

## Conferencia Anual de Distrofia Muscular, 13 - 16 Julio del 2006

### Acercamientos de Terapia para Chicos con Distrofia Muscular Duchenne.

**¡Enfréntela! ¡Vívala! ¡Cámbiela!** Éste era el título de la Conferencia Anual del Parent Project Muscular Dystrophy (PPMD) que tuvo lugar del 13 al 16 de Julio del 2006, en Cincinnati / Ohio/EUA. Treinta y seis científicos y especialistas expertos en enfermedades musculares presentaron, primero, reseñas sobre el conocimiento entero de distrofia muscular Duchenne y sobre los diferentes acercamientos para una terapia (¡Enfréntela!), seguido de recomendaciones para el manejo médico de nuestros niños enfermos (¡Vívala!), y, finalmente, sus más recientes resultados de investigación que se acercan más y más a un tratamiento eficaz (¡Cámbiela!). Yo, *Günter Scheuerbrandt*, un bioquímico de Alemania, se me pidió por *Patricia Furlong*, la fundadora y presidenta del PPMD, escribir este informe para usted, los chicos y sus familias, que desean estar al tanto de cada paso exitoso en el camino a un tratamiento eficaz.

El informe contiene los resúmenes de solamente las presentaciones científicas porque no soy un experto clínico. No es una publicación científica, está escrito en un lenguaje que usted podrá comprender. Las expresiones científicas más importantes son explicadas al inicio y las otras después, cuando son usadas por primera vez.

Todos los científicos cuyas presentaciones son parte de este informe, han tenido la oportunidad ver el borrador de mi texto y corregirlo si es necesario, y todos lo han hecho. Así que, debe haber pocos errores dejados.

Al principio de los resúmenes, estoy usando los nombres de los científicos sin sus títulos, la mayoría son profesores y todos tienen un postgrado o título médico o ambos. Y casi todos son jefes de laboratorios, eso quiere decir que tienen colegas y postdoctorados y estudiantes que trabajaban como un equipo en los proyectos reportados aquí, pero es imposible mencionar todos sus nombres.

Esta terrible enfermedad, la distrofia muscular Duchenne, lentamente abre su grillete, esto fue obvio después que escuchamos las presentaciones de tantos nuevos resultados de investigación. Está siendo conquistada paso a paso por personas dedicadas que trabajan para nosotros en muchos países. El siguiente texto le muestra por qué.

### Introducción

El informe empieza con mis párrafos con algunos hechos básicos para comprender cómo los genes hacen proteínas, por qué la distrofina es tan importante, cuales acercamientos de investigación son activamente seguidos, y cómo funciona la omisión de exón, actualmente - en mi opinión - el más avanzado de estos enfoques. En el encuentro, *Lee Sweeney* de la Universidad de Pennsylvania en Filadelfia, *Dominic Wells* del Colegio Imperial en Londres, y *Steve Wilton* de la Universidad de Australia Occidental en Perth dieron introducciones muy detalladas de estos cuatro temas. Incluí muchas de sus explicaciones, pero no todas en estos primeros párrafos para mantener las contribuciones de cada uno de ellos separadamente. Después de esta sección introductoria, la presentación de cada científico es resumida separadamente, en algunos casos con explicaciones adicionales.

**¿Cómo hacen proteínas los genes?** Los genes son unidades funcionales de material genético de **ácido desoxirribonucleico, ADN**. Su estructura parece una escalera de mano entrelazada, la *doble hélice*. Los niveles de esta escalera de mano constan de cuatro moléculas pequeñas

diferentes, las **bases**: *adenina, guanina, timina, y citosina* (abreviadas A, G, T, C). Por razones espaciales, los niveles pueden contener solamente dos tipos de combinaciones de bases, los **pares de bases** A-T y G-C. Por lo tanto, la **secuencia de las bases** sobre un pasamanos o hebra de ADN es **complementaria** a la secuencia de la otra. Esta secuencia de bases, o de "letras genéticas", es la información genética para el desarrollo y mantenimiento de un organismo viviente que es pasada de una generación a la próxima.

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, al **ácido ribonucleico pre-mensajero** o **ARNpre-m**, proceso llamado transcripción. La mayoría de los genes constan de regiones activas, los **exones**, que contienen la información para la creación de las proteínas, y de otras regiones "inactivas", los a menudo mucho más largos **intrones**, que no obstante pueden ser importantes para el control de la expresión génica. Después de la transcripción, los intrones son retirados del ARN pre-mensajero, y los exones son **em-**

**palmados** para formar el **ARN mensajero, ARNm**, que se traslada entonces a los **ribosomas**, la estructura sintetizadora de proteínas fuera del núcleo. Los ácidos ribonucleicos, los **ARNs**, usan la base U, *uracilo*, en lugar de la similar base T del ADN. 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 por sí mismo es logrado por los **spliceosomas**, un complejo de muchas proteínas y pequeños ARN's.

En el ARN mensajero, tres bases consecutivas, un **codón, tripleta**, o "palabra genética", especifican, con tres excepciones, uno de los 20 **aminoácidos** diferentes, de acuerdo con el **código genético**. No hay ningún espacio entre los codones. En los ribosomas, el código de palabras genéticas del ARN mensajero es leído y traducido en el lenguaje de las proteínas, las cuales están construidas de muchos, a menudo miles, de aminoácidos, sus componentes de construcción.

Las tres excepciones mencionadas son las tripletas UAA, UAG, y UGA, que son **codones de parada**, donde el ensamblaje de la proteína se detiene.

**El gen y la proteína distrofina:** Las distrofias musculares Duchenne y Becker son causados por una **mutación** o daño del **gen de la distrofina** que lleva la información para las diferentes formas de la proteína **distrofina**. Con una secuencia de 2, 220,223 bases, es con mucho el gen humano conocido más grande. Solamente 11,058 bases, el 0.5 %, en los 79 exones del gen de la distrofina específica la secuencia de los 3,685 aminoácidos de la proteína distrofina "normal" en los músculos esqueléticos. El gen tiene siete o posiblemente ocho diferentes **promotores**, secuencias de bases que regulan la unión de las proteínas y así, activar el gen permitiendo la transcripción de su información para producir finalmente su proteína. Debido a los muchos promotores y empalmes alternativos, muchas *formas diferentes* adicionales de distrofina existen, todas ellas son más pequeñas de la normal en los músculos. Éstas están ubicadas en los diferentes órganos, uno de ellos en el cerebro. Esta forma es solamente 32 % de largo de la normal, y también puede ser afectada por mutaciones. Esto podría ser la razón para los problemas cognitivos de algunos chicos con Duchenne.

**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 de 25,000 genes humanos, esta empaquetado en un núcleo celular de un diámetro de cerca de 0.01 mm solamente porque el material genético esta empaquetado muy apretadamente. 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 ellos colocados extremo con extremo en una línea recta cubriría sólo un centímetro. Y en un gramo de músculo, hay 114 mil millones moléculas de distrofina. Esto puede ayudar a apreciar la tarea de los científicos: parar detener la enfermedad, para hacer que los músculos funcionen otra vez, un gran porcentaje del número normal de las distrofinas tienen que aparecer otra vez después que el gen dañado no puede hacerlas más. Las nuevas distrofinas no tienen que tener la misma forma exactamente, pueden ser más

pequeñas, pero deben poder trabajar apropiadamente. ¡Y eso quiere decir que miles de millones de nuevas distrofinas tienen que volver a cada gramo de músculo, y un niño tiene muchos kilogramos de ellos!

**El papel de 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 los músculos, el tejido conectivo y los tendones, en una manera equilibrada que no los somete a demasiado esfuerzo.

La distrofina tiene más papeles: organiza la compleja estructura del complejo distrofino-glicoproteico y la ubicación de muchas otras proteínas. También regula procesos complicados como el mantenimiento de la cantidad correcta de calcio en las células y aquellas sustancias que controlan el crecimiento de los músculos. Muchos detalles de estas interacciones intrincadas entre numerosos componentes en una célula viviente todavía son desconocidos.

Los chicos Duchenne no tienen o tienen muy poca distrofina en sus fibras musculares. Cuando sus efectos protectores y organizadores están faltantes, la contracción del músculo causa la ruptura de las membranas musculares, y esto permite que cantidades grandes de calcio circulen en las fibras. El excesivo calcio activa enzimas como la *calpaína* y otras proteasas que deshacen las proteínas musculares e inician programas de muerte celular. Las consecuencias son una cadena de los eventos como la inflamación y la activación de fibroblastos que resultan en **fibrosis**, tejido cicatrizante, que disminuye la velocidad de regeneración del músculo y causa los típicos síntomas de los pacientes con Duchenne mayores.

Los chicos con distrofia Becker de progresión más lenta mayormente tienen cantidades menores a lo normal de distrofina y a menudo también más corta de lo normal. Esta todavía puede cumplir su papel, pero no trabaja tan eficazmente como la versión normal.

Pero no solamente los músculos esqueléticos sufren cuando la distrofina está faltante, como comentó **Andrew Hoey**, sino también los músculos lisos y cardíacos. El daño para los músculos de corazón causa cardiomiopatía, y la debilidad de los músculos lisos tiene muchas consecuencias, entre otros la habilidad reducida de los vasos sanguíneos a relajarse cuando el flujo de sangre aumenta resultando en problemas respiratorios y otros, y también el tracto gastrointestinal es afectado cuando la motilidad de los intestinos es reducida. Así que el cambio en sólo un gen puede afectar todo el cuerpo.

**Las mutaciones del gen de la distrofina:** Hay tres tipos

de mutaciones del gen de la distrofina: **deleciones**, si uno o mas exones enteros del gen están faltantes, **duplicaciones**, si partes del gen están repetidas, y **mutaciones puntuales**, si un solo par de bases esta cambiado, eliminado o añadido. Otras son inversiones y mutaciones en los intrones que modifican los patrones normales de empalmado. Como los codones de tres letras del ARN mensajero son leídos en los ribosomas uno después de otro sin interrupción, este **marco de lectura** no es alterado, cuando mutación elimina o añade codones enteros de tres pares de bases por vez. En este caso, el marco de lectura se mantiene **en orden** y la distrofina puede ser hecha todavía pero esta será más larga o más corta de lo normal.. Si este cam-

bio afecta solamente estructuras no-esenciales de la distrofina, puede ser en parte funcional y por lo tanto, da lugar a **distrofia Becker** menos severa.

