para una Terapia de Distrofia Muscular Duchenne.

### Parte 1: Salto de Exón (Exon Skipping, Omisión de Exón).

En una reunión internacional en la investigación para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne en el 2000 en los Institutos Nacionales de Salud en Bethesda, cerca de Washington yo, *Günter Scheuerbrandt*, un bioquímico de Alemania, se dio cuenta de que sería importante que dejara, a las familias con niños con Duchenne y sus médicos y otros proveedores de cuidados, saber lo que los científicos y los médicos en esa reunión, decían sobre el estado actual de su trabajo de investigación. Entonces, escribí mi primer informe a los que siguieron muchos otros. Yo no los escribo con difíciles palabras "científicas", pero sí en un lenguaje más sencillo para que pueda entender lo que está sucediendo para sus niños en los laboratorios, incluso si no ha estudiado bioquímica moderna y genética. En mis páginas de Internet [www.duchenne-information.eu](http://www.duchenne-information.eu) usted puede ver el último de estos informes en Inglés, alemán y español y también algunas entrevistas escritas desde 2008.

Empiezo esta primera parte de mi informe con una explicación de cómo la distrofina es hecha en las células musculares, y cómo la ausencia de esta importante proteína causa la distrofia muscular Duchenne. Ya el salto de exón es, en la actualidad, la técnica de genética más avanzada de una terapia eficaz, este método con sus muchos ensayos clínicos ya realizados, todavía en curso o planeada, se describe con todo detalle en esta parte del informe.

En la segunda parte, que estará lista más adelante en este año 2013, se describirán los más importantes enfoques además del salto de exón, como la transferencia del gen, el posible uso de células madre, el aumento de la utrofina, la inhibición de la miostatina, el uso de esteroides, y los procedimientos de diagnóstico para la búsqueda de mutaciones en el gen de la distrofina de nuestros chicos con Duchenne y hombres jóvenes.

Ambas partes del informe contienen principalmente

información sobre la investigación terapéutica. Sé que muchos de ustedes, después de leer mi informe, me enviarán e-mails, preguntando que enfoques de investigación, en especial que exón se debe saltar que podría dar lugar a un posible tratamiento de su hijo enfermo o de usted mismo si usted es un paciente adulto. Al final de este informe, en la página 23, explico en un capítulo aparte cómo voy a manejar estas solicitudes y cómo voy a mantener actualizados los datos personales que usted me está enviando para que usted o su niño sea capaz de beneficiarse de ella.

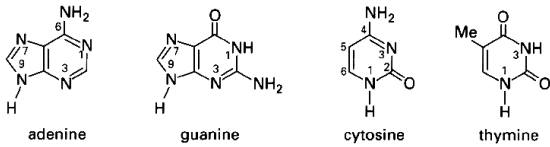
En mis resúmenes, yo sólo mencionare los nombres de los jefes de laboratorios, aunque tienen colegas y estudiantes que trabajan en equipo en los proyectos reportados aquí, pero es imposible mencionarlos a todos. He escrito los nombres de los científicos sin sus títulos académicos, pero la mayoría de ellos son profesores y todos son médicos o tienen un doctorado. Una lista de algunas de las publicaciones más importantes se da al final de este informe. Se indican con números en paréntesis, por ejemplo (12), en los lugares en el texto donde podrían dar más detalles de lo que yo podría mencionar en mis resúmenes. Estas publicaciones no serán fáciles de entender para usted, pero si usted desea tener una u otra enviada por e-mail, por favor hágamelo saber.

Estoy agradeciendo a **Pat Furlong**, presidenta del PPMMD, el Parent Project Muscular Dystrophy estadounidense " *Liderando la lucha para acabar con Duchenne* ", [www.parentprojectmd.org](http://www.parentprojectmd.org), y **Kate Bushby**, coordinadora de TREAT-NMD, " *La Red de Excelencia Europea de Enfermedades Neuromusculares* ", [www.treat-nmd.eu](http://www.treat-nmd.eu), por el permiso para usar sus logos para mostrar su apoyo y patrocinio para mis esfuerzos para explicar lo que los investigadores están haciendo para encontrar una terapia para sus hijos.

### Como los genes hacen proteínas.

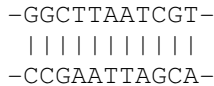
Los **genes** son unidades funcionales de material genético de **ácido desoxirribonucleico, ADN**. Su estructura parece una escalera de mano entrelazada, la *doble hélice*, que fue descrita en 1953 por **James Watson** y **Francis Crick** (vea

siguiente página). Cada nivel de esta escalera de mano contiene dos de las cuatro diferentes pequeñas moléculas, las **bases**: *adenina, guanina, timina, y citosina*, abreviadas A, G, T, y C, la cuales llamamos **letras genéticas**.

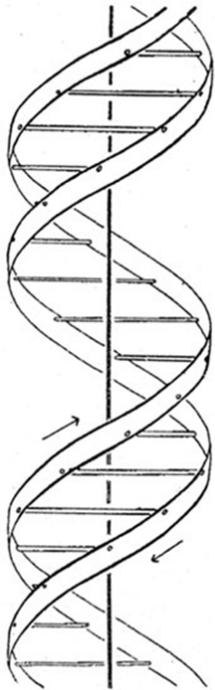


Cada nivel sólo puede contener la combinación de dos bases, los **pares de bases** A-T y G-C, porque sólo dos caben entre las hebras.

Si, por ejemplo, GGCTTAATCGT es la secuencia de estas bases de una cadena del ADN, la secuencia en la cadena opuesta debe ser *complementaria* a esta. A siempre es opuesta T y G opuesta C:



Esta secuencia de bases, o de "*letras genéticas*", es la **información genética** para el desarrollo y mantenimiento de un organismo vivo, y se transmite de una generación a la siguiente.



La mayoría de los genes llevan las instrucciones para la construcción de **proteínas**. En el núcleo de la célula, la instrucción genética de genes activos es expresada, es copiada, y **transcrita**, a otra sustancia genética, *el ácido ribonucleico mensajero prematuro* o **ARNpre-m**, algo también llamado la transcripción. La mayoría de los genes constan de regiones activas o codificantes, los **exones**, que contienen la información para la creación de las proteínas, y los a menudo más largos **intrones**, que contienen información importante para el control de las actividades de los genes. Los ácidos ribonucleicos, **ARNs**, usan la base U, *uracilo*, en lugar de la similar base T del

ADN. Debido a que la estructura de ARN es importante para el salto de exón, se explica en el párrafo sobre los dos tipos diferentes de oligos en antisentido, en la página 6.

Después de la transcripción y todavía en el interior del núcleo celular, los intrones son retirados del ARN pre-mensajero, y los exones son **empalmados** para formar el **ARN mensajero**, **ARNm**, que sólo contiene las regiones codificantes, la información genética para la síntesis de una proteína.

Este ARNm sale del núcleo y se traslada a los **ribosomas**, las estructuras sintetizadoras de proteínas, en el citoplasma fuera del núcleo. Los **sitios de empalme** son secuencias específicas dentro de los exones y en los bordes de los exones e intrones que son esenciales para el retiro correcto de las secuencias sin codificación del

intrón del ARNpre-m. El empalme es realizado por los **spliceosomas**, un complejo de muchas proteínas y pequeños ARNs.

**El código genético.** Para la traducción del lenguaje de los genes en proteínas, la información genética del ARNm está escrita en **palabras genéticas** cada una consistiendo de tres bases consecutivas, los **codones**, que especifican, *con tres excepciones*, uno de los 20 diferentes **aminoácidos**, los bloques de construcción de las proteínas, de acuerdo con el *código genético*. Existen 64 diferentes palabras clave de 3 bases cada una. He aquí algunos ejemplos:

GUU = valina, AGC = serina, AUG = metionina, CCA = prolina, UUU = fenilalanina, GCA = alanina, GCG = alanina.

La mayoría de los aminoácidos tienen más de una palabra clave de ARN. No hay espacios entre los codones. Por lo tanto, la corta secuencia AUG-AGC-GCA-CCA-al comienzo de un gen significa que la proteína, que el gen "hace", comienza con los aminoácidos metionina, serina, alanina, prolina. Por lo tanto, existe un **marco de lectura** - una palabra de tres letras genética después de la otra sin espacios entre ellas - establecida por la primera palabra del código que es siempre AUG. Los guiones en este ejemplo no existen realmente, sólo indican el marco de lectura. Si, por ejemplo, mediante la eliminación accidental, una mutación, de la G una letra escrita en rojo, los cambios en la secuencia serían AUG-ACG-CAC-CA..., el marco de lectura se desplaza y las palabras del código cambian su significado, entonces especifican diferentes aminoácidos, aquí serían: metionina, histidina, treonina, seguido de más aminoácidos equivocados. *Esto es muy importante para comprender cómo funciona la omisión de exón.*

En los **ribosomas**, el código de palabras genéticas del ARN mensajero son leídas y **traducidas** al lenguaje de las proteínas, que se construyen de muchos, a menudo miles, de aminoácidos. Las tres excepciones mencionadas son las palabras UAA, UAG, y UGA, que son los **codones de parada**, donde el ensamblaje de la proteína en los ribosomas llega a su fin.

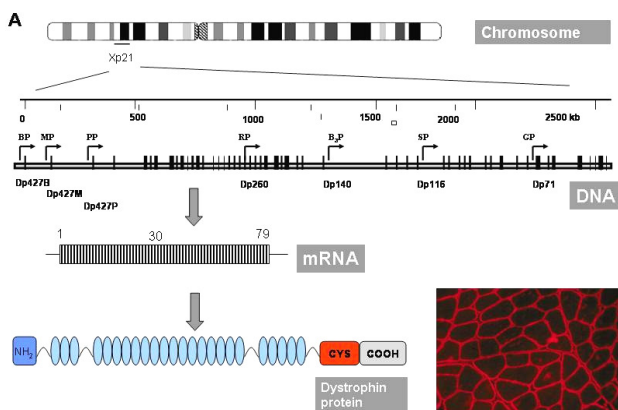
**El Gen y la proteína distrofina.** La **distrofia muscular Duchenne** afecta sólo a los chicos - cerca de uno de cada 3,500 recién nacidos - porque las mujeres, cuando son portadoras genéticas de esta enfermedad ligada al sexo, tienen una mutación, un error, en el gen de la distrofina en uno de sus dos cromosomas X. Ellas lo heredan, en promedio, a la mitad de sus hijos que entonces sólo tienen este cromosoma X con la mutación que causa la *hereditaria y todavía incurable enfermedad* distrofia muscular Duchenne. A veces, aparece espontáneamente en una nueva familia.

El **gen de la distrofina** es el segundo más largo de nuestros 20,488 genes. (El gen para la proteína muscular titina, que es importante para la elasticidad de las células musculares, es aproximadamente 100 veces

mayor que el gen de la distrofina.)

La ilustración siguiente muestra la ubicación del gen en el brazo corto del cromosoma X. Su ADN se compone de 2,220,381 letras genéticas, que se agrupan en **79 exones**, las secciones activas. También son indicados los 7 promotores, las regiones de inicio para la producción de la proteína de longitud completa y 6 versiones más cortas de la misma. Después del empalme, el ARNm contiene sólo 11,058 letras genéticas, 0,5% de todo aquel gen entero. En los ribosomas, la **proteína distrofina**, se ensambla de acuerdo con la información genética en el ARNm con 3685 aminoácidos que están siendo llevados al sitio de la síntesis por otro tipo de ARN, el de transferencia o **ARNt**.

Las secuencias inactivas entre los exones, 99,5% de la totalidad de los genes, se llaman **intrones**. Ahora se sabe que algunas de estas secuencias son importantes para la regulación de las actividades de los genes, y pueden tener otras funciones todavía desconocidas, también, que contribuyen a los síntomas a veces diferentes de pacientes con Duchenne con mutaciones idénticas en los exones.

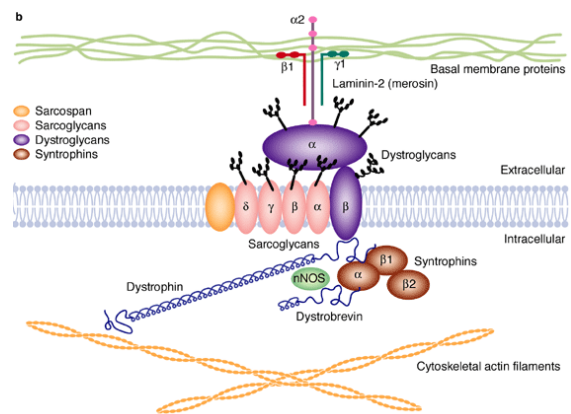


La proteína distrofina tiene una forma como de varilla con 24 secuencias de aminoácidos repetidas separadas por 4 regiones de bisagra. Sus dos extremos se llaman las regiones terminales N y C, y también existe una región con varias cisteínas, aminoácidos que contienen azufre. En la esquina derecha es una sección transversal del tejido muscular con las distrofinas en las membranas celulares hechas visible con anticuerpos fluorescentes.

**El tamaño del gen y la proteína distrofina.** La estructura de doble hélice del gen de la distrofina tiene 0.75 mm de largo. Junto con los otros cerca 20.000 genes humanos, que encajan en un núcleo celular de aproximadamente 0.01 mm diámetro ya que el material genético es muy cuidadosamente empaquetado. Una molécula de distrofina de extensión completa es mucho más corta que su gen, de 125 nm (= 0.000125 milímetros) de largo, 80,000 de ellas colocadas extremo con extremo en una línea recta cubriría sólo un centímetro. Y en un gramo de músculo, hay 114 mil millones moléculas de distrofina.

**El papel de la distrofina.** La distrofina es necesaria para la estabilidad mecánica de las células musculares.

Está ubicada en el interior de las membranas de la célula muscular. Uno de sus extremos, la *terminal-C*, está unido a un grupo de otras proteínas en la membrana, el **complejo distrofino-glicoproteico**, y el otro extremo, la *terminal-N*, se conectan a las estructuras contráctiles dentro de las células musculares. La parte central de la distrofina, dominio de varilla (rod domain), consta de cadenas de aminoácidos enroscadas que se doblan sobre sí mismas varias veces. Si el movimiento de contracción de la célula muscular fuerza a la proteína distrofina a cambiar su longitud, su estructura doblada permite que ella actúe como un resorte o como un *absorbedor de choques*. Por lo tanto, la distrofina transmite la energía mecánica producida por el "aparato de contracción" de actina-miosina hacia las membranas de la célula muscular y las estructuras fuera de ellas, el tejido conectivo y los tendones, en una forma bien balanceada que no los sobreestrese.



El complejo distrofino-glicoproteico.

**El complejo distrofino-glicoproteico.** La distrofina tiene más papeles: organiza la complicada estructura del complejo distrofino-glicoproteico y la ubicación de muchas otras proteínas. Asimismo, regula procesos biológicos como el mantenimiento de la cantidad correcta de calcio en las células y los que controlan el crecimiento de los músculos. Muchos de los detalles de estas interacciones intrincadas entre numerosos componentes en una célula viva aún se desconocen.

Los **chicos con Duchenne no tienen ninguna o muy poca distrofina en sus fibras musculares**. Cuando sus efectos de protección y organización están faltantes, la contracción muscular provoca la ruptura de las membranas de los músculos, y esto permite relativamente que grandes cantidades de calcio fluyan hacia las fibras. El exceso de calcio activa enzimas como la *calpaina* y otras *proteasas* que descomponen las proteínas musculares e inicia programas de muerte celular, apoptosis. Las consecuencias son una cadena de eventos como la inflamación y la activación de fibroblastos que conducen a la **fibrosis**, tejido cicatrizante que ralentiza la regeneración muscular y causa los típicos síntomas de los pacientes mayores de Duchenne.

Los chicos con la *distrofia muscular Becker* de progresión más lenta tienen una cantidad menor de lo normal de distrofina que también es a menudo más

corta de lo normal. Todavía puede cumplir su función, pero no puede funcionar tan eficazmente como la versión normal.

Pero no sólo los músculos esqueléticos sufren cuando la distrofina falta, sino también los músculos lisos y del corazón. Daño en los músculos del corazón produce **cardiomiopatía**, y la debilidad de los músculos lisos tiene muchas consecuencias, entre ellas la disminución de la capacidad de los vasos sanguíneos a relajarse, cuando aumenta el flujo sanguíneo, dando lugar a problemas respiratorios y otros, también el tracto gastrointestinal se ve afectado cuando la motilidad del intes-

tino se reduce. *Por lo tanto, el daño de un solo gen puede afectar a grandes partes del cuerpo.*

En la página 11, he añadido un capítulo bajo el epígrafe de **Introducción general sobre la reparación del músculo**, escrito por **Annemieke Aartsma-Rus** sobre muchos más detalles sobre el desarrollo y la evolución de la distrofia de Duchenne con la recomendación de que el salto de exón, que voy a describir a continuación, tendrá que ponerse en marcha tan pronto como sea posible después del nacimiento, cuando la mayoría de los músculos de un chico con Duchenne están todavía presentes.

## Salto de Exón

**La tarea de la investigación.** Un chico *sano* de 5 años de edad de un peso de 30 kg tiene cerca de 12 kg de músculos que contienen 1.5 cuatrillones ( $1.5 \times 10^{15}$ ) de moléculas de distrofina. Un chico de 5 años de edad con *Duchenne* ha perdido el 30% de sus músculos quedándole sólo 8 kg de masa muscular. Y estos músculos restantes contienen sólo trazas o nada de distrofina en absoluto, porque la información del gen dañado no se puede leer correctamente para la biosíntesis de la proteína. El pequeño número de células musculares, menos del 3% del total, se llaman **fibras revertantes**, que contienen trazas de distrofina normal que aparecieron por salto de exón espontáneo.