Sin embargo, si la mutación cambiara el marco lectura por uno o dos pares de bases, el marco de lectura **pierde su orden**. Entonces, un número de aminoácidos incorrectos son incorporados en la proteína empezando en el sitio de la mutación hasta que finalmente un nuevo y **prematuro codón de parada** es alcanzado. La distrofina incompleta no puede cumplir su función normal, desaparece y la **distrofia muscular Duchenne** se desarrolla. Al final de este informe, la aparición de un codón de parada prematuro es mostrado en un ejemplo de omisión de exón.

## Las diferentes estrategias para una terapia de distrofia muscular Duchenne.

La investigación trata de desarrollar una terapia para distrofia muscular Duchenne con dos acercamientos genéticos o con muchas intervenciones farmacológicas diferentes.

El primer acercamiento genético es el intento de introducir nuevos genes de la distrofina en los núcleos de las células musculares que podrían entonces otra vez dirigir la producción de distrofina. Muchos experimentos en ratones han mostrado que esto puede ser conseguido usando un virus modificado, "domesticado" el **virus adeno-asociado**, AAV, como un transportador o **vector** para transferir las partes activas, los exones combinados - el ADNc - del gen de la distrofina en las células musculares. Pero el vector AAV no es lo suficientemente grande para contener el ADNc completo con todos sus 79 exones. Solamente ADNc's de un tercio del largo normal cabria ellos. Esto significa que la nueva distrofina también tendrá solamente un tercio de su tamaño normal. Si esta distrofina acertada tiene una de las estructuras que causan la benigna distrofia Becker, el efecto de tal tratamiento no sería una cura completa pero disminuiría la rápida distrofia Duchenne en una forma Becker más benigna con prácticamente una expectativa de vida normal. Como el reciente material genético no entra en los cromosomas de la célula, el gen de la distrofina mutado no es cambiado, manteniéndose donde esta en el brazo corto del cromosoma X.

El segundo acercamiento genético, la **omisión de exón**, tampoco toca el gen dañado. Este solamente interfiere en el procesamiento de la información genética desde el gen a

la proteína. El empalmado de los exones del ARNpre-m, para el ARNm, es alterado específicamente con el propósito de que sea interrumpido, y el mensaje *fuera del marco de lectura* sea leíble otra vez, *dentro del marco*. El resultado es el mismo que con la técnica de transferencia génica: distrofia Duchenne alentada a distrofia Becker. Un totalmente nuevo tipo de medicamento "fármacos genéticos", diseñado para cada paciente especialmente, haciendo esta alteración de información: los **oligorribonucleótidos en antisentido**.

Como ambos acercamientos genéticos son nuevos, la investigación debe seguir muy cautelosamente. Aunque es tentador empujar las nuevas terapias a la aplicación clínica rápidamente, es importante no cometer el error de comprometer la seguridad que podría hacer retroceder el campo de terapia-génica entero. Por lo tanto, en la aprobación de los procedimientos son muy estrictos y toman mucho tiempo.

El tercer acercamiento terapéutico trata de combatir las consecuencias no-genéticas de la ausencia de distrofina como la destrucción de músculo por enzimas destructoras de proteína, membranas con filtraciones, fibrosis, e inflamación. Hay varios fármacos, algunos de ellos ya en venta contra otras enfermedades, que se espera tengan efectos beneficiosos sobre distrofia Duchenne. En la sección sobre **acercamientos farmacológicos** los resultados de investigación más recientes son resumidos y los cuales fueron discutidos en la reunión.

## Omisión de Exón

La técnica de **omisión de exón** trata de cambiar una mutación Duchenne en una mutación Becker. Si una mutación altera el marco de lectura y causa por lo tanto distrofia Duchenne, el marco de lectura puede ser **restaurado** artificialmente retirando del ARN mensajero uno o más exones directamente antes o después de la deleción, duplicación, o el exón que contiene una mutación puntual.

Los exones pueden ser eliminados del ARNm con **oligorribonucleótidos en antisentido**, AONs. Ellos son cortas estructuras de ARN que constan de cerca de 20 nucleótidos cuyas secuencias son construidas en tal manera de que se unen solamente en la secuencia complementaria dentro del exón a ser removido o en sus fronteras y *en ningún lugar más*. En *antisentido* quiere decir que su secuencia bases está en el orden contrario a la secuencia

objetivo en el ARNpre-m. Estos AONs interfieren así con la maquinaria de empalmado con el fin de que los **exones seleccionados** no sean más incluidos en el ARNm por lo tanto, son *omitidos*.

*El gen mismo con su mutación no es alterado por la omisión de exón*, pero su ARNm no contiene más la información del exón o exones omitidos. Como este ARNm es más corto que lo normal, la proteína de distrofina es también mas corta, conteniendo menos aminoácidos. Si los aminoácidos faltantes forman parte de regiones no-esenciales de la distrofina, como los dominios de la varilla central (central rod), resultara una proteína más corta que puede a menudo todavía realizar su rol estabilizador en la membrana de la célula muscular. El resultado sería el

cambio de síntomas severos Duchenne a los síntomas muchos más leves de distrofia muscular Becker.

Los **oligonucleótidos** son piezas cortas de dos clases de ácidos nucleicos, ADN y ARN, (oligo significa pocos). Las dos hebras de **ADN**, el ácido desoxirribonucleico, constan cada una de una cadena de fosfato alternado con unidades de desoxirribosa, su estructura principal. La **desoxirribosa** es una molécula de azúcar con cinco átomos de carbono, y en el segundo átomo de carbono su usual átomo de oxígeno esta faltante. Cada unidad de azúcar lleva una de las cuatro bases "genéticas" en su primer átomo de carbono. En el **ARN**, el ácido ribonucleico, tiene unidades de **ribosa** normales en su estructura principal con un oxígeno en su segundo átomo de carbono. Los **nucleótidos** son los bloques de construcción en ambas clases de ácidos nucleicos. Cada nucleótido consta de una ribosa, una base y un fosfato. Así que hay cuatro diferente **ribonucleótidos** y cuatro diferente **desoxirribonucleótidos**.

Lo dos tipos de oligos o AONs usados en la omisión de exón, son oligorribonucleótidos protegidos con el propósito de que no sean destruidos en las células musculares por nucleasas, enzimas, que destruyen ácidos nucleicos.

Los científicos holandeses están usando los **20-metilfosfotioatos**, también llamados *metil-tioatos* o *20-metilos*. Ellos tienen un grupo metilo, un carbono con tres átomos de hidrógeno, unido al 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 grupos de fosfato. Los **morfolinós** que investigadores británicos-australianos están usando, tienen uno de los oxígenos del fosfato reemplazado con un grupo dimetil amido, un nitrógeno con dos grupos metilos, y las unidades enteras de ribosa son reemplazadas por anillos morfolinós, seis anillos unidos, cada uno consiste de cuatro átomos de carbono, uno de oxígeno y un átomo de nitrógeno con átomos de hidrógeno unidos a los carbonos.

Muchos más detalles sobre la omisión de exón son hablados en la entrevista con el Dr. *Wilton* al final de este informe. Y en la última página, la omisión del exón 46 para restaurar el marco de lectura después de la supresión del exón 45 es mostrado como un ejemplo de esta técnica.

**Omisión de exón: las primeras pruebas clínicas con niños con Duchenne en Holanda.** **Prosensa B.V.** es una compañía biotecnológica en Leiden en Holanda que actualmente desarrolla una terapia para distrofia muscular Duchenne usando la técnica de omisión de exón en cooperación con los Drs. *Gertjan van Ommen* y *Judith van Deutekom* del Centro Médico de la Universidad de Leiden. **Gerard Platenburg**, el presidente de Prosensa, anunció el 8 de mayo del 2006, que dos comités reguladores holandeses – el CCMO e IRB - dieron el permiso de "un estudio exploratorio sobre la eficacia, seguridad, y tolerancia de una sola dosis intramuscular de un oligorribonucleótido en antisentido, AON, para restituir la producción de distrofina". Esto abrió el camino para la *primera prueba de omisión de exón en humanos* que está comenzando ahora.

Para esta prueba, seis niños con Duchenne, de 8 a 16 años de edad, todos de Holanda, han sido escogidos. Tienen una mutación en el gen de la distrofina que causa un cambio en el marco de lectura que podía ser restaurado omitiendo el exón 51. Después de pruebas clínicas intensivas, incluyendo biopsias de piel, el fármaco potencial,

llamado AON 20-metilo que se dirige contra el exón 51 será aplicado en una inyección en un solo músculo, el tibialis: un músculo anterior de la espinilla. Los pacientes serán inyectados secuencialmente, p.e. solamente después de que ningún efecto secundario apareció en un chico el próximo chico será tratado. Cuatro semana después de la inyección, una biopsia de músculo será tomada y el material analizado para proteína distrofina acertada. El objetivo principal de esta primera prueba es probar que la omisión de exón es segura y trabaja en pacientes con Duchenne como se esperaba después de los muchos experimentos pre-clínicos exitosos con cultivos de músculo y animales. Incluso si la nueva distrofina es encontrada en el un músculo tratado, los chicos no tendrán ningún beneficio terapéutico de este tratamiento local.

Los investigadores holandeses han escogido los 2'-O-metilo-fosfotioato AONs, también llamados 2O-metilos, porque tienen extensa experiencia con este tipo de AONs, no sólo con inyecciones directamente en el tejido muscular sino también con la aplicación sistémica en animales vivos. Por ejemplo, después de repetidas inyecciones de 2O-metilo contra el exón 23 de ratón en la vena de la cola de ratones mdx, cantidades cuantiosas terapéuticas de distrofina acertada aparecían en todos los músculos esqueléticos y del corazón.