No se sabe cuánto distrofina es necesaria para prevenir la progresión de la enfermedad, pero parece que algo es mejor que nada (1). Las nuevas distrofinas no tienen que tener exactamente la misma longitud y forma de las normales en el músculo, pueden ser más cortas, pero deben ser capaces de funcionar correctamente.

**El salto de exón, una terapia genética para Duchenne.** En una discusión a mediados de los años 90, **Gert-jan van Ommen** de la Universidad de Leiden en Holanda, me explicó cómo una terapia genética podría realizar esta tarea por largo tiempo sin efectos secundarios graves. Ahora es llamada **salto de exón** (exon skipping, omisión de exón) y se ha desarrollado durante los últimos 15 años por varios grupos de investigación, sobre todo en Japón, Australia, Reino Unido y los Estados Unidos a tal punto que este procedimiento no sólo se probó en ratones y perros enfermos, si no también se está haciendo en pacientes con Duchenne.

El salto de exón significa "saltar a través de los exones". Los exones son las secciones activas de un gen. En el gen de la distrofina de la mayoría de los *niños Duchenne*, uno o varios exones faltan, *deleciones*, o están duplicados, *duplicaciones*, o tienen errores en la secuencia de sus letras, *mutaciones puntuales*. Estas mutaciones cambian el marco de lectura en los niños enfermos por una o dos letras del **marco normal** a una situación anormal **fuera del marco**, y un **codón de parada prematuro** aparece poco después de la mutación. El proceso de lectura de la información genética para la biosíntesis de proteínas se interrumpe en una "señal de parada o alto" para que no pueda ser hecha distrofina. Estos errores pueden ser corregidos, es decir, *la síntesis de proteínas se puede iniciar de nuevo*, si uno o más de los exones vecinos todavía pre-

sentes en el ARNpre-m son bloqueados de tal manera que el mecanismo que une, empalma, a los exones, salta por encima de ellos o los omite, y por lo tanto ellos no se incluyen más en el ARNm (2).

Para este bloqueo, **oligonucleótidos en antisentido** son necesarios, abreviados **oligos en antisentido** o simplemente **oligos** en este informe. Estos son *pequeños trozos del material genético ARN*, de 20 a 30 letras genéticas de largo, con una secuencia especial, de modo que se pueden unir por la unión complementaria Watson-Crick para que se ajusten exactamente a las secuencias en el interior del exón o exones que deben saltarse u omitirse y evitar así su empalme con los otros exones.

**¿Dónde ocurre el salto de exón?** Como se ha explicado antes, las 2.2 millones de letras genéticas del gen de la distrofina en el núcleo de la célula muscular **son transcritas**, copiadas, al ARNpre-m. Las secuencias de los muy largos intrones se cortan y eliminan entonces, y solamente las secuencias de los 79 exones - juntos de sólo 11,000 letras de largo - están unidos entre sí, están **empalmados**, en un ARNm mucho más corto. El *salto de exón ocurre durante este proceso de empalme*. El ARNm con los exones eliminados y saltados sale del núcleo y migra hacia los ribosomas en el citoplasma. Allí, la información genética del ARNm es leída y **traducida** en el lenguaje de las proteínas, en la secuencia de aminoácidos de la distrofina producida.

**Duchenne se convierte en distrofia Becker.** Debido a la falta de exones - aquellos delecionados por la mutación y aquellos omitidos adicionalmente -, los bloques de construcción, los aminoácidos, determinados por esos exones faltantes también faltarán en la nueva distrofina creada. Así, la nueva distrofina tendrá una cadena de aminoácidos la cual tiene menos de la cantidad normal de 3,685 aminoácidos. Pero a menudo será todavía ser capaz de proteger en cierta medida las membranas de las células musculares de la tensión mecánica de la contracción muscular. Por lo tanto, los síntomas de la enfermedad serán más leves, la degeneración muscular procederá más lentamente, y la expectativa de vida debería aumentar considerablemente a lo normal en algunos casos. La distrofia Duchenne entonces será cambiada a la variante leve de esta enfermedad, la **distrofia muscular Becker**.



**Una terapia pero no una cura todavía.** El objetivo del salto de exón es convertir la enfermedad en una forma más suave, para frenar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto el salto de exón *no es una cura, es sólo una terapia.*

Con este método de tecnología genética, el gen dañado por sí mismo no será reemplazado ni reparado, sólo el mecanismo de procesamiento de su información será corregido.

### Detalles moleculares del salto del exón 51.

Después de la explicación general del salto de exón y cómo y dónde funciona, le estoy mostrando aquí los detalles moleculares de un ejemplo de salto de exón: cómo el oligo en antisentido PRO051, utilizado por Prosensa, salta el exón 51 y así restaura el marco de lectura que se cambió por la delección (falta) del exón 50 en el gen de la distrofina de un niño con Duchenne. En esta y otras explicaciones, estoy usando la palabra *letra genética* por los nombres más científicos *base o nucleótidos*, y *palabra genética* para los nombres científicos *tripleta o codón*.

Al principio yo le mostré parte de las secuencias de letras de los exones 50 y 51 del ARNm *del gen normal de la distrofina*, así como el final del exón 49 y el inicio del exón 52. Los guiones sólo muestran el *marco de lectura* y las líneas verticales los bordes de los exones, pero, en realidad, las palabras genéticas que consiste de 3 letras van

una tras otra, sin espacios y sin fronteras visibles. Por razones de espacio, he dejado fuera 29 palabras genéticas en el exón 50, y 52 palabras en el exón 51. Esto está indicado por 3 guiones. Para mostrar lo que las palabras genéticas significan, he escrito debajo de cada palabra la abreviatura del nombre del aminoácido que es codificado por esta palabra. Pero los *aminoácidos no están unidos a los codones del ARN*. La traducción de los codones en aminoácidos se produce en los ribosomas donde son conectados entre sí para formar la proteína distrofina. Las tres letras que aparecen en rojo son una *oculta* señal de alto o parada, UGA, que más tarde se convierte en una señal de alto real. El exón 50 finaliza después de la primera letra de la última palabra, que luego se completa como UCU, es decir, serina, por las letras primera y segunda del exón 51, que se muestra en azul.

<b>Final Exón 49</b>   <b>Inicio Exón 50</b>	<b>Final Exón 50</b>   <b>Inicio Exón 51</b>
---CAG-CCA-GUG-AAG   AGG-AAG-UUA-GAA---	---AUU-GGA-GCC- <b>U</b>   <b>CU</b> -CCU-ACU-CAG-ACU-
gln pro val lys   arg lys leu glu	ile gly ala ser   pro thr gln thr

codón de parada oculto

---GUU-ACU-CUG- <b>UG-ACA</b> -CAA---	---AAA-CUA-GAA-AUG-CCA-UCU-UCC-UUG-AUG-UUG-GAG---
val thr leu val thr gln	lys leu glu met pro ser ser leu met leu glu

<b>Final Exón 51</b>   <b>Inicio Exón 52</b>
---AUG-AUC-AUC-AAG-CAG-AAG   GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
met ile ile lys gln lys   ala thr met gln asp leu

Cuando el exón 50 esta delecionado (faltante) en el gen y, después del empalmado, también en el ARNm, el exón 49 es seguido directamente por el exón 51. Esto causa el cambio del marco de lectura en el exón 51 por una letra a la derecha, con la consecuencia de que 8 palabras incorrectas aparezcan hasta que, finalmente, el desplazamiento del marco de lectura convierte la señal de parada oculta en una palabra de tres letras, que es ahora la *señal prematura de*

*parada* UGA. Las palabras desplazadas y sus aminoácidos equivocados ahora se muestran en rojo. Estas 8 palabras erróneas causan la inserción de 8 correspondiente aminoácido incorrectos en la cadena de aminoácidos en crecimiento de la proteína. En la nueva señal de parada la síntesis de distrofina en los ribosomas se interrumpe antes de tiempo, quedándose incompleta, se destruye, y la *distrofia muscular Duchenne* se desarrolla.

<b>Final Exón 49</b>   <b>Inicio Exón 51</b>
---CAG-CCA-GUG-AAG   <b>CUC-CUA-CUC-AGA-CUG-UUA-</b>
gln pro val lys   <b>leu leu leu arg leu leu</b>

codon de parada activo

oligo en antisentido

<b>-CUC-UGG-<u>UGA</u>-CAC AAG---</b>	<b>---AAC-<u>UAG-AAA-UGC-CAU-CUU-CCU-UGA</u>-UGU-UGG---</b>
<b>leu trp <b>Alto!</b></b>	<b>Secuencia ESE</b>

<b>Final Exón 51</b>   <b>Inicio Exón 52</b>
--- <b>AU-GAU-CAU-CAA-GCA-GAA-G</b>   <b>GC-AAC-AAU-GCA-GGA-UUU---</b>

Con el fin de saltar u omitir el exón 51, el oligo en antisentido PRO051, mostrado en azul, se añade para restaurar el marco de lectura. La secuencia de sus 20 letras genéticas está diseñada de tal manera que es complementaria a las 20

letras en el exón 51, subrayado en rojo, que pertenecen a una *secuencia potenciadora de empalme exonico-*, ESE, la cual es importante para el proceso normal de empalme. El PRO051 se adhiere a esta secuencia ESE muy concreta-

mente, y en ningún otro lugar, y por lo tanto evita la inclusión del exón 51 en el ARNm del gen *mutado*. Este exón es por lo tanto *saltado* durante el proceso de empalme. Y cuando el exón 51 ya no está allí y junto al exón 50 que

no estaba ahí antes, entonces el exón 52 continúa directamente después del exón 49. El marco de lectura no está alterado más porque el exón 49 termina y el exón 52 empieza con una palabra genética completa:

**Final Exón 49 | Inicio Exón 52**  
---CAG-CCA-GUG-AAG | GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---  
gln pro val lys | ala thr met gln asp leu

No hay señal de parada prematura que aparezca en el exón 52 o más adelante, pero 77 palabras genéticas de los exones 50 y 51 en el normal, "saludable" ARNm, no están presentes por el salto en el ARNm "rescatado", y los 77 aminoácidos determinados por estas palabras también faltarían en la proteína distrofina. En lugar de 3,685 aminoácidos solo tendrá 3,608, 2% menos que la distrofina normal. Fal-

tarían en la parte central de la distrofina acortada. Como no tienen una función importante allí, la distrofina más corta podría probablemente todavía cumplir su función como amortiguador para proteger las membranas del músculo en cierta medida y por lo tanto retrasar el rápido deterioro muscular de Duchenne al más lento de la distrofina muscular Becker.

## Oligo-ribonucleótidos en antisentido, los fármacos potenciales de salto de exón.

**Diferentes tipos de oligos en antisentido.** Para los experimentos con animales y los primeros ensayos clínicos de salto de exón, realizado por Prosensa y Sarepta, dos tipos de oligos en antisentido se utilizaron. Ellos tienen la estructura básica de los ácidos ribonucleicos, los ARNs, que son, además del ADN, el segundo ácido nucleico natural importante.

El ARN consiste en largas cadenas de unidades alternas de ribosa, una sustancia similar al azúcar, y ácido fosfórico. Cada unidad de ribosa lleva unida una de las 4 letras genéticas, adenina (A), guanina (G), citosina (C), y, en este caso, uracilo (U), que es similar a la letra timina (T) en el ADN. Las secuencias de estas letras son importantes para la función de los muchos tipos de ARNs cortos y largos, ya que se pueden unir a las secuencias complementarias del ADN y otros ARN por la regla de unión de Watson-Crick: G con C y de A con U (o T en el ADN). Esto funciona como una cremallera muy eficiente con 4 diferentes tipos de dientes.

Los fármacos potenciales de salto de exón, **los oligos en antisentido**, son piezas cortas de ARN de sólo unas 20 a 30 letras genéticas. Estas secuencias cortas son suficientes para garantizar que se adhieran sólo a las secuencias de ARN que están destinadas a bloquear, a pesar que nuestro ADN completo de todos los 46 cromosomas en cada célula tiene una secuencia de ADN de más de 3 mil millones de letras, que aproximadamente 1%, o 30 millones, pertenecen a nuestros aproximadamente 20,000 genes y por lo tanto se copian en el ARN cuando se necesitan. Esto es muy importante, ya que un oligo en antisentido contra Duchenne sólo se le permite interferir con la información genética del gen de la distrofina en el cromosoma X del niño enfermo y no con el de cualquier otro gen. Cualquiera de ellos *fuera del objetivo vinculante* para cualquier otra estructura genética podría producir efectos secundarios graves cuando el medicamento de salto de exón se administra a un niño con Duchenne para el resto de su vida extendida.

Los fármacos potenciales, los oligos en antisentido, tienen que sobrevivir el mayor tiempo como sea posible en la corriente sanguínea después de la inyección. Deben tener tiempo para cruzar los vasos sanguíneos a las células de todos los músculos. Ellos se tienen que introducir en mu-

chos núcleos en cada célula y realizar su tarea mediante el bloqueo de uno o más exones del ARNpre-m de la distrofina mutado durante el proceso de empalme que conduce al ARNm rescatado pero más corto de lo normal. Si los oligos entrantes tuvieran la estructura normal del ARN, serían reconocidos como extraños por las enzimas de ácidos nucleicos que están especializados en la destrucción de ellos. Por esta razón, los oligos tienen que ser químicamente protegidos de modo que estas enzimas puedan destruirlos sólo lentamente o nada en absoluto.

Los científicos Holandeses están utilizando **2'O-metilfosforo-tioatos**, llamados *2'O-metilos* en este informe. Ellos tienen un grupo metilo, un carbono con tres átomos de hidrógeno, en el oxígeno del segundo carbono de las unidades de ribosa y un átomo de azufre en lugar de uno de los átomos de oxígeno de los puentes de fosfato. Los **morfolinos** usados por Sarepta tienen uno de los oxígenos del fosfato reemplazado por un grupo dimetil amido, un nitrógeno con dos grupos metilo, y las unidades de ribosa enteras son reemplazadas por anillos morfólicos, anillos de seis miembros, cada uno compuesto de 4 átomos de carbono, 1 de oxígeno y 1 de nitrógeno.

Le muestro aquí la estructura química de estos dos tipos de oligos en antisentido protegidos con sólo dos de sus letras genéticas indicadas como "bases". Los átomos de carbono no se muestran, se asientan en las esquinas y los extremos de las líneas en estas estructuras abreviadas, y cada átomo de carbono lleva uno o más átomos de hidrógeno que no se muestran tampoco. Un tercer tipo de oligo en antisentido, llamado **morfolino vivo**, se describe en el párrafo sobre salto de multi exón en la página 19.

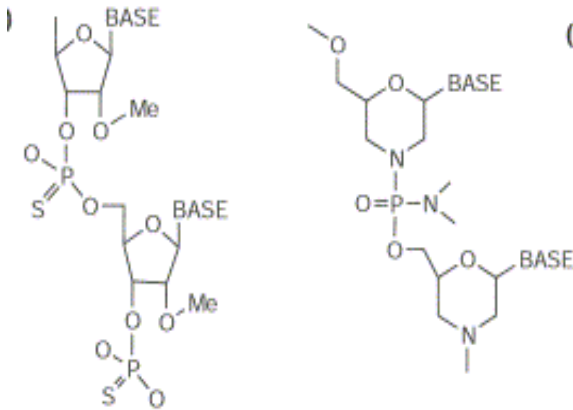
Para la omisión del exón 51, el oligo 2'O-metil en antisentido utilizado en los ensayos realizados por las empresas Prosensa y GlaxoSmithKline (GSK), PRO051, ahora llamado **Drisapersen**, tiene 20 letras genéticas con la secuencia:

UCUUUACGGUAGAAGGAACU

El oligo morfolino en antisentido utilizado en los ensayos patrocinados por Sarepta (anteriormente AVI), primero llamado AVI-4658, y ahora **Eteplirsén**, tiene 30 letras,

que incluyen las 20 letras del oligo holandés (subrayadas):

GAUCUUUACGGUAGAAGGAACUACAACCUC



Oligo 2'O-Metil en antisentido    Oligo Morfolino en antisentido

Las moléculas de estos oligos en antisentido son estructuras químicas bastante complicadas. El Drisapersen consta de 699 átomos y el Eteplirsén de más de un millar. Esto muestra que estos fármacos potenciales para nuestros chicos con Duchenne son muy diferentes de las moléculas de fármacos "normales" más pequeñas. Ellos se pueden hacer con cualquier secuencia de letras deseadas en máquinas automáticas en los laboratorios donde se realizan los experimentos pre-clínicos en cultivos de tejidos y con animales. Cuando un oligo prometedor ha sido encontrado en estos experimentos y ensayos clínicos en niños con Duchenne están previstos, estos fármacos potenciales deben ser fabricados bajo estrictas normas y reglamentos, así *como reactivos de calidad clínica* por parte de empresas especializadas.

**Diferentes propiedades de los oligos en antisentido.** Las moléculas de los oligos en antisentido no son tan grandes como las proteínas y ácidos nucleicos, por lo tanto, se eliminan más rápidamente del cuerpo a través de los riñones. Los 2'O-metilos llevan cargas eléctricas y por lo tanto se unen a diferentes proteínas en la sangre, para que no se excreten con la orina tan rápido como los morfolidos que son eléctricamente neutros. Como se ha demostrado en experimentos con ratones, la vida media en el suero sanguíneo, es decir, el tiempo medio que los oligos se eliminan del suero, es de aproximadamente 4-5 semanas para los 2'O-metilos, mientras que para los morfolidos, es sólo alrededor de 2 - 3 horas. Por lo tanto los 2'O-metilos tienen mucho más tiempo que los morfolidos para ser absorbido por las células del músculo donde pueden realizar su actividad terapéutica. La situación en los seres humanos es probablemente similar ya que en los primeros estudios clínicos en pacientes con estos dos tipos de oligos en antisentido, como estaré explicando más tarde, dosis mucho más altas y tiempos más largos de tratamiento de morfolidos se necesitaron que mediante el uso de los 2'O-metilos para la obtención de resultados similares.

Ya que un tratamiento de salto de exón muy posiblemente tiene que ser administrado durante toda la vida de

los chicos, *inyecciones subcutáneas* - debajo de la piel - serán más prácticas que las inyecciones intravenosas en la corriente sanguínea, debido a que las inyecciones subcutáneas se pueden hacer en casa por personas no preparadas o el propio paciente, mientras que la inyección en una vena que requiere visitas frecuentes al consultorio de un doctor médico. Por esta razón, los 2'O-metilos solubles en agua ya están siendo aplicados por vía subcutánea en sus ensayos clínicos, pero los morfolidos no pueden ser disueltos en agua a dosis elevadas y por lo tanto requieren inyecciones o infusiones en un vaso sanguíneo.

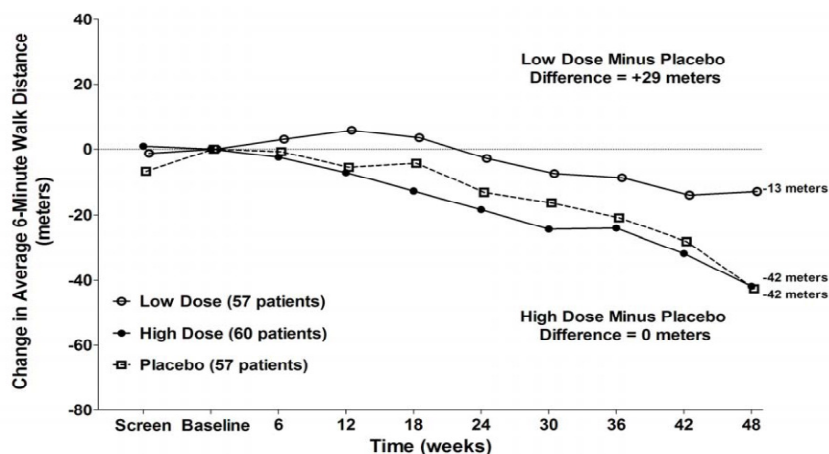
Como se ha explicado antes, las células musculares de niños con Duchenne no tienen distrofina o muy poca debajo de sus membranas celulares, y las muchas proteínas diferentes que están asociadas con la distrofina faltan también. Así, las membranas no tienen sus "amortiguadores" que protegen las membranas normales de la tensión mecánica durante las contracciones musculares. Esto significa que con el tiempo, las membranas se rompen y tienen grietas y agujeros por lo que algunos de los contenidos de las células están filtrándose en la corriente sanguínea, como por ejemplo la enzima creatina kinasa, CK, cuya concentración en la sangre, entonces se incrementa dramáticamente y da la primera indicación de que el muchacho tiene una distrofia muscular.

Por otra parte, las sustancias del exterior pueden atravesar las membranas dañadas mucho más fácil y más rápido que las membranas celulares intactas del músculo. Así, para una técnica como el salto de exón que necesita que sus compuestos activos entren en las células de los músculos lo más rápido y eficiente como sea posible, esta membrana defectuosa es una ventaja. De hecho, se ha dicho que la distrofia muscular Duchenne abre las membranas celulares para dejar a los fármacos entrar porque "quieren ser curadas".

**¿Cómo medir el efecto terapéutico de un fármaco posible para Duchenne?** En los ensayos clínicos de salto de exón se tiene que probar que los oligos en antisentido realmente son capaces de aminorar la degeneración de los músculos distróficos en niños con Duchenne durante muchos años. Una forma de hacer esto es usar la **prueba de caminata de seis minutos, 6MWT**, que es llamada como *medida de resultado* que es aceptada por la FDA y EMA para medir el efecto del tratamiento sobre la función muscular. Chicos con Duchenne que todavía pueden caminar, se les pide que caminen, no correr, sin ayuda tan rápido como les sea posible durante 6 minutos, por ejemplo hacia atrás y adelante a través de un pasillo del hospital. La distancia recorrida en distintos días antes de recibir las primeras inyecciones es su base de 6MWT promedio. Un niño de 10 años puede caminar unos 300 a 400 metros en 6 minutos. En diferentes momentos durante el estudio, por ejemplo cada 6 semanas, se repite la prueba y por lo general muestra que la distancia recorrida disminuye a causa de la atrofia muscular progresiva. Esta disminución en metros en diferentes puntos de tiempo se representa gráficamente en un diagrama que lo ilustra a continuación, la disminución de la función muscular y por lo tanto el progreso de la enfermedad. Con el fin de mostrar los resultados combinados para un mayor número de pacientes, la línea base me-

dia de la 6MWT para todos los pacientes en el grupo se fija en cero desde donde comienzan las curvas que se obtienen con diferentes dosis y los resultados del grupo con placebo. Los puntos en las curvas representan los cambios medios en metros de todos los niños en un grupo en momentos diferentes, los cuales, a causa de la distancia decreciente son en su mayoría negativos.

El propósito de esta presentación gráfica es determinar, y hacer claro de ver, si el tratamiento en el ensayo clínico tiene el efecto deseado o no. Pero para hacer esto de forma fiable y objetiva sin ningún tipo de influencia "humana", el



Tal presentación gráfica, que incluye datos de un grupo de placebo, todavía no existe para ninguno de los ensayos clínicos de salto de exón-. Tendremos que esperar a la finalización de la gran fase III de ensayo para saltar el exón 51 y la interpretación de todos los datos antes de que se conozca, probablemente no antes del final de 2013.

Sin embargo, una presentación con los datos de placebo existen para el ensayo clínico de fase IIb de **Ataluren**, también conocido como PTC124, que fue interrumpido en marzo de 2010, porque la medida de resultado primaria predeterminada no se cumplió. Los resultados de la prueba de caminata de 6 minutos para 174 pacientes después de 48 semanas de tratamiento con dos dosis diferentes y placebo fueron liberados en abril de 2010 (3), así que puedo mostrarlo a usted aquí como un ejemplo de cómo los datos de ensayos clínicos pueden ser presentados.

La línea de en medio se obtuvo con los chicos en el grupo de placebo. La línea superior muestra los resultados de los niños que recibieron la menor de dos dosis, 40 mg/kg/ semana de Ataluren, y la línea inferior los resultados con los niños que recibieron la dosis más alta de 80 mg/kg/ semana. Se puede ver fácilmente que las líneas para el placebo y la dosis más alta son muy similares, mientras que la línea para la dosis más baja la disminución de la distancia recorrida en 6 minutos no disminuyó tan rápidamente como para los otros dos grupos. Por lo tanto, parece que la dosis más baja fue efectiva para desacelerar la enfermedad dentro de un año en comparación con los niños que no fueron tratados, mientras que la dosis más alta no cambió el curso de la enfermedad. Volveré a este resultado inesperado e inexplicable todavía y sus consecuencias en la segunda parte de este informe. Y en cuanto a los resultados de la fase III de estudio contra el exón 51 son analizados y publicados de manera similar, los pondré en una versión ac-

ensayo se tiene que hacer con método *doble ciego*, lo que significa que alrededor de un tercio o la mitad de las veces, los pacientes en el estudio no recibirán el fármaco activo, si no un *placebo*, un material como, por ejemplo, azúcar, que se parece al fármaco, pero no tiene ningún efecto médico. La decisión de si un paciente recibe el medicamento o el placebo se hace por casualidad - el niño se dice que es asignado al azar a un grupo - y ni los padres o los pacientes ni el personal clínico o de laboratorio saben antes de que la prueba se ha completado y analizado, a qué grupo pertenece un paciente.

tualizada de este informe, si soy capaz de seguir escribiendo informes de investigación.

**Las mutaciones del gen de la distrofina.** De acuerdo a la publicación por **Annemieke Aartsma-Rus** y colegas en 2006 (4), las **deleciones** (falta) de uno o varios exones constituyen el 72% de todas las mutaciones. Las **duplicaciones** de uno o varios exones se encuentran en el 7% de todos los pacientes. **20%** tienen **mutaciones puntuales**, es decir, muy pequeñas deleciones o inserciones de una o varias letras genéticas, y en el **1%** restante, **varias mutaciones raras** como las que perturban los sitios de empalme o reordenan gran parte de la estructura del gen.

**La regla del marco de lectura.** Los autores concluyen que en 91% de los pacientes la regla del marco de lectura es lo que manda, significa que las **mutaciones que provocan pérdida del marco de lectura causan Duchenne y las mutaciones que mantienen el marco causan distrofia muscular Becker**. Dice también que en la mayoría de los pacientes, cuyas mutaciones parecen ser excepciones a la regla del marco de lectura, la estructura de sus ARNm puede seguir esta regla. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la secuencia de ARNm no se determina cuando un análisis genético se realiza. Antes que un tratamiento de salto de exón inicie, puede ser aconsejable confirmar en un experimento de cultivo de tejidos que este tratamiento realmente produce un ARNm dentro del marco de lectura.

**Aplicabilidad del salto de exón.** Aunque todos los pacientes con Duchenne tienen más o menos similares síntomas clínicos, hay muchas diferentes causas de su enfermedad, porque las mutaciones del muy grande gen de la distrofina pueden ocurrir en muchos sitios diferentes. Por



lo tanto, el salto de exón es **específico de la mutación**. Esta será una **terapia personalizada**. Cada paciente tendrá un oligo en antisentido especializado, pero cada oligo en antisentido puede a menudo ser usado para un grupo de pacientes con diferentes mutaciones que necesitan saltarse u omitírsele uno o más exones en particular.

**Annemieke Aartsma-Rus** y sus colegas han enlistado la aplicabilidad para saltar uno o dos exones en pacientes con Duchenne con deleciones, mutaciones puntuales y duplicaciones en las páginas de Distrofia Muscular Duchenne de Leiden (5). 130 grupos enlistados de pacientes necesitan el salto de uno o dos exones particulares de acuerdo a su porcentaje relativo a todos los pacientes con Duchenne con todo tipo de mutaciones. Los autores hallaron también que el 83% de todos los pacientes con Duchenne tienen mutaciones que potencialmente pueden ser reparadas por el salto de exón. El 17% restante tienen mutaciones que son demasiado difíciles de restaurar con el salto de exón. Todavía se beneficiarían de terapias farmacológicas u otras, que no son específicas a la mutación y podrían así beneficiarse todos los pacientes. En la segunda parte de este informe, voy a resumir los resultados de estos proyectos de investigación.

La lista de los 130 grupos de pacientes comienza con los once siguientes, entre los que se encuentran también aquellos cuyos fármacos de salto se desarrollan primero en los próximos años por las empresas de GSK/Prosensa y Sarepta.

Posición	Exón a ser saltado	% de todos los pacientes
1	51 <b>51</b> 51	13.0
2	45 <b>45</b> 45	8.1
3	53 <b>53</b> 53	7.7
4	44 <b>44</b>	6.2
5	46	4.3
6	52 <b>52</b>	4.1
7	50 50	4.0
8	43	3.8
9	6+7	3.0
10	8	2.3
11	55 <b>55</b>	2.0

**Rojo:** Lista de prioridades de Prosensa/GSK, 41.1%

**Azul:** Lista de prioridades de Sarepta, 32.8%

Como se muestra en esta breve lista, el 13,0% de todos los pacientes necesita la omisión de su exón 51, por lo tanto el oligo en antisentido contra el exón 51 es el fármaco potencial de salto para el grupo más grande de todos los pacientes con Duchenne. Por esta razón, los primeros ensayos clínicos de salto de exón completados y aún en marcha, están dirigidos a este exón en particular para ser saltado y ayudar a este grupo más grande de pacientes tan pronto como sea posible. La lista completa ha sido publicada en Marzo de 2009 (5).

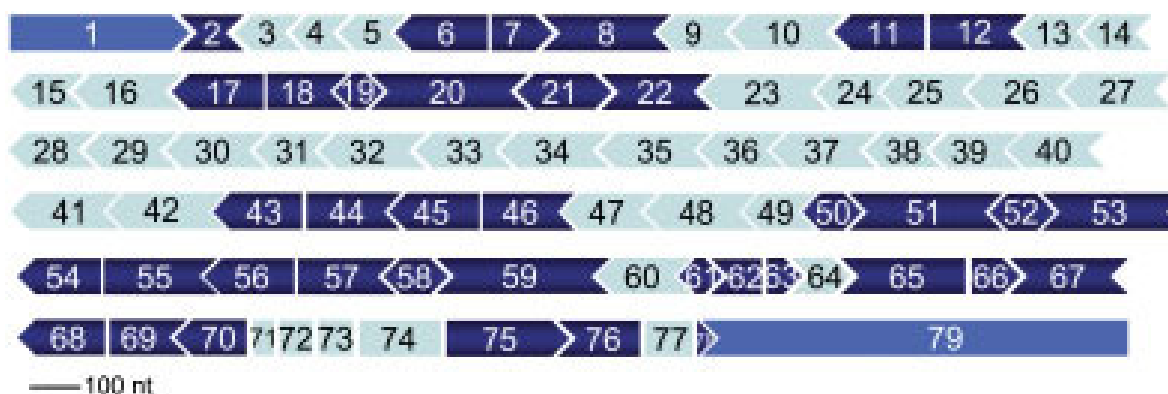
**¿El salto de exón será una terapia para mi hijo?** Muchas familias Duchenne de todo el mundo me están preguntando esta cuestión. Así que voy a decirte como usted puede saber cual sera el fármaco potencial de salto para a su hijo.

Debido a que el salto de exón es una **técnica específica a la mutación**, el primer paso es saberse exactamente la mutación en el gen de la distrofina de su niño afectado, que puede ser determinada mejor en un moderno laboratorio de genética con el método MLPA (ligado múltiple dependiente de sonda de amplificación), que analiza todos los 79 exones en niños con Duchenne y sus madres y otras mujeres de la familia. Esta y otras técnicas de diagnóstico se resumen en la segunda parte de este informe.

Con la mutación conocida - deleción, duplicación o mutación puntual - usted puede examinar la secuencia genética de las 11,040 letras genéticas de la combinación de los 79 exones del ARNm de la distrofina, que contiene las instrucciones para el montaje de los 3,685 aminoácidos de la proteína distrofina normal. Usted puede descargar las 15 paginas con esta secuencia de las Páginas de Distrofia Muscular de Leiden en Internet: [www.dmd.nl/seqs/murefDMD.html](http://www.dmd.nl/seqs/murefDMD.html). De esta secuencia se puede determinar si una mutación en particular cambia o mantiene el marco de lectura después de la mutación, por lo tanto, esta información genética predice una distrofia Duchenne o Becker para su hijo. Al mirar en la frontera de las secuencias de los exones, también puede determinar que exón o exones deben ser saltados u omitidos para que el marco de lectura fuera del marco vuelva de nuevo al marco.

Hay otra manera más fácil de encontrar el exón o exones a ser saltados si se conoce la mutación del gen de la distrofina. La disposición de los 79 exones en el ARNm se puede ver en la siguiente imagen que he obtenido de

**Annemieke Aartsma-Rus:**



Para saber que exón debe saltarse, tache el exón o exones deletados (faltantes) y vea si el exón antes o después de la deleción al ser quitado, ser saltado, el borde derecho del exón antes del exón deletado se ajusta al borde izquierdo del exón después del exón saltado.

Por ejemplo, la deleción de los 8 exones del 45 al 52 significa que los dos exones 44 y 53, flanqueando la deleción, no encajan juntos. Pero el salto del exón 53 producirá un ajuste normal entre el final del exón 44 y del inicio del exón 54. También vera de inmediato que la deleción de los exones del 44 al 50 pueda ser reparada si se saltan ambos exones 43 y 51, de forma que los exones 42 y 52 se ajusten entre sí. También se dará cuenta de que una deleción, por ejemplo, del exón 44, que produce el no ajuste de las fronteras del exón, significa que un marco de lectura desplazado conduce Duchenne, mientras que una deleción, por ejemplo, del exón 48 al 51, produce que los exones se ajusten y no cambie el marco de lectura, y que debe significar distrofia Becker. Este procedimiento funciona también para las duplicaciones y mutaciones puntuales.

Esta imagen muestra el tamaño relativo de los exones, la línea en la parte inferior izquierda da la medida de 100 nucleótidos, letras genéticas. Los exones azul claro están dentro del marco de lectura, lo que significa que si están deletados (faltantes) o tienen que ser saltados, cuando contienen una mutación puntual, esto no cambia el marco de lectura. Los exones azul oscuro están fuera del marco de lectura, y si están deletados pueden ser reparado al saltarse uno o dos exones vecinos para que los bordes de los exones restantes se ajusten de nuevo.