El hecho de que los 2O-metilos entran también en los músculos cardíacos es importante, porque no ha sido posible aún que la otra clase de AONs extensivamente evaluados, los morfolinós, lleguen al corazón.

También ha sido mostrado que los 2O-metilos son tomados más fácilmente por las células musculares distróficas que por las normales, presumiblemente porque hay "agujeros" en las membranas distróficas. En los ratones mdx, el efecto sistémico de omisión con 2O-metilos dura varios meses, que es una señal de que una futura terapia de omisión de exón tendría que ser repetida todos los meses posiblemente. Sin embargo, la dosis exacta y la frecuencia queda ser determinada.

Debido a los muy prometedores resultados sistémicos pre-clínicos, los investigadores holandeses ya están preparando el próximo ensayo clínico con chicos con Duchenne programado para el 2007, durante el que tratarán de omitir el exón 51 y 46 por la aplicación sistémica del AON 20-metilo apropiado.

Estas pruebas de corto plazo serán seguidas por pruebas a largo plazo, al menos probablemente seis meses en los que posiblemente podría disminuir la velocidad de los síntomas de Duchenne de los niños significativamente.

Los dos exones a ser omitidos en las dos primeras pruebas han sido escogidos, porque una exitosa omisión del exón 51 sería una terapia para hasta el 24 % de todos los chicos con Duchenne con delecciones, y omitir el exón 46 ayudaría a todos los chicos con una delección del exón 45, el exón más frecuentemente eliminado de pacientes de Duchenne (8 % de todas las delecciones).

En adición a los AONs para omitir los exones 51 y 46, Prosensa ha desarrollado y también producido cantidades suficientemente grandes otros cuatro 2O-metilos. Estos seis AONs permitirían tratar a más del 50 % de todos pacientes con delecciones.

Si todo se va según lo planeado, tomará aproximadamente cuatro a cinco años, hasta que los AONs 2O-metilo para la omisión del exón 51 y 46 esten listos para ser co-



mercializados como un tratamiento de Duchenne. Para el desarrollo completo de AONs adicionales se espera sea más rápido porque la experiencia con los primeros dos acortará considerablemente el tiempo para la aprobación y evaluación de los siguientes.

El Dr. Platenburg espera poder informar sobre los resultados de esta primera prueba de omisión de exón en el próximo encuentro del Parent Project en el 2007.

**Omisión de exón: Preparación de una prueba clínica con chicos con Duchenne en el Reino Unido.** En el Reino Unido, el consorcio MDEX fue creado para desarrollar la técnica de omisión de exón y realizar estudios clínicos, para así acortar tanto como sea posible el tiempo hasta que una terapia este disponible para todos los pacientes con Duchenne. Con el primer estudio clínico, los investigadores tratarán de omitir el exón 51 del ARN mensajero de la distrofina en nueve niños con Duchenne. Los miembros del consorcio son *Francesco Muntoni, Kate Bushby, Jenny Morgan, Dominic Wells, George Dickson, Ian Graham, Matthew Wood, y Jenny Versnel*, todos son activos en la investigación en Duchenne. El Ministerio de Salud y el Consejo de Investigación Médica del R.U. están también involucrados.

Uno de los miembros de MDEX, *Kate Bushby* de la Universidad de Newcastle una vez Tyne, habló de los detalles de la próxima prueba y menciona que al principio habrá cooperación cercana con algunos grupos de investigación fuera del R.U. y especialmente con el grupo holandés en Leiden. Varios años de investigación pre-clínica han mostrado que los *oligorribonucleótidos en antisentido*, AONs, pueden "forzar" al gen de la distrofina mutado a que haga una proteína más corta, una distrofina Becker, que haría los síntomas distróficos graves de chicos con Duchenne mucho más leves. Aplicaciones sistémicas de estos AONs para ratones distróficos vivos prácticamente "curaron" a estos animales de su enfermedad. Y como los AONs ya han sido usados por años para combatir otras enfermedades, se sabe que son seguros y no tóxicos. Estos resultados seguros han convencido a los científicos británicos de iniciar al final de este año un estudio clínico paralelo a los estudios que son llevados a cabo ya en Leiden.

Para la primera prueba de MDEX, varias decisiones ya han sido tomadas: el exón a ser omitido será el exón 51, porque muchas mutaciones Duchenne son deleciones entre los exones 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63, aproximadamente el 17 % de todas las deleciones Duchenne, podrían ser tratadas al omitir el exón 51. El AON a ser usado será el AON H51A, uno de los *morfolinos* desarrollado por el laboratorio de *Steve Wilton* en Perth en Australia contra el exón 51 humano. Nueve niños con Duchenne, de 12 a 18 años de edad, participarán. Tres dosis diferentes: 0.09, 0.297, y 0.9 mg del AON en 0.9 ml de solución será usado, aplicado en un volumen de 1 cm<sup>3</sup> de músculo con nueve inyecciones directamente en el tejido muscular. El músculo objetivo será uno de los dos músculos *extensor digitorum brevis*, EDB, en el exterior del pie que levantan los dedos del pie. Los seres humanos no los necesitan realmente y muchos no los tienen ni siquiera. Así que puede ser retirado el músculo sin consecuencias serias si algunos efectos secundarios inaceptables ocurren. Chequeos clínicos extensivos incluyendo biopsias serán hechos antes y cinco semana después de las inyecciones en

cada chico como es usual en los ensayos clínicos para valorar los resultados del tratamiento.

Los objetivos principales de la prueba son verificar que la administración local AON morfolino en un solo músculo humano sea segura y que eficaz en restituir por lo menos algo de la producción de distrofina. Se espera que con las diferentes dosis usadas, aparezca distrofina en más del 10 % de las fibras musculares. Esto permitiría conseguir resultados confiables y también calcular la cantidad total de AONs necesarios para tratar todos los músculos de un chico en un futuro tratamiento sistémico.

Los chicos participantes en esta primera prueba con morfollinos inyectado a nivel local no darán ningún beneficio terapéutico. Pero todos los resultados de esta prueba serán necesarios para un tratamiento real, para una aplicación sistémica de los potenciales fármacos para Duchenne en la circulación sanguínea de un niño para que todos sus músculos puedan ser alcanzados. Esta segunda prueba más importante está siendo planeada para el 2007.

**Omisión de exón trabaja en ratones y perros, pero todavía hay muchas preguntas que responder antes que la omisión de exón esté lista para los chicos.** *Terence Partridge*, actualmente trabaja en el Centro Médico Infantil Nacional en Washington planteó varias preguntas que deben ser respondidas tarde o temprano antes de que la omisión de exón pudiera volverse una terapia eficaz para chicos con distrofia Duchenne. E informó que en la omisión de exón en Japón demostró estar trabajando después de la inyección local de AONs en músculos de perros distróficos.

Sabemos que la omisión de exón en ratones mdx trabaja bien con AONs morfollinos contra su exón 23 inyectados sistémicamente en la cola de la vena. Por ejemplo, después de siete inyecciones semanales, los músculos lucen mucho mejores, no tienen más filtraciones sus células y por lo tanto, los valores de CK del serum sanguíneo se ponen casi normales. Pero no sabemos que tanto los AONs son distribuidos uniformemente en todos los músculos para que así mejoren todos al mismo tiempo. Ya sabemos que los morfollinos desafortunadamente no omiten el exón 23 en los músculos del corazón. De forma semejante, la otra clase de AONs, los 2O-metilolinos, también tienen un poco de problema en afectar los músculos del corazón. ¿Cuál es la razón para este fracaso?

¿Podemos administrar AONs en concentraciones suficientemente altas para que ellos sean eficaces y no-tóxicos durante la vida entera de un paciente? Podemos hacer experimentos en cultivos de tejido, pero los mismos resultados no pueden siempre ser esperados en animales vivos. Experimentos a largo plazo pueden ser hechos en animales. Pero debido a que los perros viven mucho más tiempo que los ratones y que los perros perdigueros dorados distróficos GRMD o CXMD realmente están físicamente incapacitados, los experimentos con perros darían resultados que podrían posiblemente ser muy similares a lo que uno después podría ver en estudios clínicos con pacientes con Duchenne.

Tales estudios con perros han empezado ahora en Japón en la Instalación General de Investigación Animal de Tokio bajo la dirección del Profesor *Shin 'ichi Takeda*.

Los perros distróficos tienen una mutación en el sitio de empalmado del exón 7 en su gen de la distrofina que causa

la delección del exón 7 en el ARNm y un cambio en el marco de lectura con una señal de parada prematura pronto mas adelante. Omitir los dos exones de los lados, el 6 y 8, restauraría el marco de lectura. Dosis diferentes de un cóctel de tres AONs morfolinos, dos diferentes de ellos en contra del exón 6 y uno en contra del exón 8, que fue preparado por el Dr. Toshifumi Yokota en Washington, fue localmente inyectado en el músculo tibialis-anterior de perros CXMD adultos jóvenes. Dos semanas después de la inyección, biopsias fueron realizadas. Cuando 1.2 mg de cada AON se disolvieron en un 1 ml de agua salada fue inyectado, nueva distrofina aparecía en todas la fibras del músculo alrededor del sitio de la inyección y parecían casi normales. Inyecciones sistémicas de AONs serán aplicadas en próximos experimentos de los investigadores japoneses que tienen "la perrera más grande en el mundo entero" en su institución.

Así que los AONs morfolinos trabajan bien en un mamífero grande con una estructura de cuerpo muy similar a los seres humanos, pero esto no es una garantía de que estos fármacos potenciales funcionaran tan bien y durante un suficiente largo tiempo en chicos con Duchenne. Por esta razón, los otros tipos de AON deben ser investigados también. El Dr. Partridge mostró las estructuras de nueve tipos diferentes de AONs. La mayoría del trabajo en los pasados años ha sido hecho con los morfolinos y los 2O-metilos, y los dos han entrado o pronto entraran a pruebas clínicas en chicos con Duchenne. Las dos pruebas simultáneas ahora empiezan en Holanda y el R.U. son de hecho

muy necesarias y su costo elevado está justificado, porque un tratamiento futuro de omisión de exón pudiera muy bien necesitar una mezcla de ambos tipos de AONs porque, p.e. los efectos tóxicos individuales de los dos tienden a ser independientes de sí, mientras sus efectos de omisión de exón serían aditivos. Y todavía problemas desconocidos podrían aparecer y en cualquier momento uno solamente sería capaz de resolverlo con otros cócteles de AONs, por ejemplo, una de las otras químicas podrían funcionar en el corazón.

Adicionalmente, el trabajo tendrá que empezar y luego continuar por mucho tiempo para escoger las secuencias de AONs más eficaces, para determinar la dosis más pequeña que todavía es suficientemente activa sin ser tóxica o causar respuestas inmunes, encontrar la manera más aceptable de aplicación, y finalmente lograr el tiempo entre los tratamientos sea el mas largo posible.

### ¿La omisión de exón será capaz de producir nuevos músculos en los pacientes con Duchenne más viejos?

**Dominic Wells** contestó: las células musculares todavía presentes serán estabilizadas cuando nueva distrofina sea hecha después de la omisión de exón. Las cosas no se pondrían probablemente peores. Que tanto esto también restablecería la función, nadie lo sabe. Posiblemente la combinación de la omisión de exón con un tratamiento farmacológico, p.e., con un fármaco anti-miostatina, sería muy eficaz. Los experimentos en ratones han sido empezados.

## Transferencia del gen de la distrofina.

La transferencia, o el transporte, de suficientes cantidades del gen de la distrofina intacto hacia el núcleo de células musculares distróficas sería una terapia eficaz para Duchenne si la información genética de los nuevos genes es usada por los sintetizadores de proteína, los ribosomas, de la célula para producir cantidades suficientemente grandes de distrofina funcional que emigre entonces a su lugar normal debajo de la membrana celular y unirse correctamente a las proteínas del complejo distrofino-glicoproteico.

Los equipos de investigación de *Xiao Xiao*, ahora en la Universidad de North Carolina en Chapel Hill y de *Jeffrey Chamberlain* en la Universidad de Washington en Seattle, son aquellos que trabajan más activamente en este campo de la terapia de génica para distrofia Duchenne. Los científicos empezaron su trabajo usando virus como los comunes *adeno-virus* de la gripe como vehículos de transporte, como vectores génicos. Para esta tarea, los virus fueron modificados de tal manera de que no pueden multiplicarse en las células que infectan, porque sus genes para esta multiplicación fueron retirados. En su interior entonces hay espacio para las secuencias codificadas de un gen terapéutico para ser transferido junto con ciertas secuencias de control. La secuencia necesaria para la producción de la proteína distrofina, p.e. el *ADNc* de su gen, es de 14,000 pares bases de largo, conteniendo todos 79 exones conectados unos con otros sin los intrones entre ellos. Los adeno-virus son muy efectivos para entrar en células musculares que no se dividen, y no entregan los genes transportados en el genoma de las células objetivo, manteniéndo-

dose en el núcleo fuera de los cromosomas. Esto quiere decir, que no hay riesgo de que los nuevos genes llegados se integren al azar en otros genes o secuencias de control donde posiblemente puedan interferir en su actividad o aun causar cáncer.

Sin embargo, los virus más eficaces para transferir *ADNc*'s de distrofina a los músculos son *los virus adeno-asociados*, AAV, que son aproximadamente diez veces más pequeño que los adeno-virus normales. Pero al ser tan pequeños, pueden transportar solamente material genético que no sea más largo que aproximadamente 5,000 pares de bases, aproximadamente uno tercio del *ADNc* de la distrofina entero. Por lo tanto, el *ADNc* de la distrofina normal tiene que ser acortado considerablemente para ajustarse a este pequeño vector. Los pacientes con la benigna distrofia muscular Becker tienen tales distrofinas acortadas en sus músculos. Una transferencia del *ADNc de tal mini-gen* no "curaría" la distrofia muscular Duchenne pero puede transformarla en algo como una forma Becker con mucha más lenta progresión.

Para determinar cuál de los cuatro dominios o regiones de la proteína distrofina normal - las dos regiones de los extremos, la rica en cisteína, o la de la varilla central - son importantes y cuales no, los científicos han creado muchos *ADNc*'s y diferentes proteínas acortadas de distrofina. E identificaron algunas versiones que eran muy funcionales y muy eficaces en los ratones *mdx* vivos. Estas mini-distrofinas artificiales carecen de la mayor parte de la parte central y el extremo terminal-C de la proteína normal. La transferencia de estos mini-genes seleccionados resultó en

una mejora de la función muscular y de todas las otras características distróficas de los ratones mdx. Además, la transferencia génica mostraba mejores resultados en animales más jóvenes, y, después de una sola inyección, la distrofina recién sintetizada quedaba en los músculos por un año y más.

**Primera prueba clínica de la transferencia del gen de la distrofina.** *Scott McPhee*, Vicepresidente de Desarrollo Clínico de la compañía **Asklepios Biopharmaceuticals** (Askbio) en Chapel Hill NC dijo que, hace 25 años, los fundadores de Askbio primero empezaron a trabajar con virus adeno-asociados, y basándose en su experiencia extensiva con este vector génico han desarrollado una nano-partícula biológica, BNP, con el nombre comercial *Biostrophin*<sup>TM</sup> para la transferencia de un gen de mini-distrofina para tratar la distrofia Duchenne. Una de sus prioridades es lograr completamente que la transferencia génica basada en el *Biostrophin* sea una terapia eficaz para distrofia Duchenne. Después de extensivas pruebas preclínicas incluyendo toxicología y estudios de biodistribución con animales, y después que el permiso de las agencias reguladoras fuera obtenido, la primera fase I de prueba clínica con seis chicos con Duchenne ha empezado. El propósito de esta prueba es determinar que la técnica no causa ningunos efectos tóxicos u otros secundarios, y ver si la mini-distrofina es hecha apropiadamente en los músculos de pacientes humanos. Este trabajo está siendo apoyado por la Asociación de Distrofia Muscular de EUA con 1.6 millones de dólares de subvención a Askbio. Si la fase I de prueba indica que el enfoque es seguro y bien tolerado, financiación adicional será pedida para estudios clínicos adicionales.

El vector usado en esta prueba es un virus adeno-asociado modificado de serotipo 2, llamado BNP2.5. El que contendrá una construcción de un gen de mini-distrofina que no contiene partes del exón 17, inclusive todos los exones del 18 al 59 y del 70 al 79. Eso significa que la esperada distrofina Becker será aproximadamente un tercio del largo de la proteína normal porque carece de las regiones R3 a R21 de la zona de la varilla central y el extremo terminal-C.

Esta primera fase-Ia de prueba es realizada bajo la supervisión del Dr. *Jerry Mendell* en el Hospital Infantil de la Escuela de Medicina en la Universidad de Ohio State en Columbus. La cual ha empezado el 28 marzo del 2006, cuando el primer chico recibió las primeras inyecciones de *Biostrophin* en tres sitios, separados 0.5 centímetros, en su músculo bíceps en un brazo mientras el bíceps del otro brazo recibió solamente solución salina. La prueba es hecha con el procedimiento doble-ciego, ni los pacientes ni los investigadores médicos saben hasta el final de la prueba entera en qué bíceps fueron inyectados los vectores.

Seis chicos con Duchenne que tienen al menos cinco años de edad y cuyas mutaciones del gen de la distrofina son precisamente conocidas, están participando. Dos dosis diferentes serán usadas para cada grupo de tres pacientes. La concentración del vector en los sitios de la inyección local es mucho más alta que aquella usada en siguientes pruebas cuando una entrega sistémica en los miembros enteros será intentada. Por lo tanto, será más fácil ahora ver los resultados del tratamiento y también cualquier efecto secundario inesperado como la inflamación o res-

puesta inmune. Si algunos problemas serios existen, será posible retirar el tejido muscular entero alrededor de los sitios de la inyección y parar el tratamiento prematuramente y completamente por lo tanto. Después de todo, los efectos de un tratamiento de transferencia génica de esta clase serán a largo plazo, por lo tanto cada paso de las pruebas tiene que ser hecho cautelosamente y con gran cuidado.

Uno y tres meses después de las inyecciones, muestras de tejido de los sitios de la inyección serán retiradas por biopsias musculares. Las muestras serán mantenidas congeladas hasta el final de la prueba entera cuando serán examinadas en busca de la presencia del nueva distrofina acortada.

Los resultados de esta fase-Ia de prueba estarán disponibles aproximadamente en la primavera del 2007. No habrá ningún beneficio terapéutico para los chicos participantes. La próxima, llamada fase-Ib de estudio está siendo preparada con perros y monos ahora. Esta fase de estudio será realizada aproximadamente en el 2008 y 2009 esperanzadamente. Esta vez, todo un miembro recibirá inyecciones de los vectores en un procedimiento quirúrgico similar al que ha sido desarrollado para la entrega de agentes de quimioterapia a través de circulación sanguínea temporalmente obstruida. Esta prueba de entrega regional puede brindar potencialmente un poco de mejora en la calidad de vida de los participantes. Finalmente, una fase II/III de prueba de entrega sistémica de cuerpo entero es planeada en el 2009/2010 con uno numero mas grande de pacientes que las fases de prueba tempranas. Si esto es exitoso, la progresión adicional de distrofia Duchenne de los chicos puede ser prevenida en lo que es esperanzadamente un procedimiento de una sola vez.

**La promesa de las células madre.** En su segunda presentación, *Terence Partridge* habló de la promesa insatisfecha de la investigación de células madre de dar una terapia para distrofia muscular Duchenne - con una excepción.

Las células madres pueden dividirse por períodos de tiempo indefinidos y tienen la habilidad en cada división celular de dar lugar ambas dos células a una célula madre similar así como a un tipo de célula más especializado. Por lo tanto pueden pasar por una *división celular asimétrica*, para mantener la población de ellas mismas más o menos constante y garantizar que las células más especializadas puedan continuamente ser reparadas durante toda la vida de un organismo.