La tercera vía, la más fácil, es mirar la lista de salto de exón en la tesis doctoral de **Annemieke Aartsma-Rus** en la que se puede leer directamente que exón o exones deben ser saltados cuando se conocen los detalles de la mutación de su hijo. Estas listas se pueden ver en Internet en:

Deleciones: [www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20deletions.pdf](http://www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20deletions.pdf);

Duplicaciones: [www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20duplications.pdf](http://www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20duplications.pdf) ;

Mutaciones puntuales: [www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20point%20mutations.pdf](http://www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20point%20mutations.pdf) .

Como un ejemplo, aquí está una selección de 10 entradas en la lista de deleciones:

Exones deletados	Exón(es) a saltar
40 – 43	44
43 – 45	46
43 – 50	51
43 – 52	53
44	43 or 45
44 – 50	43+51
46 – 47	45
46 – 52	45+53 or 53+54
48 – 50	51
51 – 53	50

Si conoce la mutación exacta que su chico con Duchenne tiene en su gen de la distrofina, y se han encontrado que exón o exones deben ser saltados en su ARNm, y han entendido mis explicaciones, usted debe entender que esto *no garantiza* que los severos síntomas de Duchenne cambiaran a síntomas más leves de distrofia Becker, si él fuera tratado con su fármaco de salto de exón "personal" como se muestra. Todo lo que puedo decir es que un determinado salto cambiará el marco de lectura del mensaje genético en el ARNm de fuera del marco al marco de nuevo. No dice que los mensajes genéticos dentro del marco de lectura producirán una distrofina "Becker" en todos los casos, porque la regla del marco de lectura tiene muchas excepciones.

Las razones de estas excepciones no son totalmente entendidas en cada caso. Por ejemplo, las fronteras de las deleciones en el gen de la distrofina no necesariamente corresponden a las fronteras de los exones, pero podría encontrarse en algún lugar dentro de los a menudo muy grandes intrones entre los exones. Estas fronteras de la deleción normalmente no son determinadas por los habituales métodos de prueba genética, y pueden ser diferentes en pacientes con la misma deleción. Debido a que los intrones contienen secuencias que son importantes para la regulación de los genes, su presencia o ausencia puede producir diversos síntomas de la enfermedad. Por otro lado, la proteína distrofina tiene una estructura con regiones de diferente importancia. Algunas deleciones junto con los exones saltados pueden, en algunos casos, producir una estructura de la proteína alterada que no permite el correcto funcionamiento de la distrofina acertada.

Por lo tanto, una terapia de salto de exón en muchos casos produce una proteína que reduce los síntomas distróficos, pero *puede haber sorpresas* que sólo se manifiestan durante un tratamiento actual.

**Mutaciones que no pueden ser reparadas por el salto de exón.** Como he dicho antes, el 17% de todos los niños con Duchenne tienen mutaciones que no pueden ser tratadas por el salto de exón. Por ejemplo, cuando sea el primero o el último exón el deletado, o cuando las mutaciones están en la región de los exones 64-70, que son necesarios para la parte esencial rica en cisteína de la proteína, o cuando las deleciones son grandes e implican la unión con la actina o una parte importante de la parte central de la proteína, o cuando hay grandes reordenamientos de secuencias como inversiones y trans-localizaciones, donde se mezcla el mensaje genético hasta una forma incontrolable.

Por lo tanto, si los resultados de las pruebas genéticas de su hijo no le permiten encontrar el exón o exones a ser saltado mediante el uso de mis instrucciones, o si tiene otras preguntas acerca de lo que se podía hacer por él, por favor, **escriba un e-mail a mí**, en inglés, alemán, francés o español, [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de), y voy a responder lo antes posible, pero sólo en inglés o alemán. El escribir en francés o español sin demasiados errores es demasiado difícil para mí.

### ¿Cómo son hechos los fármacos de salto de exón?

Ahora, que usted, después de leer mis explicaciones, sabe qué tipo de salto de exón podría ser una terapia para su

hijo, voy a explicar cómo estos fármacos potenciales se están realizando. Hay tres partes de este capítulo: En primer lugar, Qué tipos de ensayos clínicos tienen que hacerse, después, cuales medicamentos están siendo desarrollados en primer lugar, y por último, que ensayos clínicos se han terminado ya, cuáles se están realizando y cuáles están previstos para un futuro próximo.

**¿Qué tipos de ensayos clínicos tienen que hacerse?** La Administración Federal de Fármacos, **FDA**, en los Estados Unidos, la Agencia Europea de Medicamentos, **EMA**, en Londres, y otras agencias de regulación requieren el "normal" desarrollo de un fármaco clásico el cual tiene que pasar por las siguientes etapas:

**Fase pre-clínica** con estudios de laboratorio y en animales para evaluar la seguridad del fármaco potencial, la actividad biológica, y la mejor manera de dársela a un paciente.

**Fase I de prueba clínica** con 20 - 100 voluntarios sanos para determinar su seguridad en humanos.

**Fase II de prueba clínica** con 100 - 500 pacientes para evaluar la dosis óptima, seguridad y eficacia.

**Fase III de prueba clínica** en 1,000 – 5,000 pacientes para confirmar la seguridad del fármaco y la eficacia cuando se usa por un largo tiempo.

El costo de las tres fases de ensayos clínicos de investigación puede ser de hasta 500 millones de US\$ dólares para un medicamento, y puede tomar hasta 15 años desde la primera idea de un nuevo fármaco hasta su aprobación de venta.

Las normas reguladoras fueron hechas en una época cuando los enfoques de investigación específicos a un paciente como el salto de exón no se habían realizado aún. Para obtener un fármaco para Duchenne personalizado a través de estas etapas, varios retos se encuentran y tienen que ser superados.

Por ejemplo, la Fase I de estudios de seguridad con oligos en antisentido en voluntarios sanos, estos podrían cambiar el marco de lectura en un ARNm de la distrofina normal y, si son lo suficientemente eficaces, dar a los voluntarios sanos distrofia Duchenne, un efecto secundario muy grave que nada tiene que ver con los habituales eventos adversos. Otra preocupación importante serían efectos por estar *fuera de objetivo*, lo que significa que pueden ser saltados exones con la información genética que no sea del gen de la distrofina y crear enfermedades graves y posiblemente desconocidas.

Otro problema, no encontrado en las condiciones normales de desarrollo de fármacos, podría ser específico a la distrofia Duchenne: porque debido a la ausencia de distrofina, las membranas de las células de los músculos con Duchenne tienen grietas y agujeros por los que el fármaco de salto de exón pueden entrar en el citoplasma de las células y también en el núcleo donde se necesitan para su acción terapéutica. Así, ciertos efectos adversos pueden aparecer sólo en los pacientes con Duchenne, pero no en las personas sin esta enfermedad.

*Por lo tanto, una fase I de ensayo clínico con voluntarios sanos no se puede realizar con fármacos potenciales de salto de exón.*

**Participación en ensayos clínicos.** Los ensayos clínicos en pacientes son pasos indispensables para el desarrollo pleno de una terapia de salto de exón. Es comprensible que las familias estén tratando de que sus hijos enfermos sean aceptados en los ensayos porque tienen la esperanza de que su hijo tendrá la oportunidad de un tratamiento temprano en vez de esperar muchos años más para la aprobación definitiva de su medicación personal.

Sin embargo, los ensayos clínicos son sólo experimentos humanos que también pueden salir mal. Así que las familias deben escuchar con atención la información dada por los médicos que realizan la prueba antes de que estén listos para dar su *consentimiento informado*. La participación tiene también desventajas que han sido explicadas por **Kate Bushby** de TREAT-NMD en una entrevista que grabé con ella en marzo de 2009:

"No creo que sea práctico venir de otro país, porque los niños tienen que estar allí cada semana para sus inyecciones. Tienen que tomarles un montón de muestras de sangre. Las familias tienen que vivir cerca de los centros clínicos. Aun cuando viven cerca, las familias tienen que poner toda su vida en suspenso. Deben darse cuenta de que las pruebas sólo son pruebas. En las pruebas de eficacia, su niño puede incluso recibir placebo. Es posible que no les ayude y puede haber efectos secundarios imprevistos. Las pruebas son realmente un trabajo duro. Yo diría incluso que la gente en las pruebas esta casi en desventaja. Debido a tienen que pasar por un problema para llegar a algo que todo el mundo se beneficiara de el más tarde, siempre que se demuestre que funciona. Estamos muy agradecidos de hecho con las familias y los niños que se toman todo el tiempo y esfuerzo en participar en estos estudios, lo que realmente espero mueva las cosas hacia adelante para todos".

*Sin embargo, existe una importante ventaja potencial para los participantes:* Si un ensayo de fase II o fase III muestra que el tratamiento parece ser es eficaz hasta cierto punto, entonces la prueba puede ser seguida por un periodo de extensión de etiqueta abierta sobre varios años durante los cuales todos los niños - también los que habían obtenido un placebo durante el ensayo - recibirán la dosis más eficaz utilizada en el ensayo, posiblemente, hasta que el fármaco está aprobado en su país.

#### **Introducción general sobre la reparación del músculo.**

El texto de este párrafo ha sido redactado por **Annemieke Aartsma-Rus** después de un simposio sobre células madre de músculo, que tuvo lugar en Nueva Orleans, EUA, en julio de 2012.

"Las distrofias musculares, como la distrofia muscular Duchenne se caracteriza por un daño permanente del tejido muscular, llevando eventualmente a la pérdida de tejido muscular y función muscular. Como la mayoría de los tejidos, el músculo es capaz de regenerarse a sí mismo cuando está dañado.

Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los tejidos, los músculos no consisten en células individuales, si no de

fibras que se originan a partir de células individuales que se han fusionado. Después de este proceso de "diferenciación", las fibras musculares ya no son capaces de dividirse o regenerarse. Sin embargo, dedicadas células individuales, llamadas "**células satélite**" que están en la parte superior de las fibras musculares, son capaces de dividirse y reparar el músculo. Una vez que las fibras musculares se dañan, factores de daño son liberados activando a las células satélite, que luego comienzan a dividirse, migran a la zona dañada y la reparan mediante la fusión con las fibras musculares, o - si hay una gran cantidad de daños - por la fusión entre ellas para formar una nueva fibra. Para asegurarse de que el músculo pueda ser reparado durante la próxima ronda de daños, una de estas células se convierte en una célula satélite inactiva, que de nuevo se encuentra en la parte superior de la fibra muscular nueva o reparada.

Todas las personas de vez en cuando se dañan el músculo y el sistema de regeneración se asegura que el daño sea reparado y los músculos crezcan grandes y fuertes, para evitar daños en el futuro. El problema con la distrofia muscular (Duchenne) es que las fibras musculares son mucho más sensibles a sufrir daños, debido a la pérdida de proteínas esenciales que estabilizan las fibras musculares durante la contracción (por ejemplo la distrofina y proteínas asociadas a la distrofina).

Por lo tanto, en pacientes con Duchenne, las fibras musculares se dañará más fácil y más frecuente que en individuos sanos. Esto pone un estrés crónico en el sistema de

reparación conduce a la inflamación. Normalmente, las células inflamatorias juegan un papel importante en el daño muscular: rompen los tejidos dañados (como un sistema de eliminación de residuos) para hacer espacio para nuevas fibras musculares. Sin embargo, debido a la naturaleza crónica de la enfermedad, hay una inflamación continua, lo que finalmente conduce a **fibrosis** (tejido conectivo es formado en lugar de nuevo tejido muscular, debido a que las células inflamatorias segregan señales de péptidos que hacen que las células satélite se vuelva **fibroblastos** en lugar de células formadoras de músculo). Los fibroblastos excretan señales de péptidos que sostienen y aumentan la formación de fibrosis, así que esto es un círculo vicioso en el que se forma más y más fibrosis y la reparación del músculo ocurre cada vez menos. Mientras se mantenga el daño del tejido muscular, la mayoría de las fibras musculares con el tiempo serán reemplazadas por tejido fibrótico y la función muscular se perderá."

La consecuencia de la explicación Annemieke es que el efecto más importante de la terapia de salto de exón es la reaparición de la estabilizante proteína distrofina y sus proteínas asociadas al complejo distrofina en las fibras musculares supervivientes. Esto hara mas lento o incluso detener el proceso fibrótico, pero el tejido conectivo, una vez producido, no desaparece. *Por lo tanto, el salto de exón se debera iniciar muy temprano en la vida de un niño con Duchenne, antes de que la fibrosis se ha iniciado y la mayoría de las fibras musculares están todavía presentes.*

### Ensayos clínicos de salto de exón.

El desarrollo de fármacos genéticos personalizados de salto de exón tendrá que ser realizado por empresas con suficientes recursos financieros que les permitan superar las dificultades técnicas y éticas de completamente nuevos tipos de medicamentos que están diseñados para interferir con el mensaje genético de un gen humano, aunque no con el propio gen.

Tres empresas han de ser mencionadas aquí, que ya han llevado al método de salto de exón a ser la técnica más avanzada para una terapia de la distrofia muscular Duchenne. Con cerca de 400,000 pacientes en todo el mundo, la distrofia Duchenne pertenece junto con fibrosis quística a las enfermedades hereditarias más frecuentes de la infancia.

No voy a describir estas empresas aquí con mis propias palabras, pero le daré sus nombres y direcciones de Internet para que pueda ver a sus páginas de información sobre su trabajo de investigación de Duchenne.

**Prosensa Therapeutics BV** en Leiden, Holanda, [www.prosensa.com](http://www.prosensa.com).

**GlaxoSmithKline PLC (GSK)** con sede en Londres, [www.gsk.com](http://www.gsk.com), escriba "Duchenne" en el espacio de búsqueda en la parte superior derecha y haga clic en "go".

**Sarepta Therapeutics** (anteriormente AVI Biopharma) en Cambridge, MA, EUA, [www.sareptatherapeutics.com](http://www.sareptatherapeutics.com).

### Los cuatro primeros ensayos clínicos para saltar el exón 51 en chicos con Duchenne.

Después de muchos años de trabajo preclínico con oligos en antisentido con cultivos de músculo en el laboratorio, con ratones mdx distróficos que tienen un codón de parada prematuro en el exón 23, y también con ratones "humanizados", ratones normales que contienen el gen de la distrofina humana, el primero de cuatro ensayos clínicos para saltar el exón 51 humano en chicos con Duchenne fueron hecho entre 2006 y 2009. Dos de ellos eran *locales*, en los que parte de un solo músculo sin importancia era tratado y por lo tanto no podía proporcionar un beneficio clínico para los niños participantes. Los otros dos ensayos fueron *sistémicos*, en los que los fármacos potenciales, los oligos

en antisentido contra el exón-51, se inyectaron para obtener acceso a la circulación sanguínea, de modo que pudieran alcanzar todos los músculos.

La cuestión principal para la que estos cuatro ensayos fueron diseñados no fue para responder si habría una mejora de la función muscular por este tratamiento, sino: *¿son los nuevos fármacos potenciales seguros y hay evidencia de nueva distrofina?* Después de todo, si funcionan, más tarde tendrían que ser dados por muchos años durante el curso de la vida extendida de los niños y por lo tanto no deberían tener efectos secundarios graves y, sobre todo, sólo deben reparar el mensaje genético del gen de la dis-



trofina y no interferir con ninguno de los otros más de 20,000 genes humanos y su información.

**Ensayo local fase II de salto del exón-51 de método abierto en Holanda.** La primera prueba en humanos con la técnica de salto de exón fue realizada bajo la dirección de **Judith van Deutekom, Jan Verschuuren**, y otros de la compañía *Prosensa Therapeutics BV* y el *Centro Médico de la Universidad de Leiden* en Holanda entre enero de 2006 y marzo de 2007. Fue diseñada para proveer solamente una **prueba de principio**. Fue un estudio local sobre un área pequeña del músculo *tibialis anterior* de la espinilla, que fue tratado con el oligo en antisentido 2'O-metil contra el exón 51 llamado PRO051.

Los cuatro niños no ambulantes en este estudio abierto sin placebo tenían entre 10 y 13 años de edad y deleciones de los exones 50, 52, 48-50, o 49-50. Cada niño recibió una dosis única de 0.8 mg de PRO051 inyectado directamente en el músculo de la espinilla. Después de 4 semanas, tejido muscular fue obtenido por una biopsia del sitio de la inyección y se probó para buscar el ARNm saltado y nueva proteína distrofina.

Más del 94% las fibras musculares en el tejido de la biopsia mostraban nueva distrofina en las membranas de la fibra muscular en niveles de 33%, 35%, 17%, y 25% comparado con tejido muscular sano. Los ARNm fueron aislados y secuenciados los cuales mostraron que las bases, letras genéticas, de los exones delecionados y el saltado, el exón 51, no estaban en la secuencia normal. Esto demostró que el salto de exón realmente salta el exón específico en el músculo humano.

La primera aplicación de la técnica de salto de exón en niños con Duchenne ha sido publicados el 27 de diciembre de 2007 en la revista *New England Journal of Medicine* (6).

**Prueba sistémica de fase IIa en Suecia y Bélgica para saltar el exón 51 en chicos con Duchenne.** Con el próximo paso hacia el pleno desarrollo de esta técnica, los científicos tuvieron que demostrar que el PRO051 también pueden ser aplicado de forma *sistémica* mediante inyección en la circulación sanguínea para que el fármaco pueda alcanzar y tratar todas las células musculares.

Entre Julio de 2008 y Enero de 2009, **Prosensa** hizo un estudio *sistémico* con doce chicos con Duchenne entre 5 a 15 años de edad con PRO051 inyectado por vía *subcutánea*, bajo la piel. Las inyecciones fueron aplicadas por los equipos de **Nathalie M. Goemans** en el Departamento de Neurología Pediátrica de la Universidad de Leuven en Bélgica y de **Mar Tulinius** en el Hospital Infantil Reina Silvia en Gotemburgo en Suecia.