Hay diferente clases de células madre humanas: Las primeras ocho células de un embrión humano son *células madre totipotentes*, porque cada una de ellas puede transformarse en cada tipo de célula del cuerpo. Cuatro a cinco días después de la fecundación, las células internas han formado las células del blastocisto, estas células son llamadas *células madre pluripotentes* o *células madre embrionales*. Ellas interactúan con otras y producen *células madres con linaje restringido*, *células madres adultas* cada una de ellas puede solamente formar uno o algunos de los tejidos especializados del cuerpo. Las células madre adultas para la formación y la reparación de células musculares son las *células satélite*.

Si el tejido muscular es dañado, las células satélite, que residen en el exterior de la célula muscular, se mueven al área dañada, se dividen y fusionan en miotubos que se

desarrollan entonces mas adelante en células musculares maduras. Algunas de las células satélite en el nuevo tejido muscular se dividen asimétricamente, y producen también nuevas células satélite que toman su lugar normal en el exterior de las células reparadas para estar listas cuando son necesarias para la próxima ronda de regeneración de las células musculares, las cuales son, p.e. degradadas por los procesos distróficos.

Las células satélite también pueden ser inyectadas, injertadas localmente, en músculos dañados donde actúan como células madre miogénicas reparando el tejido muscular dañado. Estas células pueden actuar muy rápido, en unos pocos días, unas pocas de ellas pueden producir varios miles de núcleos de células musculares que forman entonces fibras musculares enteras. Si estas células satélite externas vienen de un músculo normal con un gen de la distrofina intacto, el nuevo músculo entonces también contendría distrofina incluso cuando, como en los experimentos con ratones mdx, el tejido muscular circundante no puede hacerlo.

Pero para una terapia para Duchenne, la administración local en todos músculos con un número enorme de inyecciones, no sería un procedimiento terapéutico aceptable. La posibilidad de una administración sistémica con pocas inyecciones en la circulación sanguínea sería necesaria con el propósito de que todos músculos, incluso los del corazón y los pulmones, puedan ser alcanzados.

Por lo tanto, para una terapia eficaz de células madre para distrofia muscular, una fuente segura y éticamente aceptable de una cantidad grande de células madre de músculo adultas es necesaria, que daría lugar exclusivamente a células musculares y a nada más, especialmente no a tumores. Y debe ser posible aplicar estas células sistémicamente inyectándolas en el sistema de vasos sanguíneos que pueda distribuir las alrededor del cuerpo. Entonces ella tiene que cruzar las membranas de las células musculares, y quedarse allí sin crear algún problema local. Sin embargo, con una excepción, ninguna fuente de células madre ha sido encontrada que cubra todas estas condiciones en los experimentos con ratones mdx vivos.

La excepción mencionada son los *mesoangioblastos*, que son células madre adultas ubicadas en el exterior de los pequeños vasos sanguíneos dentro del tejido muscular. *Giulio Cossu* y sus colegas en el Instituto de Investigación

de Célula Madre de la universidad de Pavia en Italia llevaron a cabo recientemente un experimento básico cuyos resultados se volverán muy importantes para un tratamiento con células madre para varias distrofias musculares diferentes.

Ellos no usaron el ratón mdx como un modelo animal pero si un ratón cuyo gen para el alfa-sarcoglicano, una de las proteínas asociada al complejo distrofino, fue inactivado. Estos ratones tienen un tipo de distrofia muscular de cinturas (anillo óseo), LGMD, que es clínicamente algo similar a la distrofia Duchenne. Los investigadores italianos aislaron mesoangioblastos de ratones normales, los trataron con varios factores de crecimiento diferentes y luego los inyectaron en la circulación sanguínea de los ratones con LGMD. Estas células madre "sanas" eran capaces de emigrar a todos los músculos esqueléticos de los ratones vivos y causaron la reaparición de más del 80 % de la cantidad normal de alfa-sarcoglicano.

Para una posible terapia de Duchenne usando esta nueva técnica, genes intactos de la distrofina tendrían que ser trasladados a mesoangioblastos derivados del paciente por un procedimiento en cultivos de células con los conocidos vectores, entonces se multiplicarían en el laboratorio, y finalmente re-inyectados en la circulación sanguínea del paciente. Posiblemente, este tratamiento tendría que ser repetido periódicamente, por lo tanto es importante que estas células no sean identificadas por el sistema inmunológico como "no propias" y rechazadas.

Actualmente, este enfoque es el ejemplo más prometedor de células madre como una terapia para distrofia muscular Duchenne. Todas las otras células madre probadas en ratones vivos no dieron resultados impresionantes. El problema puede estar mas en el tejido muscular mismo que en las células madre así que los científicos tienen que encontrar la causa para estas dificultades.

El Dr. Partridge termino su charla con la advertencia de que hay varias declaraciones de células madre diferentes como terapias potenciales para distrofia Duchenne. En la mayoría de los casos, estas declaraciones no están bien fundamentadas. La biología del músculo está llena de trampas para el confiado y a veces incluso científicos experimentados pueden ser engañados por lo que creen que están viendo.

## Acercamientos Farmacológicos.

**Leer a través de los codones de parada prematuros.** Las proteínas son sintetizadas en los *ribosomas*, complejas estructuras que constan de tres largos ARN's con actividad enzimática, *ribozimas*, y aproximadamente 80 proteínas diferentes. La información para la producción de proteínas es traída a los ribosomas como ARNm's. Dentro de los ribosomas, la nueva proteína es ensamblada con sus componentes básicos, 20 aminoácidos diferentes. Estos son entregados al sitio de ensamblaje por otra clase de ARN, el de transferencia o ARNt, que reconocen las tripletas o codones del ARN uno después del otro. Cuando un codón de parada normal llega al sitio de la síntesis, significa que la proteína esta ahora lista para ser terminada, entonces proteínas especiales, los *factores de liberación*, entran en

el sitio de ensamblaje, deteniendo la síntesis y separan la nueva proteína terminada del ribosoma.

Aproximadamente del 10 % al 15 % de los chicos con Duchenne tienen una mutación puntual en su gen de la distrofina que transforma por un aminoácido un codón en uno de los tres codones de parada, TGA, TAG y TAA. En el ARNm, estos codones se vuelven UGA, UAG, y UAA y causan que la síntesis de proteína se detenga prematuramente, antes de que la nueva proteína, en este caso distrofina, sea ensamblada completamente.

El antibiótico *gentamicina* ha demostrado interfiere el mecanismo de traducción del ARNm en los ribosomas por lo que se ignora tal codón de parada prematuro, p.e. *lee a través del codón de parada*. En modelos animales con un codón prematuro en el ARNm de la distrofina, el trata-



miento con gentamicina ha demostrado inducir la lectura a través y ha restituido parcialmente la producción de proteína distrofina de largo normal y funcional. Sin embargo, gentamicina puede ser tóxica y debe ser aplicada por vía intravenosa así que su uso a largo plazo como tratamiento para distrofia muscular Duchenne no es práctico.

Si una mejorada técnica de lectura a través puede ser desarrollada como una terapia para distrofia muscular Duchenne, el subconjunto de pacientes con una mutación fuera de orden como base de la enfermedad sería posible se beneficien de ella. Sobre la base de estudios pre-clínicos en ratones, la cantidad de nueva distrofina hecha, no curará la enfermedad pero podrá cambiarla a una distrofia tipo Becker. Como la lectura a través no ocurre en el nivel del gen sino durante la síntesis de la proteína en los ribosomas, el tratamiento tendrá que ser tomado diariamente. Para determinar si un niño con Duchenne puede ser tratado con un fármaco de lectura a través, debe ser conocido que tiene una mutación puntual en su gen de la distrofina y que ha presentado uno de los tres diferentes codones de parada prematuros.

**PTC 124:** *Langdon Miller*, Jefe Médico Oficial de la compañía **PTC Therapeutics** en South Plainfield NJ informó del desarrollo y la prueba clínica del *PTC124*, un nuevo compuesto químico que es mucho más eficaz que la gentamicina en la lectura a través de codones de parada prematuros. Encontrar una terapia para distrofia muscular Duchenne y la fibrosis quística, basada en la lectura a través de codones de parada, son las dos prioridades de PTC.

Varios miles de compuestos químicos fueron probados automáticamente por su habilidad para leer a través de codones de parada prematuros en el ARNm de la distrofina o de la proteína CFTR, la proteína que está ausente en la fibrosis quística. Las estructuras de los compuestos más prometedores fueron entonces cambiadas a través de muchas variaciones químicas hasta que una fue obtenida, el *PTC124*, que es más eficiente que la gentamicina. En el proyecto con Duchenne, distrofina de largo normal aparecía en cantidades casi normales en cultivos de células o en hasta el 25 % de las fibras musculares de ratones mdx vivos después de la administración oral con un rescate sustancial de la función y estructura del tejido. Ninguna lectura a través de los codones de parada normales fue notada. Los estudios de toxicidad en ratas y perros con altas dosis dadas del fármaco generalmente no han mostrado efectos secundarios agudos o serios. Este fármaco potencial para Duchenne es un polvo que puede ser hecho en pastillas y tomado por vía oral.

En la primera prueba clínica del *PTC124*, dos pruebas fase I fueron llevadas a cabo en voluntarios adultos sanos. En estos estudios, el fármaco se mostró seguro y demostró pocos efectos secundarios. El año pasado una fase II de prueba con *PTC124* en 15 pacientes con fibrosis quística fue llevado a cabo. Mostraba que el *PTC124* era capaz de restituir parcialmente la actividad del CFTR en estos pacientes y no mostró ningunos efectos adversos serios.