En este estudio de método abierto de dosis escalada, cuatro grupos de tres niños recibieron el oligo antisentido contra el exón 51 una vez por semana durante cinco semanas en dosis de 0.5, 2, 4 y 6 mg/kg. Este ensayo está siendo seguido por un *estudio de extensión abierto*, que se describe en la siguiente sección.

Se tomaron biopsias musculares antes y después del

tratamiento en el primer grupo y en dos y siete semanas después del tratamiento en el grupo de dosis alta para ver si cualquier distrofina recién formada era estable.

La estructura del ARNm y la presencia de la nueva proteína distrofina se determinaron en todas las muestras de biopsia, analizadas como se describió para el estudio local, que mostró que el salto de exón con el oligo en antisentido había saltado los exones seleccionados según lo previsto y que la nueva distrofina tenía, como era de esperar, un peso molecular ligeramente inferior a lo normal.

Dos semanas después del final del estudio, 56-100% de las fibras musculares contenían nueva distrofina con los mayores porcentajes encontrados en los niños que recibieron las dos dosis altas. Como era de esperar debido al breve período de dosificación, mejoría en la función muscular no fue vista.

Pero este ensayo demostró por primera vez que la administración subcutánea de PRO051 había resultado en el salto específico del exón 51 y se indujo la producción de nueva distrofina de una manera relacionada con la dosis, lo que significa que la alta dosis había creado la más alta cantidad de distrofina.

Esta primera prueba sistémica con un agente de salto de exón en Duchenne fue diseñado para responder a la pregunta más importante: *¿Es seguro el tratamiento genético?* La terapia de cuerpo entero fue bien tolerada sin rechazo inmune de la nueva proteína y no hubo problemas clínicamente significativos en ninguno de los 12 pacientes con Duchenne en el estudio.

Los datos de este estudio fueron publicados en la revista *New England Journal of Medicine* de marzo 2011 (7).

**Asociación Prosensa - GSK.** El resultado positivo de estos dos ensayos clínicos fase II incluso antes de que todos los detalles fueran conocidos - convenció a la empresa Prosensa y a GlaxoSmithKline (GSK) para entrar en una colaboración mundial exclusiva para el desarrollo y comercialización de su tecnología de salto de exón utilizando los oligorribonucleótidos en antisentido 2O-metilos. En virtud de este acuerdo, GSK obtiene una licencia exclusiva para desarrollar y comercializar el oligo en antisentido de Prosensa para el salto del exón 51 del gen de la distrofina, y ambas compañías continuarán trabajando juntas para desarrollar este oligo.

Como primer paso, inició en 2010 el ensayo clínico fase III internacional central y decisivo, con al menos 180 chicos con Duchenne que necesitan el salto del exón 51. GSK se hará cargo de todos los gastos de este gran ensayo.

Además, GSK tiene la opción de licencia de tres más oligos en antisentido para saltar los exones 44, 45 o 53, y 52 o 55. El salto del exón 44 se encuentra ya en un estudio de fase II, cuyos resultados se esperan en el transcurso de 2013. Y después los ensayos clínicos para saltar los exones 45 y 53 se iniciarán en 2013. Derechos de opción de GSK pueden ser ejercidos por la finalización con éxito de la prueba con el exón-44.

## Los primeros ensayos clínicos con oligos en antisentido morfolinicos para saltar el exón 51.

Antes de continuar describiendo los procesos que realiza Prosensa y GSK, estoy resumiendo las dos pruebas de salto de exón (y un ensayo de extensión), que eran similares a las realizadas por Prosensa pero que utilizan otro tipo de fármaco en antisentido, el *morfolino*, que fue desarrollado por la empresa AVI BioPharma en Seattle cerca de Seattle en los EUA, ahora llamado **Sarepta Therapeutics**, con sede en Cambridge, Massachusetts.

Estos dos ensayos se realizaron en el Reino Unido y no en los EUA, porque era más fácil y más rápido obtener el permiso para empezar de la Agencia Europea EMA, que de la Agencia Federal de Fármacos de EUA FDA.

**Primera prueba clínica local con un oligo en antisentido morfolino contra el exón 51 en el Reino Unido.** Este ensayo fase-IIa de salto de exón se realizó en el Reino Unido entre el otoño de 2007 y finales de 2008 bajo la dirección de **Kate Bushby** de TREAT-NMD en Newcastle y **Francesco Muntoni** del Colegio Imperial en Londres.

Durante los experimentos pre-clínicos, el oligo en antisentido morfolino, AVI-4658, desarrollado por **Steve Wilton** en Perth (Australia) fue mostrado por **Dominic Wells** en Londres, para ser lo suficientemente estable para un tratamiento clínico a largo plazo.

Este ensayo fue un estudio local para evaluar la seguridad y eficacia bioquímica de este fármaco morfolino que omite el exón 51 después de inyecciones de una sola vez en un músculo pequeño y sin importancia, el músculo extensor *digitorum brevis* (EDB) en el exterior del pie. Siete niños con Duchenne de 11-16 años de edad, algunos de ellos en silla de ruedas, participaron.

Cada uno de los 7 pacientes seleccionados tenía menos de 5% de fibras revertantes en sus músculos, determinado por una biopsia en el momento de su diagnóstico. Diferentes bajas cantidades de estas fibras musculares positivas de distrofina están presentes en muchos chicos con Duchenne. Son causadas por una omisión de exón espontánea.

Este ensayo fue un estudio *ciego simple*, lo que significa que los investigadores que analizaron las muestras de músculo no sabían si los tejidos venían del músculo tratado o del músculo de control de su otro pie.

Dos niños recibieron 0.09 mg del morfolino y después los cinco otros niños recibieron una dosis 10-veces mayor de 0.90 mg del morfolino. La mayoría de los músculos EDB tratados fueron retirados en biopsias entre tres y cuatro semanas después de la inyección.

La mayor dosis resultó en la producción aumentada de distrofina en todos los músculos tratados con un rango de 22% a 32% de la intensidad media en los músculos de las personas sanas, y es 11-21% mayor que el antecedente de distrofina vertante en el músculo de control del otro pie. Pruebas adicionales demostraron que la nueva distrofina había reducido el peso molecular como se esperaba de la distrofina tipo-Becker acertada.

En pacientes que recibieron la dosis más baja del medicamento, el ARNm con el exón saltado fue detectado, pero ningún aumento de la proteína pudo ser probado, porque el examen de la proteína no era lo suficientemente sensible para detectar diferencias muy pequeñas en las proteínas.

Este estudio en vivo demostró que el fármaco en antisentido AVI-4658 indujo la omisión pretendida del exón 51, y la producción de nueva distrofina que se había trasladado a su lugar normal en el interior de la membrana de la célula muscular, que luego se conectó correctamente a las proteínas del complejo distrofino-glicoproteico de la distrofina. Este tratamiento no se asoció con ningún efecto sistémico o local secundario adverso o con cualquier respuesta inmune contra la distrofina.

Al igual que con los tratamientos locales, ningún beneficio terapéutico para los niños participantes se esperaba.

Ambos estudios, el holandés y el inglés, fueron diseñados para proporcionar una **prueba de principio** de que el salto de exón funciona en humanos. Y ambos estudios han demostrado que este es el caso. Con algunas diferencias técnicas entre los dos estudios, lo que significa que los resultados no son directamente comparables en todos los detalles.

Los detalles de esta prueba local fueron publicados en 2009 en la revista *The Lancet Neurology* (8).

### **Primera prueba clínica sistémica con un oligo en antisentido morfolino contra el exón 51 en el Reino Unido.**

En este ensayo fase-II de método abierto, 19 niños todavía ambulantes de 6-13 años de edad, que necesitan el salto del exón 51 fueron tratados secuencialmente durante el año 2009 en Londres y Newcastle upon Tyne, también bajo la dirección de **Kate Bushby** y **Francesco Muntoni**. Los niños recibieron dosis de 0.5 a 20 mg/kg del oligo en antisentido AVI-4658 durante 12 semanas en la circulación sanguínea con inyecciones *intravenosas* semanales para que pueda llegar a todos los músculos. Los objetivos del ensayo fueron prueba de la seguridad y tolerabilidad, y no cambios de la función y fuerza muscular.

Dos biopsias musculares de los bíceps de cada niño fueron tomadas antes y después del tratamiento con el fin de determinar la cantidad mínima de distrofina en las fibras revertantes y la cantidad aumentada después del tratamiento

En los 7 pacientes que recibieron las dosis más altas de entre 2 y 20 mg/kg, nueva distrofina entre 9% y 16% de la cantidad normal pudo ser detectada por encima de la base revertante por el análisis del ARNm saltado y la proteína acertada. Tres de los cuatro pacientes que recibieron la dosis más alta de 20 mg/kg tuvieron 21%, 15%, y 55% de fibras con distrofina después del tratamiento. Además, algunas de las proteínas asociadas a la distrofina, que en pacientes con Duchenne se pierden junto con la distrofina, reaparecieron después del tratamiento en su ubicación normal en las membranas celulares del músculo. No se observaron efectos adversos relacionados con el fármaco aparecidos durante toda la duración del ensayo.

Una mejora de la función muscular no era se esperaba, debido a que el ensayo fue demasiado breve para obtener los cambios de rendimiento muscular que podrían ser fiablemente interpretados.

Los autores concluyeron que la seguridad del tratamiento y la prueba de que la aplicación sistémica de AVI-4658 en realidad causó el esperado salto del exón 51 "muestran

el potencial de AVI-4658 para convertirse en un modificador de la enfermedad para la distrofia muscular Duchenne" (9).

**Extensión de ensayo con oligo en antisentido morfolino de Sarepta contra el exón 51, NCT01396239.** Este ensayo, denominado **4658-US-201** es la parte con método **doble ciego** de la continuación del ensayo sistémico anterior realizado por Sarepta pero con dos dosis más altas de **Eteplirsén**, 30 y 50 mg/kg, y con 24 semanas de tratamiento o placebo para ver si nueva distrofina podría ser encontrada en el tejido muscular de varias biopsias después del final de esta parte doble ciego del estudio.

Mi resumen de la organización y los resultados de este ensayo se basa en una serie de comunicados de prensa de Sarepta, el más reciente de fecha 7 de diciembre de 2012 (10). El ensayo comenzó en febrero de 2012 y se realiza bajo la dirección de **Jerry Mendell** y sus colegas en el Hospital Infantil Nacional, en Columbus, Ohio, EUA.

Durante las primeras 24 semanas, 12 niños con Duchenne en 3 grupos recibieron inyecciones intravenosas semanales: 4 niños recibieron una dosis de 30 mg/kg, 4 una dosis de 50 mg/kg, y 4 un placebo. Las biopsias para determinar la distrofina se realizaron antes de la primera inyección, a las 12 semanas (para dosis de 50 mg/kg) y a las 24 semanas (para dosis de 30 mg/kg), y una tercera biopsia en todos los niños después de 48 semanas.

Para determinar si estos tratamientos mejoran los síntomas clínicos, varios exámenes de función muscular fueron realizados. Pero al final de esta parte doble ciego del ensayo con las dos dosis de 30 y 50 mg/kg/semana, la prueba más importante, la prueba de caminata de 6 minutos, *no* mostró un cambio significativo para el tratamiento los pacientes después de 12 o 24 semanas.

Así, después de 24 semanas, el ensayo continuó sin límite de tiempo como un estudio de extensión de **método abierto** llamado **4658-US-202** para ver si en estas condiciones, una mejoría de la función muscular puede medirse principalmente por la prueba de caminata de 6 minutos.

Dos de los pacientes con placebo se añadieron a los 4 que están recibiendo una dosis de 50 mg/kg, mientras que los otros dos se añadieron a la dosis de 30 mg/kg. Mientras tanto, dos chicos del grupo de 30 mg/kg perdieron la ambulancia, por lo que no pudieron participar en la prueba de caminata de 6 minutos. Así, en la actualidad hay tres grupos: 4 niños que recibieron 50 mg/kg/semana desde el principio, 4 niños que recibieron 30 mg/kg/semana desde el principio, sólo dos de los cuales podrían participar en la prueba de caminata de 6 minutos, y 4 con retraso por "placebo", muchachos que estaban en el grupo placebo durante 24 semanas, seguido de tratamiento con 50 o 30 mg/kg/semana.

Como no hubo diferencias significativas de los resultados con la prueba de caminata de 6 minutos entre los dos grupos tratados con 30 o 50 mg/kg/semana de Eteplirsén

durante 62 semanas, los resultados de sólo dos grupos de pacientes son aquí discutidos: Grupo I de 6 niños tratados desde el inicio del estudio durante 62 semanas, y el grupo II de 4 chicos "con retraso por placebo", que estaban en placebo durante las primeras 24 semanas del estudio seguido por 38 semanas con 30 ó 50 mg/kg Eteplirsén.

Después de 62 semanas de tratamiento, los 6 niños tratados del grupo I caminaron 16 metros menos en la prueba de caminata de 6 minutos que al comienzo del estudio, mientras que los 4 retardados por placebo seguían caminando 78 metros menos. Por lo tanto, *los niños tratados demostraron un beneficio significativo de 62 metros en comparación* con los resultados de los 4 chicos retrasados por placebo. Estos resultados se promedian entre los chicos y redondeado a metros completos.

El hecho de que los niños tratados hayan perdido sólo 16 metros durante las 62 semanas (1 año y 2 meses y medio) significa que perdieron menos del 5% de los cerca de 400 metros que podían caminar en 6 minutos al comienzo del tratamiento. Los 4 chicos retrasados por placebo perdieron menos de 10 metros durante las 38 semanas de tratamiento. Esto sugiere que *se disminuye el progreso de forma significativa de Duchenne hacia síntomas de Becker como se esperaba de un tratamiento de salto de exón.*

Annemieke comenta: "Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela, ya que los grupos son muy pequeños y se sabe que hay una gran cantidad de variación en la progresión entre niños individuales (por ejemplo, se denota también el hecho que 2 de los pacientes tratados perdieron la ambulancia durante el juicio). "

Los buenos resultados de las determinaciones de distrofina en el tejido muscular obtenido por biopsias son otra indicación de que este tipo de salto de exón funciona. El oligo en antisentido morfolino contra el exón 51 Eteplirsén a una dosis de 30 mg/kg/semana produjo un aumento significativo de entre 16% y 29% de fibras con nueva distrofina a las 24 semanas de tratamiento. El tratamiento más corto, 12 semanas, no mostro un aumento significativo en la nueva distrofina incluso cuando la dosis mayor de 50 mg/kg/semana fue utilizada. *Esto demuestra que un tratamiento más largo que de seis meses se requiere antes que niveles significativos de nueva distrofina se produzcan para Eteplirsén.*

En los niños tratados durante 48 semanas con cualquiera de las dosis, el porcentaje de fibras musculares conteniendo distrofina nueva alcanzo entre menos de un 5% a un 47% del nivel normal, en áreas en los muchachos que estaban en el grupo placebo durante las primeras 24 semanas, sólo 38% de fibras contenían nueva distrofina.

Eteplirsén demostró ser seguro con ambas dosis de 30 y 50 mg/kg/semana durante el período de prueba de 62 semanas.

Sarepta han indicado que estarán discutiendo estos resultados con la FDA y la preparación para un ensayo pivotal en fase III, doble ciego, que se iniciara en 2014.

## Ensayos clínicos para saltar el exón 51 realizado por GlaxoSmithKline (GSK) y Prosensa

En la redacción de este informe, los cuatro ensayos clínicos para saltar el exón 51 se completaron y publicaron sus resultados. Un número bastante grande de ensayos adicio-

nales para saltar el exón 51 están actualmente en curso. Ellos están siendo realizados por GSK con el oligo en antisentido contra el exón 51 PRO051 de Prosensa, ahora

llamado **Drisapersen** y **GSK2402968**. Cada uno de estos ensayos tiene un número de identificación de GSK comenzando con DMD, y un "identificador de clinicaltrials.gov" que comienza con las letras NCT. Sus detalles están documentados y actualizados regularmente por los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NIH) y publicados en Internet. Con el fin de encontrar la información actual acerca de un ensayo específico, vaya a [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), introduzca el número de GNC en el espacio de "search for study", haga clic en "search", y luego en el título del ensayo. En los siguientes párrafos, estoy dando un breve resumen de la mayoría de los importantes ensayos en Duchenne y mencionare su número NCT, y también los nombres de GSK, si se realizan por GSK.

**Estudio de Prosensa de extensión abierto de PRO051-02.** Después de dos ensayos abiertos contra el exón 51 realizados por Prosensa sola, uno local y otro sistémico, que se describen en la página 13, los doce niños que participaron en la prueba sistémica, están recibiendo la dosis más alta, 6 mg/kg/semana, por vía subcutánea de Drisapersen en un estudio de extensión que está en curso por más de 3 años, y todavía no han aparecido problemas serios de seguridad.

En la reunión anual del Parent Project Muscular Dystrophy en los Estados Unidos, PPMD, en Fort Lauderdale, Florida, en junio de 2012, los primeros resultados preliminares de la prueba de caminata de 6 minutos después de 96 semanas (22 meses) se informaron. En ese momento, los 7 muchachos habían mantenido su distancia de caminata o había mejorado. De los 10 niños capaces de completar el test de la caminata de 6 minutos al comienzo del ensayo de extensión, dos habían perdido su capacidad de caminar. Ellos eran los que estaban ya al final de su marcha independiente cuando entraron en el ensayo. Eso significa que los chicos tienen mejores índices al comienzo del estudio propiciado más por el tratamiento.

Esto es una indicación de la eficacia positiva a largo plazo del salto de exón, pero los resultados deben ser interpretados con cautela debido a que todos los niños son tratados y ninguno de ellos con placebo, por lo que la comparación con el curso normal de la enfermedad no es posible. Una presentación gráfica similar a la mostrada en la página 7 para el estudio del Ataluren, aún no está disponible.

**Ensayo Fase III contra el exón-51 GSK DMD 114044, NCT 01254019.** Este estudio crucial, decisivo, es un estudio doble ciego, en fase III, con el objetivo de demostrar definitivamente que el salto del exón 51 reduce la velocidad de progresión de la enfermedad como se midió en la prueba de caminata de 6 minutos en chicos con Duchenne para que el oligo en antisentido contra el exón 51 del tipo 2O-metilo, llamado **Drisapersen**, sea aprobado para su comercialización por las agencias reguladoras FDA en los EUA y EMA en Europa. Este gran ensayo se está realizando en 45 centros clínicos en 21 países: Alemania, Argentina, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, República Checa, Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Japón, Corea del Sur, Holanda, Noruega, Polonia, Rusia, Serbia, España, Taiwán y Turquía.

Los Estados Unidos no están presentes en esta lista,

debido a diversos requisitos de la FDA. Por lo tanto, un ensayo similar utilizando dos diferentes dosis se realiza en los Estados Unidos como descrito en la página siguiente.

Las inyecciones de medicamento del ensayo de fase III comenzaron en diciembre de 2010, los últimos niños fueron reclutados en el tercer trimestre de 2012, por lo que el proceso se completará a finales de 2013, después que los últimos niños han sido tratados por un año. Los resultados del estudio se espera que estén disponibles en 2014. A continuación, se presentaran en la primera conferencia médica adecuada y publicados en una revista científica importante.

Para este estudio pivotal, 186 chicos con Duchenne han sido reclutados de al menos 5 años de edad y habían recibido corticoides durante al menos 6 meses antes de entrar en el ensayo. Los niños reciben ya sea 6 mg/kg del fármaco potencial o una sustancia inactiva como placebo mediante inyección subcutánea cada semana durante 48 semanas.

La razón de tener por lo menos 180 niños participantes fue para asegurarse de que los resultados son estadísticamente significativos. En este caso, el estudio será capaz de mostrar una diferencia de al menos 30 metros de distancia entre los niños tratados y con placebo.

La medida de resultado principal, la prueba para detectar una mejoría de la función muscular, es, como en la mayoría de los otros ensayos de salto de exón, la prueba de caminata de 6 minutos. Otras pruebas de fuerza muscular y el rendimiento de la respiración también se están haciendo. Las biopsias musculares para buscar nueva distrofina acortada se llevan a cabo después del final del tratamiento, y las muestras de sangre se toman durante todo el ensayo para análisis clínicos para evaluar la seguridad. Los cambios en la calidad de vida están siendo seguidos por la cumplimentación de cuestionarios.

La presencia de nueva distrofina acortada en el músculo de los pacientes tratados no es suficiente para probar la eficacia y que el medicamento realmente funciona. La distrofina podría estar allí, pero no estar en su lugar normal y por lo tanto no será capaz de hacer los músculos más estables y un mejor funcionamiento. La prueba de caminata de 6 minutos es el mejor método para probar la función mejorada, ya que si los chicos caminan más metros en 6 minutos que los pacientes tratados con placebo, el fármaco tiene un efecto positivo. La prueba de caminata de 6 minutos ha sido aceptada por la FDA y la EMA como la prueba más fidedigna de que un nuevo medicamento para enfermedades musculares es eficaz.

**Estudio de extensión con método abierto, ensayo GSK DMD 114349, NCT 01480245.** Similar al estudio de extensión después de la fase II de ensayo sistémico realizada por Prosensa, que se describe en la página anterior, este ensayo es una continuación del tratamiento para los pacientes que completaron sus 48 semanas de inyecciones en la fase III del ensayo GSK 114044 y del ensayo con dosis intermitentes GSK 114117. Todos los pacientes están recibiendo una dosis de 6 mg/kg/semana, también aquellos que han estado en placebo durante el primer ensayo. El tratamiento con corticoides también ha de continuar sin interrupción. Este ensayo inició en septiembre de 2011 y



terminara en diciembre de 2014. Los niños están siendo tratados en los mismos centros clínicos donde fueron tratados durante el propio ensayo. Se estima que alrededor de 200 niños participarán. Los resultados estarán disponibles a principios de 2015 y luego aparecerán en una revista médica importante.

**Fase II de ensayo con 2 dosis en los EUA, ensayo GSK DMD 114876, NCT01462292.** Este estudio es similar a la fase III de estudio internacional, pero utiliza dos dosis, 3 y 6 mg/kg/semana, y se realiza sólo en los EUA en Sacramento CA, Stanford CA, Gulf Breeze FL, Iowa City IA, Kansas City KS, Baltimore MD, Minneapolis MN, St. Louis MO, Nueva York NY, Durham NC, Cincinnati OH, Columbus OH, Portland OR, Dallas TX.

Cincuenta y cuatro pacientes por lo menos 5 años y todavía ambulantes participaran. Cada paciente recibe el medicamento o un placebo una vez por semana durante 24 semanas, seguido de un período de observación de 24 semanas, también llamado **ensayo de extensión GSK DMD 114501**. Las inyecciones se iniciaron en octubre de 2011 y el último niño habrá cumplido un año de prueba a finales de 2013.

Las medidas de resultado son la prueba de caminata de 6 minutos, las determinaciones de distrofina después de las biopsias y muchas otras, principalmente para evaluar la seguridad y la farmacocinética, al medir la rapidez con la que el fármaco entra en los músculos, así como de qué manera y con qué rapidez se degradada y luego se elimina del cuerpo. Además, investigaciones con la nueva y cara resonancia magnética (RMN) se están haciendo para comprobar el estado de los músculos de las extremidades, el corazón y el diafragma para ver en detalle el efecto del oligo en antisentido contra el exón 51.

**Salto del exón 51 con periodos intermitentes de tratamiento, ensayo GSK DMD 114117, NCT01153932.** El objetivo de este ensayo de fase II era averiguar si un tratamiento intermitente con el fármaco anti el exón 51 de GSK 2402968 llevaría a una mejor seguridad a largo plazo con un efecto terapéutico equivalente en comparación con la dosis semanal. El estudio fue realizado en 13 centros clínicos en 9 países: Alemania, Australia, Bélgica, Francia, Alemania, Israel, Holanda, España, Turquía, Reino Unido. El ensayo comenzó en septiembre de 2010 y se terminó a finales de 2012.

Cincuenta y tres chicos con Duchenne de por lo menos 5 años de edad y caminando independientemente participaron. Tenían que estar con corticoides durante al menos 6 meses antes y también durante el ensayo. Alrededor de un tercio de los chicos recibieron 6 mg/kg del fármaco cada semana en inyección subcutánea durante 48 semanas. Otra tercera parte se trato en cinco ciclos de 10-semanas: Dos veces por semana 6 mg/kg en las semanas 1, 3, y 5, una vez por semana en las semanas 2, 4, y 6, y ningún tratamiento en la semana 7 a 10. El último tercio recibió un placebo, en las mismas condiciones. Por lo tanto, este estudio fue un ensayo doble-ciego. El criterio de valoración primario de este estudio exploratorio fue la eficacia después de 24 semanas de tratamiento.

Los resultados del ensayo se determinaron midiendo

repetidamente el cambio de la función del músculo con la prueba de caminata de 6 minutos, la determinación de la farmacocinética, y la seguridad con un número de análisis de sangre y orina. Las biopsias musculares fueron realizadas antes y después de la prueba para determinar la cantidad de nueva y acertada distrofina por efecto del procedimiento saltar. Los resultados serán publicados tan pronto como estén plenamente analizados y evaluados.

**Salto del exón 51 en pacientes en silla de ruedas, ensayo GSK DMD 114118, NCT01128855.** El propósito de este estudio sistémico fue estudiar la seguridad y la tolerabilidad del salto del exón 51 en 19 pacientes que no podían caminar más, que eran mayores de 9 años y tuvieron que usar una silla de ruedas durante al menos un año pero no más de 4 años.

Debido a que los ensayos con los niños que todavía caminan ahora no han mostrado ningún problema de seguridad, el objetivo principal de este estudio era asegurarse de que no haya problemas de seguridad adicionales en silla de ruedas.

Dado que estos niños son menos activos que los que caminan, y la composición del cuerpo es diferente (menos músculo) el comportamiento del fármaco en los músculos y su eliminación del cuerpo podría ser diferente, y que puede significar que la dosis requerida por ellos podría ser diferente. Los resultados de este estudio proporcionará información importante para los futuros ensayos clínicos con niños con Duchenne mayores y hombres jóvenes.

Los 19 participantes fueron asignados a 2 grupos de 8 niños en el que 6 niños recibieron una única inyección subcutánea de 3 o 6 mg/kg del fármaco contra el exón 51 GSK 2402968. Dos niños de cada grupo recibieron la misma dosis de una sustancia inactiva como placebo, por lo tanto, este estudio fue un ensayo doble-ciego. En un tercer grupo de 3 niños, 2 recibieron 9 mg/kg y el otro un placebo. Una y 4 semanas después de las inyecciones, extensos exámenes clínicos se llevaron a cabo. No se observaron efectos secundarios graves.

El ensayo se realizó en Columbus/Ohio, y en París. Este comenzó en julio de 2010 y finalizó en febrero de 2012. Los resultados serán publicados tan pronto como estén totalmente analizados.

**Los ensayos contra el exón 51 tienen que probar que el salto de exón es eficaz.** Los ensayos para saltar el exón 51 son los más importantes para conseguir que los oligos en antisentido contra distrofia muscular Duchenne sean aprobados para su comercialización en Europa y los Estados Unidos. Si los resultados de todos los estudios contra el exón 51 pueden convencer a las dos agencias reguladoras más importantes, la FDA y la EMA, que el salto del exón 51 es eficaz y seguro para el tratamiento de los pacientes durante muchos años, el permiso para la comercialización de este primer fármaco genético para una enfermedad genética grave debe concederse dentro de unos años.

Pero el salto del exón 51 sólo ayudaría a un 13% de todos los pacientes con Duchenne. Para proporcionar una terapia de salto al restante 70% de los pacientes que tienen mutaciones menos frecuentes o más raras, más de 100 oligos antisentido diferentes tendrían que ser desarrolla-

dos. Se han tomado cerca de 10 años y muchos millones de euros y dólares para el trabajo pre-clínico y las tres fases de ensayos clínicos para obtener un fármaco aprobado de salto del exón 51. Este tiempo y estos gastos deben reducirse considerablemente para producir los muchos otros medicamentos de salto para la mayoría de los pacientes con Duchenne.

Las discusiones y negociaciones de las organizaciones

## Ensayos clínicos para saltar otros exones además del 51

**Fase II de ensayos clínicos para saltar el exón 44. NCT 01037309.** Prosensa va a realizar este ensayo de método abierto con su fármaco PRO044-CLIN-01 en cuatro centros clínicos de Lovaina, Bélgica, en Leiden, Holanda, en Gotemburgo, Suecia, y en Ferrara, Italia. El ensayo se inició en diciembre de 2009 y se terminara en el segundo semestre de 2013.

Los 18 chicos con Duchenne participantes tienen entre 5 y 16 años, con tres niños en cada grupo de dosis. Estos grupos recibieron diferentes dosis semanales escalonadas de inyecciones subcutáneas de 0.5, 1.5, 5, 8, 10, 12 mg/kg. Algunos de los chicos fueron redosificados con inyecciones intravenosas de 1.5, 5 y 12 mg/kg durante 5 semanas.

Trece semanas después del tratamiento, biopsias se realizaron para determinar la cantidad de nueva distrofina aparecida en las células musculares. En otras pruebas, la seguridad, los posibles efectos secundarios y la farmacocinética se estudiarán

Si los resultados de este estudio de fase II demuestran que el salto del exón 44 es tan eficaz y seguro como el salto del exón 51, la FDA y la EMA pudieran no requerir un ensayo largo y costoso de fase III para este exón también antes de aceptar aprobar ambos fármacos de salto.

**Saltando otros exones.** En varios comunicados de prensa Prosensa ha anunciado que el trabajo preclínico del salto de los cuatro exones 45, 52, 53 y 55, que además de los exones 51 y 44, también en su lista de prioridades (ver página 9) se realizará en breve. Los primeros ensayos clínicos para saltar los exones 45 y 53 se iniciaran en 2013, seguido de los ensayos para los exones 52 y 55 poco después.

Del mismo modo, Sarepta está planeando ensayos para saltar los exones 45, 50, y 53.

**Tamizado de recién nacidos y ensayo clínico con pacientes pre-sintomáticos.** GSK tiene previsto iniciar en 2013 un ensayo clínico para saltar el exón 51 en chicos menores de 5 años que no tienen ninguno o muy pocos signos clínicos de distrofia Duchenne, ya que el salto de exón sólo será capaz de tratar las fibras musculares que siguen presente y no demasiado dañadas por el proceso distrófico. Las fibras perdidas no se pueden hacer crecer de nuevo.

Por ello, esta terapia puede ser más eficaz en niños pre-sintomáticos, en los que todavía tienen músculos suficientes que quedan antes de que la enfermedad se haga visible alrededor de la edad de 3 años.

La mejor solución sería la de comenzar el tratamiento dentro del primer año después del nacimiento. Para encon-

trar a estos chicos, tamizado del recién nacido sería necesario por aumento significativo de las actividades de la enzima creatina kinasa, CK, en una mancha de sangre seca en papel de filtro. Actividad de la CK muy elevada de más de 1,000 U/l en la sangre de un niño recién nacido significa que probablemente tiene distrofia Duchenne u otra enfermedad muscular como una de las distrofias de cinturas (limbgirdle).

Como se mostro en un programa piloto de tamizado neonatal realizado por el grupo de **Jerry Mendell** en Columbus/Ohio, es incluso posible secuenciar el gen de la distrofina en el ADN obtenido a partir de los leucocitos, las células blancas de la sangre, en la manchas de sangre seca de niños con altas actividades de CK (11).

Esto permitiría no sólo encontrar chicos con Duchenne inmediatamente después del nacimiento, sino también conocer su mutación genética y por lo tanto el diagnóstico en un plazo de un mes más o menos. Una terapia eficaz de salto de exón podría comenzar inmediatamente lo que posiblemente podría prevenir que los músculos incluso desde el principio se degeneren. *¡Estos chicos con Duchenne, no tendría distrofia muscular Duchenne!*

En un futuro próximo, tales programas de tamizado de Duchenne probablemente se añadirán a los tamizados de recién nacidos ya establecidos en muchos países para otras enfermedades que pueden ser tratadas. El simposio internacional del Centro Europeo Neuromuscular, ENMC, sobre el tamizado de Duchenne, el cual se llevó a cabo 14 a 16 de diciembre de 2012 en Naarden cerca de Ámsterdam, allanará el camino para la aceptación de este tipo de detección temprana, poco después de que el Drisapersen, el fármaco de Prosensa/GSK para saltar el exón 51 sea definitivamente demostrado es seguro y eficaz.

Como muchos de los lectores de mis informes saben, empecé a trabajar en el campo de la distrofia muscular después que fundé en 1974 un laboratorio privado en mi casa en la localidad de Breitenau en la Selva Negra a unos 30 kilómetros al este de Freiburg. Entre 1977 y 2011, se realizó un programa voluntario de detección precoz en Alemania desde hace 34 años, hasta noviembre de 2011. Junto con mis colegas, describí este programa y la nueva prueba bioluminiscente se utilizó para la detección de esta sustancia en muestras de sangre seca en 1986 (12). Probamos 537,000 niños entre los que se encuentran 155 niños con Duchenne (1:3,600) y 35 con Becker (1:15,300) en las primeras semanas después del nacimiento.

**Salto de exón con transferencia génica.** Investigadores de la Universidad de Versailles y de la Universidad de

Oxford, **Luis García, Aurélie Goyenvalle, Kay Davies** y sus colaboradores, están tratando de combinar el salto de exón con terapia génica para instruir a las células musculares a producir ellas mismas los oligos en antisentido. Ellos esperan necesitar sólo una inyección de un virus que porte una estructura genética para producir continuamente los oligos en antisentido, con lo que las inyecciones repetidas de oligos en antisentido libres serían innecesarias durante toda la vida útil posiblemente extendida de los pacientes.

Ya en 2004, los científicos crearon el gen terapéutico parte de esta técnica uniendo secuencias de ARN en antisentido a **ARNsn-U7's** (sn = pequeño nuclear), que son miembros de la familia de ARNs pequeños nucleares, parte de la maquinaria bioquímica que se une a los 79 exones en el núcleo para producir el ARNm activo para sintetizar la proteína distrofina. Estos ARNsn-U7's modificados fueron transportados con vectores, con inofensivos virus adeno asociados, AAV, en las células musculares donde se movían a sus núcleos para llevar a cabo el salto de exón allí durante el proceso de empalme.

Estos virus cargados se inyectaron primero a nivel local en los músculos solos de ratones mdx y luego sistémicamente en su circulación sanguínea. En las células musculares, el usual salto del exón 23 restaura el marco de lectura. Esta nueva distrofina acortada apareció hasta en un 80% de las fibras de los músculos tratados en los que emigro a su normal posición debajo de las membranas celulares y se mantuvo estable durante más de un año sin causar ninguna reacción inmune.