En tres centros clínicos en los Estados Unidos, una fase II de prueba que evalúa el efecto del *PTC124* en pacientes con Duchenne esta ahora en marcha. Veintidós niños con Duchenne de 5-12 años con codones de parada prematuros en el gen de la distrofina participan en este estudio. El estudio fue diseñado para durar ocho semanas. Durante el

estudio, a seis chicos les fue dada una dosis menor de *PTC124* tres veces por día durante cuatro semanas seguido de un período de observación de cuatro semanas sin el tratamiento. Cuando no hubo ningunos efectos adversos otro grupo de 16 chicos recibió una dosis alta de *PTC124* durante cuatro semanas, otra vez seguido de cuatro semanas sin la droga. Para valorar el resultado de la prueba, biopsias musculares fueron realizadas antes y después del curso del tratamiento para evaluar la restauración parcial de la producción de distrofina de largo normal. Otras pruebas químicas y funcionales también serán hechas para medir cuantitativamente el efecto terapéutico del *PTC124* en chicos con Duchenne. Estos resultados estarán disponibles al final del 2006. Si son tan positivos como se espera de la fase de desarrollo preclínico, y si el permiso necesario es obtenido de las agencias reguladoras en Europa y los Estados Unidos, una fase III de prueba empezaría posiblemente el próximo año o en el 2008

**Aumento de la utrofina.** La utrofina es una proteína con una estructura y función muy similar a la distrofina. En seres humanos, su gen está ubicado en el cromosoma 6, tiene 75 exones y es aproximadamente un millón de pares de bases de largo. La proteína de utrofina es aproximadamente 7 % más pequeña que la distrofina. Está presente en muchos tejidos del cuerpo, también en el músculo, pero está concentrada en las regiones donde los nervios motores hacen contacto con la membrana muscular, las uniones neuromusculares. La utrofina existe en dos formas ligeramente diferente la A y B. Los músculos contienen solamente la forma A. Antes del nacimiento, la concentración de utrofina en el músculo es mucho más alta que después. Ratones mdx cuyo gen de la utrofina fue *inactivado* experimentalmente, y no tienen ni distrofina ni utrofina, tienen síntomas como de Duchenne y se mueren temprano en contraste con los ratones mdx "normales" cuyos músculos muestran un daño menos severo.

Experimentos con ratones han mostrado, que si la utrofina está presente en grandes cantidades, puede reemplazar a la distrofina. Estos ratones eran ratones transgénicos que contenían mini genes de utrofina en su línea germinal, introducidos por una técnica que no puede ser usada en humanos. Incrementando la cantidad de utrofina por un factor de tres a cuatro, el desarrollo de los síntomas distróficos podía ser prevenido y conducir a una recuperación funcional completa.

Ha sido encontrado recientemente que chicos con Duchenne que tienen leves cantidades más altas de utrofina en sus músculos pierden su habilidad caminar más tarde que aquellos con la cantidad baja normal. Ésta es una señal de la misma manera que utrofina creciente trabajaría en ratones y prevendría o retrasaría la degradación de los músculos.

Para una posible terapia para Duchenne, uno debe tratar de incrementar la baja cantidad de utrofina por el *aumento de la actividad* de su gen. Para conseguir esto, una sustancia activadora es necesaria, que bien puede ser un fármaco conocido, o algún otro químico o una sustancia natural, que reaccionaría con el promotor del gen. Las moléculas pequeñas de tal compuesto podrían probablemente entrar en las células musculares fácilmente, y si son fármacos conocidos, no necesitarían largos procedimientos de aprobación.

**Kay Davies** de la Universidad de Oxford, quien con su equipo ha sido pionera en la investigación de la utrofina como una sustitución de la distrofina por varios años, reporto que en cooperación con la compañía **VASTox plc.** en Oxford se buscaron miles de compuestos químicos por su habilidad de aumentar la actividad del gen de la utrofina en ratones mdx. La luz producida por la enzima luciferasa de luciérnagas fue usada en un sistema reactivo para probar su actividad. Varios candidatos prometedores fueron encontrados y los cuales ahora están siendo optimizados y evaluados en cultivos de células musculares y en ratones mdx vivos, para ver si pueden incrementar suficientemente la cantidad de utrofina en todos los músculos de los animales.

Uno de los compuestos activos más prometedores ya ha sido probado sistémicamente en ratones por inyección en el abdomen. Este reacciona solamente con el promotor de la forma-A de la utrofina, que está presente en el músculo. La utrofina-A en todos los músculos esqueléticos de los ratones evaluados pudo ser aumentada dos a tres veces, pero no es conocido aún, si la utrofina en los músculos cardíacos fue aumentada también. Después de 12 semanas de inyecciones semanales, los animales mostraron una recuperación importante de su función muscular.

Este compuesto activo está ahora siendo optimizado adicionalmente con modificaciones químicas. Las pruebas clínicas con pacientes con Duchenne están siendo preparadas y podrían empezar en el 2008.

**Inhibición de proteasas.** La degradación de proteínas musculares en la distrofia Duchenne es causada por varias diferentes proteasas, enzimas destructoras de proteínas, como la enzima calpaína, que es activada por el calcio, y un complejo grande de proteasas, llamado el *proteasoma*. Cuando, como en la distrofia Duchenne, las membranas celulares del músculo se agujeran porque la distrofina está ausente, iones de calcio, átomos cargados, desde afuera de las células activan la calpaína e indirectamente también el proteasoma. Esta actividad enzimática aumentada resulta en la destrucción extendida de importantes proteínas celulares que son requeridas para la función y supervivencia de la célula muscular. Inhibidores especialmente diseñados permiten a los investigadores bloquear la actividad de la calpaína y otras proteasas lo que puede retrasar la degradación de la célula muscular. El tripéptido modificado *leupeptina* fue el primer inhibidor identificado que podía reducir la actividad de la calpaína en ratones mdx. Este inhibidor de primera generación consta de tres aminoácidos, dos leucinas y una arginina, con la arginina se contiene a un químicamente reactivo grupo de aldehído que es esencial para la actividad inhibitoria. La leupeptina, sin embargo, también puede bloquear otras proteasas incluyendo las de la cascada de coagulación del plasma sanguíneo, causando efectos secundarios intolerables. Por otro lado podría ser deseable inhibir no sólo la enzima calpaína sino también el proteasoma.

**C101. Theresa Michele,** Vice presidente de Investigación Clínica de **CepTora Corporation** en Baltimore describió que combinando leupeptina con carnitina, un inhibidor llamado C101 es obtenido, que solamente entra en las células del músculo esquelético y el corazón. La razón

para esta precisión es que existe una proteína, el transportador de la carnitina OCTN2, que se une al C101 a su extremo de la carnitina y lo lleva a una proteína receptora sobre la membrana celular del músculo, que entonces transporta el inhibidor C101 al otro lado de la membrana en las células.

Para medir precisamente el efecto de un fármaco potencial como el C101, un nuevo método de prueba cuantitativo fue desarrollado que permitir el análisis de la degradación inducida por la calpaína de las proteínas de la célula muscular en animales vivos y posiblemente también en seres humanos. En esta prueba, la habilidad de la calpaína de partir la proteína de la célula muscular espectralina-alfa-II es medida. La calpaína usa dos pasos únicos para separar la proteína espectralina de dos proteínas más pequeñas, la SBDP150 y 145, que se filtran en la sangre y luego pueden ser analizadas en suero con anticuerpos especialmente diseñados. Esta nueva prueba fue diseñada para seguir el progreso de la degradación muscular y por lo tanto probablemente se volverá importante para los ensayos clínicos con pacientes con Duchenne.

Con esta nueva prueba, fue mostrado que el C101 podía inhibir la calpaína 50 a 100 veces más eficazmente que la leupeptina. También mantiene la estructura de los músculos e incrementa el diámetro de las fibras musculares en ratones mdx significativamente. El C101, que puede ser administrado de forma oral, por lo tanto es un fármaco potencialmente eficaz para tratar a pacientes con Duchenne.

**BBIC.** En su revisión de diferentes enfoques terapéuticos, **Lee Sweeney** mencionó el *inhibidor concentrado Bowman-Birk*, BBIC, que bloqueaba otras proteasas además de la calpaína que también participan en la destrucción de proteínas musculares. La sustancia activa en este concentrado es una proteína natural compuesta de 71 aminoácidos que puede ser aislada químicamente en forma pura de las semillas de soja (soya).

El tratamiento a largo plazo con BBIC incrementa la masa y la fuerza muscular en ratones mdx. Las actividades de la CK es reducida considerablemente y la fibrosis también. Y de otras aplicaciones en pacientes de cáncer es sabido que el BBIC es un fármaco muy seguro que puede ser dado de forma oral.

**SNT 198'438. Thomas Meier,** Jefe Científico Oficial de **Santhera Pharmaceuticals** en Liestal cerca de Basilea en Suiza, describió sus estudios preclínicos para el desarrollo de un inhibidor de doble-especificidad que puede bloquear simultáneamente la actividad de la calpaína y los complejos de enzimas del proteasoma. Empezando con un conocido inhibidor de la calpaína los científicos de Santhera han sintetizado cerca de 800 variantes químicas y evaluado estos inhibidores en experimentos bioquímicos y en cultivos de células, como en ratones mdx. Varios compuestos con las propiedades deseadas fueron identificados.

Uno de ellos, el SNT 198'438 fue optimizado posteriormente: Este puede ser administrado subcutáneamente, p.e., por inyección debajo la piel. Por lo tanto, actúa sistémicamente y alcanza y entra en todos músculos. En ratones mdx, donde es bien tolerado, este inhibidor normaliza los parámetros histológicos de los músculos y mejora el rendimiento del ejercicio de animales adultos. Esta prueba

de función es llevada a cabo en un gran "gimnasio para ratones" donde hasta 40 ratones pueden correr voluntariamente durante varias semanas en ruedas monitoreadas por computadora.