Los procesos distróficos en los músculos mdx, es decir su acelerada degeneración y regeneración, se detuvieron completamente. Los ratones-mdx tratados sistémicamente no desarrollaron el daño muscular usual encontrado en ratones mdx no tratados (13).

Hace cinco años, esta técnica de transferencia de genes-U7 fue entonces aplicada para el tratamiento del perro golden retriever el cual está realmente enfermo como un niño con Duchenne. Estos perros tienen una mutación en el sitio de empalme del exón 7, que puede ser "reparado" saltando los exones 6 y 8. Mediante el uso de un U7-snrRNA modificado conteniendo estructuras en antisentido en contra de los exones 6, 7 y 8, se obtuvo distrofina acortada casi en el nivel normal en muchos músculos después de las inyecciones locales en los músculos y con inyección regional sistémica en una pata con circulación bloqueada.

Ahora, 5 años después de estos experimentos, los resultados a largo plazo de este tratamiento fueron publicados por **Adeline Vulin, Aurélie Goyenvalle, Luis García** y

sus compañeros de trabajo (14). Después de este tiempo, la distrofina saltada estaba todavía presente en los 6 perros tratados, pero el número de fibras que contienen esta nueva distrofina había disminuido lentamente no por una respuesta inmune, pero probablemente por un proceso distrófico continuo tal como se produce en humanos la distrofia muscular Becker. La razón principal se debe probablemente al hecho de que la distrofina saltada *rescatada* no sólo tenía faltante el exón 7 delecionado, sino también, faltan los 2 exones 6 y 8 saltados, por razones desconocidas también el exón 9 que, sin embargo, no afecta el marco de lectura. Así, 158 aminoácidos determinados por los exones que faltan del 6 al 9 estaban carentes en la proteína. Son parte esencial de la estructura de unión a la actina en un extremo de la proteína que lo conecta con la red de estabilización de la actina dentro de las células musculares. Como esta conexión no es perfecta, puede contribuir al proceso de degradación del músculo todavía presente pero mucho más lento.

Los autores proponen que este salto de exón genético se podría utilizar en el inicio de una terapia a largo plazo, seguido por inyecciones normales de salto de exón unos años más tarde.

Después de esta técnica fue demostrada en 2004 para saltar el exón 23 en ratones mdx, que no están realmente enfermos, donde los investigadores aplicaron ahora el mismo método a los llamados ratones doble KO, que no tienen distrofina ni utrofina y, por lo tanto, están enfermos como los chicos con Duchenne (15). Después de una inyección intravenosa única de los virus AAV que llevan las secuencias en antisentido contra el exón 23 de los ratones unidas a un ARNsn-U7, cerca de los niveles normales de distrofina fueron re-almacenados en todos los músculos examinados, incluyendo el corazón. Esto dio lugar a una considerable mejora de sus funciones musculares, una normalización de la estructura muscular, así como una prolongación notable de su vida útil de aproximadamente 10 semanas a más de 1 año.

Los científicos han desarrollado ahora ARNsnU7's específicos para saltar los exones del gen de la distrofina humana con el fin de aplicar esta estrategia a los pacientes con DMD (16). También muestran que ARNsnU7's múltiples pueden ser entregados por estos virus-AAV modificados para permitir el salto de varios exones a la vez.

En conjunto, este trabajo representa un importante paso hacia la aplicación clínica en pacientes prevista para el 2015 por el Genethon junto con el Institut de Myologie y equipos de investigación en Nantes.

## Salto múltiple de exones.

La lista de Annemieke de 130 medicamentos de salto (5) contiene 77 de los que deben saltar un solo exón, y 53 que deben saltar dos exones. Esto significa que el 64% de todos los pacientes podrían beneficiarse del salto de un solo exón, y el 19% necesitaría el salto de dos exones.

Como he mencionado en la página 9, con el desarrollo de los siete saltos prioritarios en las listas de Prosensa/GSK y Sarepta de los exones 44, 45, 50, 51, 52, 53, y 55 se beneficiaría el 45.1% de todos los pacientes. Sólo algo de trabajo en fármacos de salto doble, aquellos que saltarían

dos exones vecinos o dos separados, se ha hecho hasta el momento - no hay ninguno en ensayos clínicos todavía - porque todo el trabajo en Duchenne y la gran inversión financiera de las tres empresas implicadas están dirigidos primero al desarrollo de los medicamentos prioritarios.

Cuando estos muestren que son tan seguros y efectivos que sean aprobados para su comercialización sin demora, se espera que los medicamentos para saltarse las mutaciones menos frecuentes y raras y más complicadas no tendrán que ir a través de una serie completa de ensayos y por

lo tanto necesitaran mucho menos tiempo y dinero.

**Primer intento de saltar los exones del 45 al 55 con 2' O-metilos.** Hay, sin embargo, una excepción a esta perspectiva, es decir, saltar más de dos exones con una mezcla, un cóctel, de varios oligos en antisentido:

En 2007, **Christophe Beroud** y sus colaboradores en la Universidad de Montpellier, en el sur de Francia publicó su predicción (17), que el salto de los 11 exones del 45 al 55 conduce a una distrofina acertada que produciría una distrofia Becker con síntomas muy leves o incluso sin síntomas distróficos en hasta un 63% de todos los pacientes con Duchenne. En efecto, varios pacientes de Becker se han descrito con una delección natural de estos exones del 45 al 55 que están apenas discapacitados.

En 2008, **Annemieke Aartsma-Rus** y sus colegas trataron de eliminar en cultivo celular estos 11 exones del ARNm de la distrofina de una persona sana y de 2 pacientes Duchenne. Sin embargo, un cóctel de oligos 2' O-metilos contra los 11 exones causaba procesos irregulares de empalme produciendo mezclas de saltos parciales y una pequeña cantidad de ARNm totalmente saltado. Los autores concluyeron que esta técnica no es suficiente para apoyar el desarrollo clínico del salto múltiple de los exones 45-55 en ese momento (18).

**Salto múltiple de exones en perros distróficos.** El siguiente paso fue intentar el salto de dos o más exones con un cóctel de oligos. En 2008/09, **Eric Hoffman** y **Terence Partridge** en Washington, **Shin'ichi Takeda** en Tokio y sus colegas desarrollaron un cóctel de oligos en antisentido 2' O-metilos y morfolinios para multi-omisión de exón en perros beagles distróficos CXMD (19). En contraste con los ratones mdx con sus suaves síntomas distróficos, estos perros tienen síntomas similares a Duchenne.

Estos perros distróficos tienen una mutación en el sitio de empalme del exón 7 en su gen de la distrofina que causa la pérdida del exón 7 en el ARNm y un cambio en el marco de lectura con un codón prematuro de parada poco después. Salto de los dos exones 6 y 8 restauraría el marco de lectura.

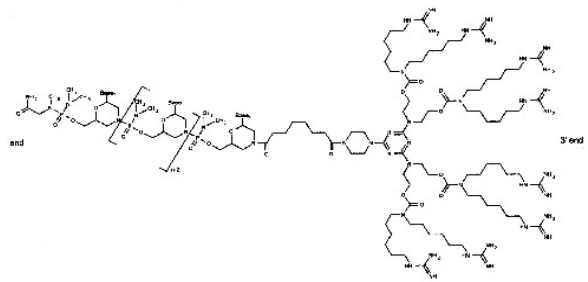
Un número de diferentes mezclas de 2' O-metilos y morfolinios se probaron en cultivos de tejidos hasta que la mezcla más eficaz se encontró, que contenía dos oligos contra el exón 6 y uno contra el exón 8.

Ambos tipos de cócteles de oligos produjeron, después de inyecciones locales en un músculo, hasta 80% de ARNm saltado y niveles casi normales de distrofina acertada. Sin embargo, no sólo los dos exones objetivos 6 y 8 eran saltados, sino también, por razones desconocidas, el exón 9, que es un exón en marco cuya falta no cambia el marco de lectura.

Para un tratamiento *sistémico*, realizado en Tokio, tres perros de 2 meses de edad fueron tratados con inyecciones de un cóctel de tres *morfolinios* en las venas de sus patas con inyecciones semanales por 5, 7, y 50 semanas. En todos los músculos esqueléticos probados, pero no en el músculo del corazón, nueva distrofina se encuentra en hasta el 50% del nivel normal. Como antes, el exón 9 se ha saltado también. El estado físico de los perros se estabilizó a como estaba antes del inicio del tratamiento.

Este tratamiento parece haber detenido la degeneración muscular. Por lo tanto, los oligos morfolinios en antisentido funcionan bien en un mamífero grande con una estructura de cuerpo similar a la de los seres humanos, y no son tóxicos.

**El salto de exón con vivo-morfolinios.** En 2009, los mismos grupos de investigadores en Washington y Tokio comenzaron a trabajar con otro tipo de oligos en antisentido, que fueron desarrollados con anterioridad por **Qi Long Lu** y sus colegas en el Centro Médico de las Carolinas en Charlotte, Carolina del Norte, EUA. A un extremo de un normal oligo morfolino, habían añadido una estructura ramificada de 8 grupos de guanidina.



Este morfolino octa-guanidino se llama **vivo-morfolino**. Su estructura le permite entrar en los músculos esqueléticos y también del corazón con una eficiencia muy alta.

Ratones mdx fueron tratados con vivo-morfolinios contra su exón 23, que contiene un codón de parada prematuro. Un tratamiento sistémico bi-semanal durante 10 semanas produjo hasta 50% nueva distrofina en todas las fibras de los músculos esqueléticos y en hasta el 10% de los músculos cardíacos, y también en los músculos lisos de los vasos sanguíneos y los intestinos. Las funciones de los músculos se han mejorado de manera significativa y no hubo efectos secundarios serios (20).

**Salto múltiple de exones en perros con vivo-morfolinios.**

Después de los resultados positivos del tratamiento de ratones mdx con vivo-morfolinios, los investigadores repitieron el salto de 3 exones en perros con un cóctel de vivo-morfolinios (21). Se usaron perros beagle de 3-5 meses de edad que ya mostraron síntomas distróficos leves y se les inyectó en cinco músculos diferentes con un mililitro de una solución que contiene 120 mg de una mezcla de 4 oligos vivo-morfolinios diferentes, dos de los cuales estaban dirigidos contra el exón 6 y dos contra el exón 8. Las biopsias musculares fueron realizadas 2 y 8 semanas después de la inyección.

Después de dos semanas, hasta el 70% de las fibras musculares contenían nueva distrofina, y después de 2 meses hasta 60%. Aunque sólo los exones 6 y 8 fueron atacados por los oligos en antisentido, el exón 9 se saltó también como en el anterior experimento.

Aquí está la explicación de Annemieke de por qué ocurre esto: "La razón es simple: el intrón 7 es de 110, 000 letras de largo, el intrón 8 tiene sólo 1,100. Así más a menudo el exón 8 y 9 se colocan juntos antes de que el exón 7 y 8 sean empalmados. Así que cuando se trata de saltar solo el exón 8, también se salta el exón 9, porque está



ligado ya al exón 8."

Los estudios de toxicidad, farmacocinética, y biodistribución no se realizaron después de estos experimentos en perros. Tendrán que llevarse a cabo antes que vivo-morfolinos similares se estén utilizando en ensayos clínicos con pacientes con Duchenne.

**Salto múltiple de los exones 45-55 en ratones mdx52 con vivo-morfolinos.** Poco después de sus estudios en perros con vivo-morfolinos, los mismos grupos de investigación en Tokio y Washington comenzaron los trabajos preparatorios del salto de todo el bloque de los 11 exones entre el 45-55 en pacientes con Duchenne, que, como he explicado antes, llevaría a una terapia para el 63 % de todos los pacientes (22).

Obviamente, los investigadores eran conscientes de los resultados más bien decepcionantes de Annemieke de tratar el mismo salto múltiple con oligos 2'O-metilol. Los investigadores japonés-estadounidenses por lo tanto seleccionaron vivo-oligos con secuencias que evitan las reacciones entre los oligos diferentes y también las reacciones mismas entre los dos extremos de un mismo oligo.

En primer lugar, experimentos con ratones había que hacer, pero no con los ratones mdx habituales, a los que debe saltarse su exón 23, sino ratones mdx52 especialmente criados, que tienen una delección del exón 52. Su producción de distrofina interrumpida se reanuda por el salto del exón 52, uno de los exones que deben saltarse en el enfoque multiexon.

Los experimentos comenzaron en el laboratorio con pruebas en miotubos de estos ratones. Una mezcla de 10 vivo-oligos en contra las secuencias ESE, potenciadoras exónicas de empalme, de los 10 exones 45-51 y 53-55 (no del exón 52) se utilizaron para saltar con el resultado de que todo el bloque de todos los 10 exones seleccionados fue saltado como se comprobó con la secuenciación de los ARNm's después del salto. *Y es sorprendente que no hubiera ARNm's parcialmente saltados.*

Los siguientes experimentos se realizaron en ratones mdx52 vivos de 45 semanas de edad que recibieron 1.5 µg (microgramos, 1.5 milésimas de miligramo) del cóctel de 10 vivo-oligos en un músculo de la espinilla. Después de 2 semanas, el 70% de las fibras musculares contenían correctamente la distrofina acortada sin los aminoácidos, cuyo código de palabras genética se encontraban en los 10 y un (52) exones saltados, estaban eliminados. Una vez más no

había productos parcialmente saltados, ni ARNm ni proteína. Y todas las proteínas del complejo distrofina estaban de nuevo en hasta un 100% de su nivel normal, excepto el óxido nítrico sintasa, NOS, que no es tan importante.

Entonces, estos ratones recibieron inyecciones sistémicas. Cinco inyecciones cada dos semanas por vía intravenosa se aplicaron con 12 mg/kg cada una con el resultado, que los músculos esqueléticos contenían sólo distrofina Becker en 8-15% del nivel normal y el corazón a 2%. Estos ratones tratados mostraron una mejor función muscular y más resistencia muscular. Los análisis de sangre no mostró ninguna toxicidad, y la actividad de la CK se redujo mucho.

La razón de la leve distrofia Becker en pacientes sin los exones 45-55 no se conoce. Pero se sabe que la distrofina de estos pacientes tiene una parte de la cadena de aminoácidos eliminada pero que no altera demasiado a su patrón de plegamiento. Esta podría ser la razón para su función más bien normal en la protección de las membranas celulares del estrés mecánico de las contracciones musculares.

**Ventajas de este salto 45-55.** Hasta un 63% de los pacientes Duchenne se beneficiarían de este salto múltiple. La distrofia muscular Becker resultante sería muy leve o incluso sin síntomas pero con un aumento de actividad de la CK. Este salto también podría mejorar más pacientes afectados de una Becker más seria, con delecciones en el marco de esta región. Mediante el uso de sólo uno o algunos de los vivo-oligos de esta mezcla, una terapia de salto podría ofrecerse a los pacientes que necesitan que uno o varios exones en esta región se salten. El paso siguiente y más importante ahora será el comienzo de los ensayos clínicos con pacientes.

Annemieke comenta: "Hay muchos desafíos para el salto múltiple de exones aún: Los vivo-morfolinos son tóxicos. Va a ser muy costoso desarrollar esta mezcla de 11 oligos (incluso usando otro química aparte de los vivo-morfolinos). No se sabe cómo las pruebas de seguridad tendrían que realizarse. Si algunas veces desea utilizar sólo 2 o 3 oligos de la mezcla, o simplemente un oligo de la mezcla para otra mutación, usted tendría que probar todo de forma individual, por lo que no se beneficia de tener una mezcla para varias personas. Si quieres desarrollarlo como una mezcla, no se sabe si se puede probar la mezcla o tienen que hacerse pruebas de seguridad individuales con los diferentes componentes".

## Salto de exón para duplicaciones, mutaciones puntuales y raras.

**Salto de exón para reparar duplicaciones.** Duplicaciones de uno o varios exones causan un desplazamiento del marco de lectura y ocurren en alrededor del 7% de todos los pacientes con Duchenne.

En principio, pueden ser reparadas por el salto de exón, además, si fuera posible eliminar un conjunto adicional de exones duplicados sin tocar el primero, el original conjunto de exones, la nueva proteína distrofina tendría el tamaño normal. Si suficiente nueva y normal distrofina fuera producida para detener la degradación muscular, este tratamiento de salto de exón no sólo será una terapia, sino una verdadera cura.

El problema es que los oligos en antisentido reconocen ambos conjuntos de exones que son exactamente el mismo. Así que si uno trata de saltar uno, ambos se saltarán. Para un solo exón duplicado, podría haber una salida, ya que en algunos casos, se puede saltar un tercer exón antes o después de los duplicados, y así restaurar el marco de lectura. Pero para las grandes duplicaciones, se hace muy complejo y por lo tanto es muy retador, y tal vez no sea posible en absoluto.

Un nuevo proyecto para corregir duplicaciones se ha iniciado por **Kevin Flanigan** y su equipo en el Hospital Infantil Nacional en Columbus/Ohio.

Como la duplicación del exón 2 es la duplicación más común de un solo exón en pacientes con Duchenne, un nuevo ratón de laboratorio se desarrolló que tiene tal duplicación del exón 2 en su gen de la distrofina y que desarrolla síntomas de una enfermedad muscular grave. Tan pronto como un número suficiente de estos ratones sean criados, experimentos en-vivo serán posibles para encontrar una forma de reparar esta duplicación.