**SNT-MC17/idebenona para proteger las mitocondrias.** **Santhera Pharmaceuticals** está actualmente también desarrollando un fármaco potencial que protege las mitocondrias, las centrales de energía en las células donde el portador universal de energía, el adenosin trifosfato, ATP, es hecho por fosforilación oxidativa. **Thomas Meier**, en la segunda parte de su presentación, explicó que este compuesto, la idebenona, o SNT-MC17, estaba ahora en una fase III de prueba clínica para Ataxia de Friedreich en los Estados Unidos y Europa. La Ataxia de Friedreich es una enfermedad neuromuscular que esta relacionada frecuentemente con cardiomiopatía, una enfermedad grave del músculo del corazón.

El SNT-MC17/idebenona es un potente antioxidante con una estructura química obtenida de la coenzima Q10 natural. La estructura química optimizada tiene una mucho más corta y diferente cadena lateral que permite que la molécula entre más fácilmente en las células musculares que la coenzima Q10. El SNT-MC17/idebenona también ha demostrado facilita la producción de ATP en las mitocondrias. Puede ser dado de forma oral como una pastilla.

La ausencia de distrofina también afecta la fosforilación oxidativa negativamente en las mitocondrias de los músculos del corazón de los pacientes con Duchenne y probablemente en sus músculos esqueléticos también. Una fase II de prueba clínica bajo el método doble-ciego controlado por placebo con SNT-MC17/idebenona está actualmente en marcha en Bélgica bajo el liderazgo del Dr. **Gunnar Buysse**. El estudio ha reclutado totalmente a 21 niños con Duchenne entre 8 a 16 años de edad. El objetivo principal de este estudio es determinar el efecto del SNT-MC17/idebenona sobre la función muscular del corazón. Varias pruebas diferentes adicionales serán llevadas a cabo para detectar un posible beneficio funcional sobre la fuerza muscular en chicos con Duchenne tratados con SNT-MC17/idebenona. Los chicos están recibiendo la medicación del estudio tres veces al día en forma de pastillas que contienen SNT-MC17/idebenona o placebo por 12 meses.

Esta prueba es llamada " Estudio de Eficacia en Duchenne en Protocolo a Largo Plazo de Dosis Elevada de Idebenona ", DELPHI abreviado en ingles. Sus resultados estarán disponibles en aproximadamente un año.

Una entrevista con el Dr. Meier puede ser vista en la Internet en [www.duchenne-research.com](http://www.duchenne-research.com).

**Poloxamer 188, una "bandita adhesiva molecular" para cerrar agujeros en las membranas.** Un intento de rescatar células musculares del corazón en la cardiomiopatía abre una manera de cerrar los agujeros en las membranas del músculo distrófico. Este nuevo enfoque de una terapia para Duchenne fue informado por **Joseph Metzger** de la Universidad de Michigan en Ann Arbor. La ausencia de distrofina en ratones mdx como en niños con Duchenne no sólo afecta los músculos esqueléticos sino también tiene consecuencias graves para la función correcta de los músculos cardíacos.

El uso de un polímero especialmente diseñado, el *poloxamer 188* o p188, había mostrado influye positivamente

en la función del corazón de ratones mdx. Para medir exactamente este efecto protector en las células musculares del corazón mdx aisladas, células solas fueron conectadas en sus extremos con dos muy finas fibras de carbono móviles. Como las células de los músculos cardíacos son aproximadamente mil veces más pequeñas que las del músculo esquelético de ratones, la distancia entre las dos micro fibras de carbono puede solo variar entre 1.8 y 2.2  $\mu\text{m}$ , milésimas de un milímetro. De este modo, podía ser mostrado que, mientras que las células normales podían ser estiradas y relajadas durante muchas horas, las fibras mdx con una funcionalidad celular reducida, se resisten más a la extensión, y al hipercontraerlas, se separaban de las fibras de carbono y finalmente morían. Con este totalmente nuevo *método de prueba microscópico*, pudo ser mostrado que el p188 podía restituir la funcionalidad de las células musculares cardíacas de ratones mdx y también del perro GRMD distrófico. La aplicación del p188 en ratones mdx vivos bloquea su aguda insuficiencia cardíaca que podía ser medida con mini catéteres en los corazones de ratones vivos que latían aproximadamente 600 veces por minuto.

El P 188 es un co-polímero artificial, que consta de un núcleo de 35 pequeñas unidades hidrofóbicas, repelentes al agua, y dos alas de 75 unidades hidrofílicas cada una, estructuras que atraen al agua. El Dr. Metzger llamó esto un *albatros* molecular, cuya estructura central insoluble al agua tapa los agujeros de la membrana cuyo interior es también hidrofóbico, mientras que las dos alas hidrofílicas actuaban como los extremos pegajosos de una cinta adhesiva uniéndose a la superficie hidrofílica de la membrana intacta alrededor de los agujeros. Así que esta cinta adhesiva molecular cierra los agujeros por lo menos temporalmente, con el propósito de que ningún ion de calcio puede pasar activando la calpaína y otras enzimas degradadoras de proteína.

Es obvio, que este efecto protector del poloxamer 188 sobre los músculos cardíacos también puede ser importante para la reparación de las células musculares esqueléticas distróficas. Esto ha sido probado, no obstante los primeros resultados no eran tan buenos a lo esperado. Investigación sobre este enfoque esta ahora en marcha y puede resultar en otra posibilidad para una terapia de Duchenne.

**La inhibición de la miostatina:** La *miostatina* es producida en las células musculares como una proteína inactiva que consta de 375 aminoácidos. Después de algunos pasos de reordenamientos moleculares, se vuelve biológicamente activa. Y entonces inicia una serie de reacciones químicas dentro de la célula, que resultan en la inactivación de enzimas para la biosíntesis de nuevas proteínas musculares. Por lo tanto desactivando a la miostatina, regeneración de las fibras musculares de niños con Duchenne puede ser posiblemente estimulada con el propósito de que no sean destruidas tan rápido o incluso aumentar su tamaño.

Los ratones no-distróficos cuyo gen de la miostatina fue inactivado por métodos genéticos, tuvieron músculos esqueléticos hasta tres veces más grandes con significativamente más fibras de un diámetro mayor de lo normal. Hay un ganado vacuno, la raza azul belga, que es muy musculosa porque su gen de la miostatina fue desactivado por una mutación hace siglos. Y en Berlín, ahora un niño de 7 años de edad fue identificado cuyos músculos esqueléticos son cerca de dos veces mas grandes que en un niño nor-

mal. Es físicamente muy fuerte. Su madre era una corredora olímpica, y algunos otros parientes eran también muy fuertes. Debido a que una mutación en esta familia ha cambiado el normal empalmado de los tres exones de la miostatina, el niño y probablemente sus parientes afectados, también, tienen un muy bajo nivel de miostatina en sus músculos. Ésta es una indicación poderosa de que la inactivación de la miostatina resultaría en un aumento del crecimiento muscular en niños con Duchenne también.

**Myo 029.** *Kathryn Wagner* del Centro Wellstone de Distrofia Muscular en la Universidad Johns Hopkins en Baltimore informó que su equipo de investigación había criado ratones mdx que, en adición a no tener distrofina, tampoco podían hacer miostatina. Ratones adultos de estos animales sin miostatina tenían más músculos normales, tenían menos fibrosis y tejido cicatrizante, y regeneraron sus músculos más rápido que los ratones mdx "normales". Junto al Dr. *Lee Sweeney*, experimentos similares serán llevados a cabo en perros distróficos.

La cuestión ahora es que tanto la ausencia miostatina tendría efectos similares sobre el corazón. Esto podría interactuar con una cardiomiopatía, pero si es una hipertrofia, un agrandamiento del corazón, sería problemático en los chicos con Duchenne. Sin embargo, las investigaciones recientes con ratones mdx mostraban que el bloqueo de la miostatina no tenía ningún efecto sobre el corazón. Esto quiere decir que la actividad de la miostatina parece estar restringida solo a los músculos esqueléticos.

En cooperación con la compañía Wyeth Pharmaceuticals, una fase I/II de prueba clínica con tres dosis diferentes del fármaco potencial Myo 029 empezó con 36 pacientes con distrofia muscular adulta, inclusive algunos pacientes con Becker. El Myo 029 es un anticuerpo específico que se une a la miostatina y bloquea su actividad. No causa rechazo inmune porque su estructura de proteína es una humana, esta "humanizada". Puede ser inyectado en la circulación o bajo la piel.

Si la prueba da resultados alentadores, Wyeth intensificará sus esfuerzos de llevar el Myo 029 al uso clínico. Mientras tanto, los padres no deben comprar los supuestos inhibidores de la miostatina que se oferta en la Internet. Estos compuestos no han pasado por ensayos clínicos y son probablemente inútiles o incluso peligrosos.

**Aumento del factor de crecimiento similar a la insulina, IGF- I.** El IGF-I es una proteína con aproximadamente 70 aminoácidos en una cadena con tres puentes estabilizadores, con una forma similar a la insulina. Seis formas diferentes pueden ser producidas en seres humanos con estructuras ligeramente diferentes, pero resultando en la misma proteína IGF-I. El IGF-I es muy benéfico para el músculo, porque ayuda promover el crecimiento y la fuerza. Sin embargo, los efectos del IGF-I no se limitan a los músculos. Las células satélite, cuando se activan por daño o degradación, producen una proteína receptora específica en sus membranas, a la que el IGF-I se une. La consecuencia es una estimulación de la proliferación de las células satélite y su desarrollo posterior a miotubos y fibras musculares. Como esta regeneración estimulada de fibras musculares sería importante para el mantenimiento de los tejidos del músculo distrófico, el IGF-I es de interés para un posible uso terapéutico en chicos con Duchenne. Sin embargo,

otros tejidos también pueden responder al IGF-I, y cuando hay niveles altos en la sangre, hay riesgo incrementado de cáncer. Por lo tanto, para establecer el IGF-I como una terapia para la enfermedad muscular, estrategias deben ser desarrolladas para reducir los efectos secundarios potenciales en otros tejidos.