Los investigadores ya han creado cultivos de células para experimentos de laboratorio con líneas celulares de pacientes con duplicaciones diferentes. Ahora están tratando de corregir estas duplicaciones con los oligos en antisentido habituales para salto de exón-, sino también con la técnica ARNsn-U7-AAV.

Este proyecto está siendo financiado por la Asociación de Padres Americana Cure Duchenne.

**Salto de exón para reparar mutaciones puntuales.** Mutaciones puntuales son pequeños cambios de una o varias letras genéticas en el gen mismo. Si la mutación ha añadido o eliminado una o dos letras, entonces el marco de lectura se desplaza. O una letra ha sido intercambiada en contra de otra, entonces el marco de lectura no se desplaza, pero el código de palabras ahora puede significar otro aminoácido.

Si este cambio no perturba la estructura de la distrofina, entonces no pasa nada. Pero si uno de los tres codones parada, TGA, TAG, o TAA, ha aparecido, entonces – a pesar que el marco de lectura no está desplazado - la síntesis de proteínas se detiene en tal señal de parada prematura, y el resultado es distrofia Duchenne.

A menudo, esto puede ser reparado al saltarse el exón que contiene el codón de parada si se trata de un exón en marco con los extremos entre los exones con codones enteros de modo que su falta no cambia el marco de lectura. O, si esto provoca un cambio del marco, entonces, en algunos casos, un exón vecino tendría que ser saltado de forma adicional.

El fármaco *Ataluren*, antes llamado PTC124, fue desarrollado por la compañía PTC Therapeutics en Nueva Jersey, EUA, porque parecía ser capaz de leer a través de estos codones de parada prematuros que han sido causados por mutaciones puntuales dentro de un exón. Pero las dificultades durante un ensayo clínico a gran escala han llevado a su interrupción precoz. En la segunda parte de este informe, voy a describir el estado actual de la investigación con el *Ataluren*.

## Salto de exón para los pacientes mayores.

Como ya he explicado, un tratamiento de salto de exón será más eficaz si se inicia muy temprano en la vida de un niño con Duchenne, cuando la mayoría de sus músculos todavía están presentes. Esta técnica es muy probable que sea capaz de ralentizar o incluso detener la degradación de las fibras musculares sobrevivientes, pero no puede hacer que las fibras musculares perdidas crezcan de nuevo. Sin embargo, como **Gertjan van Ommen** y **Annemieke Aartsma-Rus** han explicado en sus entrevistas, pacientes mayores, incluso cuando la enfermedad ha avanzado, también pueden desear tener sus músculos restantes esta-

**Salto de exón para reparar mutaciones raras.** En la página 9, introduje la lista de **Annemieke** de 130 grupos de pacientes que necesitan el salto de uno o dos exones y que salto de exón por ahora sólo se ha desarrollado para 7 de los 11 primeros grupos con las mutaciones más frecuentes. Estos medicamentos prioritarios de salto serán terapias para el 45% de todos los pacientes Duchenne. El restante 38% de todos los pacientes que también pueden ser ayudados por el salto de exón pertenecen a los otros 123 grupos de pacientes en los que no hay fármacos de salto que se estén desarrollando en este momento. La gran mayoría de ellos, a saber, 114 grupos, contienen sólo hasta el 1% de todos los pacientes, los 30 menores no más de ¡0.02%!

Si unos 400,000 niños y jóvenes con Duchenne viven actualmente en el mundo entero, 1% significa 4,000 y 0.02% 80 pacientes. Hay muy pocas posibilidades de que su medicamento de salto de exón sea desarrollado ¡dentro de su tiempo de vida!

En palabras de mi entrevista el año pasado de Annemieke: “este es otro problema, porque hay muy pocos pacientes en el mundo para cada uno de los más de 100 grupos de niños con mutaciones raras. Entonces es muy difícil desarrollar algo, incluso si usted quiere hacer ensayos clínicos, porque son tan pocos los pacientes se vuelve estadísticamente muy problemático.

Pero el problema es que la mayoría de los niños con mutaciones raras que tienen un diagnóstico adecuado se encuentran en el mundo desarrollado, y la mayoría de los pacientes viven en China y la India. Hay algunas partes de China y la India, donde el diagnóstico es muy bien hecho y la atención que se proporciona también. Sin embargo, para la mayoría la atención de los pacientes es, probablemente, menor que en el mundo desarrollado, no hay un diagnóstico, no se sabe su mutación, y probablemente ni siquiera reconocen la enfermedad. Creo que es el primer problema. Teóricamente puede haber más de mil pacientes en algunos grupos de niños con una mutación rara, pero no los conocemos”.

Por lo tanto, algo se debe hacer para cambiar esta situación, tengo una idea, por ejemplo, pedir a la organización Rotary International, a la que pertenezco, para ayudar a encontrar a los pacientes "no-conocidos" diciendo a los pediatras y médicos de familia en nuestra organización como estos pacientes se pueden encontrar y qué se puede hacer para ellos, especialmente en los países menos desarrollados.

bilizados lo que les permita llevar una vida plena a pesar de su discapacidad.

Gertjan dijo: “Creo que el salto de exón sería una mejora importante para los chicos, pero su vida no va a ser completamente sin discapacidad. Y cuando usted habla con pacientes con Duchenne, entonces muy a menudo, cuando ellos tienen como 10 a 16 años de edad, ellos entienden lo que está pasando y ven que los médicos piensan que lo único que quieren es vivir más tiempo.

Sin embargo, su deseo principal es ser capaz de moverse mejor, y mover sus músculos mejor, para poner sus

manos sobre el escritorio para que puedan usar la computadora y que se pueda utilizar por más tiempo. He visto chicos con Duchenne mayores que, incluso usando corticoesteroides, se vuelven demasiado débiles incluso para poner sus manos sobre la mesa para usar el teclado de la computadora. Y perder eso para ellos es realmente una gran pérdida. Y si se pudiera retrasar, entonces ya les ayudaría un poco.

Yo sé que hay proyectos en curso en las escuelas técnicas y las empresas donde dispositivos, "bio-robots", se están desarrollando para que ayude a los chicos y a los hombres jóvenes con Duchenne a hacer los movimientos que son demasiado débiles para hacer ellos mismos."

Y cuando le pregunté a Annemieke: "¿Realmente vale la pena prolongar la vida de los pacientes con Duchenne mayores y muy discapacitados con todos los métodos modernos de manejo médico?" Ella respondió: "Creo que es buena pregunta. Y sólo hay una persona a quien se le puede preguntar: el propio paciente. El paciente tiene que decidir si quiere o no tratamiento y atención. Desde nuestra perspectiva, sólo es capaz de mover el dedo o levantar el

dedo y mover los ojos, puede parecer una situación horrible. Pero sé que los pacientes que están en esa situación, y dicen: "mi vida es muy valiosa para mí, me gusta mi vida, y tengo una computadora, puedo ir al teatro, puedo ir al cine, puedo ir a los partidos de fútbol, y estoy feliz".

Creo que si un paciente es feliz y quiere vivir, entonces es su decisión. Pero si él dice: "Yo no quiero vivir, no quiero este tipo de vida", entonces también es su decisión. Y una vez que es un adulto, que puede tomar esta decisión, por no continuar con la atención. La actitud positiva de los pacientes con Duchenne te hace muy avergonzado por la queja que nos hacemos, mientras que somos capaces de caminar y de hacer todo, y este paciente sólo tiene tan poco, y pesar de esto, él está muy contento y feliz. Y si uno mira hacia atrás hace 20, 30 años, los pacientes con Duchenne no tenían ventilación asistida entonces. Ahora que la tienen y la calidad de vida mejora mucho, porque tener suficiente aire es muy agradable. No sólo la duración de su vida mejoró, sino también su calidad, y eso es lo que cuenta aun más."

## Una terapia en el futuro dependerá de la mutación personal de la distrofina.

Después de haber leído este informe, muchos de ustedes - las familias con niños con Duchenne y pacientes mayores con Duchenne mismos - me escribirán pidiendo que les explique de una manera personal cual enfoque de investigación podría conducir a un tratamiento posible, sobre todo que exón o exones se deberían de saltar. Sus cartas de e-mail vienen de todas partes del mundo, y en gran número después de haber enviado un nuevo informe a todas las cerca de 1,500 direcciones en mis listas de correo electrónico en Inglés, Alemán y Español. Y es sobre todo madres que a menudo escriben cartas desesperadas que necesitan atención especial, que a veces son el inicio de una extensa correspondencia.

Probablemente voy a ser capaz de darle una respuesta bastante detallada a sus preguntas, si usted me envía los resultados de una prueba genética con la información de la mutación en el gen de la distrofina de su hijo o de usted mismo, si es posible determinado con el método MLPA. Por favor, déjeme conocer de usted o su edad y su país de residencia.

Además de responder a sus e-mails, voy a mantener sus datos personales en mi lista de familias Duchenne ordenada por el exón o exones a ser saltados determinado por mí, o por el nombre de otro método terapéutico que haría posible ayudarlo. Por favor, comprenda que esta lista personal no es como una de las bases de datos oficiales de Duchenne que existen en muchos países y que son muy exi-

gentes y contienen información mucho más personal de la que tengo en mi lista que sólo contiene los datos mínimos que me permiten tener contacto con usted. ¡Le recomiendo a usted inscribirse en su registro de DMD nacional! He aquí una explicación de cómo se puede encontrar "su" base de datos: Vaya a la página principal de TREAT-NMD, [www.treat-nmd.eu](http://www.treat-nmd.eu), a continuación, a *Resources*, luego a *global patient registries*, entonces (a la izquierda) en *registries: patient information*, y luego en *national DMD registries*, y luego a su país y, finalmente, *clic para registrarse*. Allí encontrara instrucciones de cómo registrar y una enorme cantidad de información acerca de su registro nacional. Para facilitar las cosas, voy a mencionar en mis cartas personales el enlace directo a su registro, por ejemplo [www.treat-nmd.eu/registry/321/](http://www.treat-nmd.eu/registry/321/) para Argentina o [www.treat-nmd.eu/registry/340/](http://www.treat-nmd.eu/registry/340/) para México o [www.treat-nmd.eu/registry/348/](http://www.treat-nmd.eu/registry/348/) para España.

Permítanme decir al final que como tengo un título de doctor científico alemán, Dr. rer. nat., y no de medicina, Dr. med, no puedo aceptar ninguna responsabilidad legal por la información que estoy dando en este informe o en mis cartas. Por lo tanto, también debe consultar a un médico o genetista para comprobar y confirmar toda mi información. Y permítanme decir una vez más que usted debe inscribir a su hijo o usted mismo en una base de datos DMD tan pronto como sea posible y que por favor confirmarme por escrito vía e-mail que lo ha hecho.

## El futuro de mis informes.

**Otros enfoques de investigación.** En esta primera parte de mi informe he explicado todos los detalles de la técnica de salto de exón y su aplicación para la búsqueda de una terapia para distrofia muscular Duchenne. Pero no todos los pacientes serán capaces de beneficiarse en el futuro no tan lejano de la misma ya sea porque tienen una mutación que no puede ser reparada saltando uno o más exones, o

porque su mutación es tan rara que su fármaco de salto de exón no será desarrollado muy pronto.

Pero, como **Gertjan van Ommen** ha dicho en la entrevista que grabé con él el año pasado: "Hay terapias que se están desarrollando para Duchenne independientemente de la mutación, y sólo estoy mencionando dos de ellas: la mejora de la miogénesis, la generación de músculo, por la

inhibición de la miostatina, o encontrar un sustituto de la distrofina por el aumento de la utrofina. La fibrosis, el crecimiento de tejido conectivo en los lugares de las fibras musculares perdidas, es también una causa importante de debilidad muscular. Si se pudiera reducir la fibrosis, entonces tal vez usted podría dar a un paciente de Duchenne una enfermedad como la del ratón mdx, que tiene una forma mucho más leve de la enfermedad.

Así que realmente creo que varias de esas intervenciones farmacéuticas van a llegar y mejorar la condición del músculo. Y se pueden utilizar solas o en combinación con el salto de exón".

En la segunda parte de este informe, que estará listo dentro de unos meses, voy a describir las otras técnicas más importantes.

**Este es mi último informe.** Siento tener que decir que este será mi último informe, porque ahora tengo 82 años y realmente debo encontrar a alguien que pudiera continuar con mi trabajo de explicarle a usted y a muchas familias Duchenne de todas partes del mundo lo que los científicos en muchos laboratorios están haciendo por encontrar terapias o incluso una cura para la distrofia muscular Duchenne de su hijo. He tratado de encontrar una persona así, sin embargo, sin éxito hasta el momento.

Por favor, si conoce a alguien que sea capaz de continuar con mis informes de manera similar como lo he hecho durante 12 años, quién sepa de Duchenne y la investigación de Duchenne, que pueda escribir en inglés y otros

idiomas, y sabe o le gusta saber de los científicos y le gusta hablar con ellos, que tiene un montón de tiempo para hacer todo esto y, lo más importante, no necesitar ningún tipo de ayuda financiera, por favor pídale a él o ella que me escriba.

Pero hasta que encuentre a alguien, probablemente voy a escribir breves informes de vez en cuando si algo importante sucede, o simplemente actualizar este informe y voy a seguir respondiendo a todos los e-mails que me llegan de todas partes del mundo, con preguntas a menudo desesperadas sobre esta terrible enfermedad y qué se puede hacer contra ella.

Por lo tanto, estoy dando las gracias a todos los que me han ayudado a escribir los informes, especialmente a **Annemieke Aartsma-Rus** y a **Gertjan van Ommen** de la Universidad de Leiden, **Pat Furlong** del PPMD, **Kate Bushby** de TREAT-NMD, y los muchos científicos cuyo trabajo he descrito y quienes se aseguran de que no cometa demasiados errores. **¡Adiós a todos de ustedes!**



Dr. rer. nat. Guenter Scheuerbrandt  
Im Talgrund 2, 79874 Breitnau, Alemania  
e-mail: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de),  
Internet: [www.duchenne-information.eu](http://www.duchenne-information.eu)  
1 Febrero 2013

## Referencias

- (1) Li D, Yue Y, Duan D. Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PLoS One* 2010; 5; e15286
- (2) van Ommen GJ, van Deutekom JT, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10; 140-149.
- (3) Sarepta : Significant Clinical Benefit With Eteplirsen After 36 Weeks in Phase IIb Study for the Treatment of Duchenne Dystrophy. News Release, 24 July 2012.
- (4) Aartsma-Rus A, van Deutekom JCT, van Ommen GJB, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that conform the reading-frame rule. *Muscle & Nerve* 2006; 34; 135-144.
- (5) Aartsma-Rus A, et al. and van Deutekom J, van Ommen G-J, den Dunnen JT. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations; *Human Mutation* 2009; 30; 293-299.
- (6) Van Deutekom JC, et al. and van Ommen GJB. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007; 357; 2677-86. Hoffman, EP. Skipping toward personalized molecular medicine. *N Engl J Med* 2007; 357; 2719-22.
- (7) Goemans NM, Tulinius M, et al. and van Deutekom JC. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011; 364; 1513-22.
- (8) Kinali M, Arechavala-Gomez V, et al. and Bushby K and Muntoni F. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *The Lancet Neurology* 2009; 8; 918-928.
- (9) Cirak S, Arechavala-Gomez V, et al. and Bushby K, Muntoni F. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose escalation study. *Lancet* 2011; 378; 595-605.
- (10) Sarepta Therapeutics announces a continued benefit on walking test through 62 weeks in phase IIb open-label extension study of Eteplirsen in Duchenne muscular dystrophy. News Release, 7 December 2012.
- (11) Mendell JR, et al. and Weiss RB. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2012; 71; 304-313.



(12) Scheuerbrandt G, Lundin A, Lövgren T, Mortier W. Screening for Duchenne muscular dystrophy: An improved screening test for creatine kinase and its application in an infant screening program. *Muscle & Nerve*, 1986; 9;11-23.

(13) Goyenvalle, A, et al. and García L: Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 2004, 306, 1796-1799.

(14) Vulin A, et al, and Goyenvalle A, García L: Muscular function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping, *Molecular Therapy*, 2012, 20, 2120-2133.

(15) Goyenvalle A, et al. and García L, Davies K.E.: Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping, *Hum. Mol. Genetics*, 2012, 21, 2559-2571.

(16) Goyenvalle A, et al. and Garcia L, Davies KE. "Engineering multiple U7snRNA constructs to induce single and multiexon-skipping for Duchenne muscular dystrophy". *Mol Ther* 2012; 20;1212-21.

(17) Bérout C, Matsuo M, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation* 2007; 28; 196-202.

(18) Van Vliet L, et al. and van Deutekom JCT, van Ommen G-JB, Aartsma-Rus A. Assessment of the feasibility of exon 45-55 multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Medical Genetics* 2008; 9; 105

(19) Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, and Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Annals of Neurology* 2009; 65; 667-676.

(20) Wu B, et al., and Lu QL. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Molecular Therapy* 2009; 17; 864-71.

(21) Yokota T, et al., and Partridge T, Hoffman EP, Takeda S. Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther.* 2012; 22;306-15.

(22) Yoshitsugu A, Yokota T, et al. and Hoffman EP, Partridge T, Takeda S. Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109;13763-8.

#### **Traducción al Español:**

**Ricardo Rojas C.**

Email: [distrofiasmusculares@gmail.com](mailto:distrofiasmusculares@gmail.com)

Internet: [www.distrofia-mexico.org](http://www.distrofia-mexico.org)