El equipo de investigación de *Elisabeth Barton* de la Universidad de Pennsylvania en Filadelfia trabaja con ratones que fueron obtenidos cruzando ratones mdx con transgénicos, p.e. manipulado genéticamente, ratones que producían niveles altos de IGF-I en sus músculos durante su vida. Estos ratones *mdx-IGF-mas* indican un aumentado crecimiento muscular con músculos que lucían muy sanos y con mucho menos fibrosis que los ratones mdx usuales. Este trabajo demuestra los beneficios que el IGF-I podría tener para chicos con Duchenne.

Pero ya que este factor de crecimiento interfiere con muchos vías de señalización en las células, potenciales efectos secundarios serios no pueden ser excluidos si dosis más altas son usadas para optimizar el efecto sobre el músculo. Por esta razón, un método fue desarrollado para "enmascarar" el IGF-I convirtiéndolo en un complejo con el receptor del IGF la proteína-3 que es una proteína naturalmente circulante en el flujo sanguíneo. Este complejo suelta el IGF-I solamente dónde y cuándo es necesitado, y ayuda estabilizar la proteína en la circulación con el propósito que pocas inyecciones sean necesitadas. Una formulación comercial de este complejo, llamada IPLEX™, esta siendo aprobada por la FDA para el tratamiento de deficiencias del crecimiento en niños debido a la deficiencia de IGF-I. Un primer ensayo clínico con IPLEX está siendo llevado a cabo ahora en la Universidad de Rochester con el soporte del NIH y la MDA de EUA con 15 pacientes adultos con distrofia miotónica. Una prueba para optimizar la dosificación seguirá en el 2007. Esta estrategia podía ser muy eficaz para llevar el IGF-I al músculo sin causar efectos secundarios en otros tejidos.

Otra manera de crear niveles altos de IGF-I en el tejido muscular sería al transporte su gen a los músculos en un vector como el virus adeno-asociado (AAV) que ordenaría a los músculos que hagan entonces mayor cantidad de IGF-I. Los primeros experimentos en esa dirección han sido hecho en el laboratorio del Dr. Barton que mostraban que solo una de las dos formas similares del IGF-I, concretamente el IGF-IA, eran eficaz en los ratones mdx al promover hipertrofia, el aumento de las fibras musculares. El trabajo actual con esta técnica consiguió incrementar el nivel de IGF-I entre 30 a 40 veces después de la inyección intramuscular de los vectores AAV que llevaban el gen del IGF-I correcto. El IGF-I recién sintetizado se quedó en el tejido muscular, no se escapó a la sangre, por lo tanto, los efectos secundarios causados por la activación en tejidos no-musculares podrían ser evitados. La terapia génica viral tomará varios años hasta que pueda ser probada en niños con Duchenne. Sin embargo, esta investigación ayudará identificar cuales formas de IGF-I son mejores para distrofia muscular.

**Proyecto Catalyst: Buscar nuevos fármacos automáticamente.**

*Ellen Welch*, jefe de un grupo de investigación en PTC Therapeutics en South Plainfield NJ presentó el Proyecto



*Catalyst*, que fue empezado hace dos años y que es soportado por el Parent Project. Esto es un ejemplo de cómo una pequeña dedicada compañía usa las técnicas automatizadas más modernas para encontrar entre cerca de 200,000 compuestos de bajo peso molecular unos pocos que pudieran posiblemente ser candidatos para fármacos que podrían hacer lo que fue hablado en los tres párrafos previos: aumento de la utrofina, disminución de la miostatina, aumento de la isoforma muscular específica del IGF-I, y, además, aumento de la alfa-7-integrina.

La experiencia durante el desarrollo del PTC124 para leer a través del codón de parada ayudó optimizar los métodos de detección automáticos para modular la actividad de todas las cuatro moléculas objetivo de fármacos. El procedimiento de prueba mide las actividades basado en un sistema de reporte de proteína: las diferentes secuencias reguladoras encontradas en los extremos de los ARNm's objetivo (conocidos como regiones sin traducir [UTRs]) para cada uno de los cuatro objetivos fueron combinadas con el gen de la enzima luciferasa que causa la luz de las luciérnagas normalmente. Este concepto de luciérnaga fue introducido en las células de riñón en tal manera de que en presencia de un compuesto activo, la intensidad de la luz de la luciferasa reportara su incremento o reducción. La vasta mayoría de compuestos inactivos no cambiarían la intensidad de la luz significativamente. Medir precisamente y automáticamente la intensidad de la luz en un muy pequeño volumen de una muestra de preparado es mucho más fácil que analizar el efecto biológico de los objetivos utrofina, miostatina, IGF-I, y alfa-7-integrina.

Dos búsquedas de alto-caudal fueron realizadas para cada uno de los cuatro objetivos. Entre los 200,000 compuestos probados varios pudieron ser identificados que aumentaban la utrofina, IGF-I, o alfa-7-integrina, o que disminuían la miostatina. Todos estos "aciertos", o compuestos con por lo menos algunas de las propiedades deseadas, están ahora siendo optimizados cambiando su estructura. Esto ocupara a muchos químicos durante varios años. Por ejemplo, para la optimización del fármaco que lee a través, PTC124, aproximadamente 4,000 modificaciones químicas fueron hechas a la estructura activa originalmente identificada durante dos años de trabajo en el laboratorio.

Los próximos pasos en el desarrollo preclínico de nuevos fármacos potenciales para Duchenne también tomarán varios años. En adición a los cambios estructurales, habrá una investigación detallada de las propiedades biológicas de las moléculas más activas incluyendo estudios en cultivos de células y en ratones vivos de la posible toxicidad, del metabolismo, y del comportamiento farmacocinético, p.e., de los cambios bioquímicos dentro de un organismo vivo que pueden producirse, pero esperemos no, efectos secundarios indeseables.

La prueba clínica en pacientes con Duchenne de las sustancias más prometedoras seguirá entonces y requerirá algunos años más.

**Inhibición del TGF-beta.** En la primera parte de su presentación, *Andrew Hoey* de la Universidad de Southern Queensland en Australia explicó el papel de la fibrosis y lo que posiblemente puede ser hecho para impedirlo o reducirlo.

La fibrosis, o creación de tejido cicatrizante, es causada por la producción excesiva de tejido conectivo y su deposición entre las fibras musculares esqueléticas y cardíacas reemplazando las fibras degradadas y perdidas. Bajo circunstancias normales, el tejido conectivo mantiene las fibras musculares juntas, pero en niveles aumentados resultan en la rigidez muscular y contracturas. El tejido conectivo consta principalmente de la proteína colágeno, una molécula no muy elástica que es generada por células, llamadas fibroblastos. Esta se produce durante el proceso de degeneración y regeneración en la distrofia muscular Duchenne bajo la influencia de factores de crecimiento, entre estos el *factor de crecimiento transformante beta*, TGF-beta.

El TGF-beta promueve la síntesis y fusión de diferentes moléculas de colágeno para producir el tejido conectivo poco flexible. Por lo tanto, impedir la actividad del TGF-beta podría ser un mecanismo posible para reducir la fibrosis. Un fármaco así que puede tener potencial es la *pirfenidona* que es un tratamiento aprobado para el tratamiento de fibrosis en los pulmones. A ratones *mdx* viejos de ocho meses se les fue administrado este fármaco y después de siete meses de tratamiento se observaron niveles reducidos de TGF-beta y restauró la función del corazón casi a la normalidad, pero la fibrosis no se redujo en estos ratones *mdx* viejos. La posibilidad de que este fármaco sea más eficaz en ratones más jóvenes será revisada en futuros experimentos.

**L-arginina y ONSn.** En la segunda parte de su presentación, *Andrew Hoey* habló de otra consecuencia de la falta de distrofina, la cantidad reducida de un componente particular del complejo distrofina-glicoproteico, la enzima *óxido nítrico sintasa neuronal*, ONSn. Esta enzima produce óxido nítrico, ON, del aminoácido L-arginina. Aunque el ON es un gas, actúa como una hormona y regula, entre otros efectos, la dilatación de los vasos sanguíneos lo que es importante para el suministro normal de sangre y por lo tanto de la energía para los músculos. Cuando el ONSn está faltante fibrosis cardíaca se desarrolla y esto podría ser la causa de la fibrosis incrementada en corazones de ratones *mdx* y también de pacientes con Duchenne.

La administración diaria de L-arginina por 6 meses comenzando en ratones *mdx* de 6 meses de edad redujo la fibrosis en sus corazones, incrementó el flujo de sangre coronario y mejoró su función del corazón. En experimentos en curso, el mecanismo de este efecto de la L-arginina está siendo investigado antes de que mucho trabajo adicional pueda estar hecho para ver si la L-arginina puede volverse un fármaco para niños con Duchenne.

**Bloquear agentes inflamatorios.** La degradación y muerte de células musculares causan procesos inflamatorios que limpian los restos de las células. Los corticosteroides pueden suprimir la inflamación, y esto es probablemente una de las razones por la que el fármaco *prednisona*, una forma activa de la *prednisolona*, y el relacionado *deflazacort* pueden incrementar la masa y fuerza muscular y reducir la respuesta inmune, sin embargo a menudo con algunos efectos secundarios indeseables. Están siendo usados extensamente en chicos con Duchenne para mantener la función muscular por lo menos algunos años. Pero su mecanismo exacto de su efecto todavía no es bien conocido.

**Sylvia Lopez** una estudiante postgraduada en el Laboratorio de la Dra. **Melissa Spencer** en la Universidad en Los Angeles informó sobre nuevos experimentos para contrarrestar la inflamación y la respuesta inmune y encontrar nuevas maneras de reemplazar los corticoides con fármacos cuyo blanco específico sea el daño mediado por el sistema inmunológico.

Estudios han mostrado que niveles aumentados de las células T: CD4 y CD8 del sistema inmunológico aceleran la evolución de la enfermedad y que su inhibición reduce los algo leves síntomas distróficos de ratones mdx y muy significativamente de los mucho más graves síntomas de los ratones muy enfermos utr-/mdx que en adición a la distrofina faltante tampoco tienen alguna utrofina. Esto también extiende la duración de vida de estos ratones mdx sin utrofina.

Adicionalmente, la cantidad de citocinas, moléculas que promueven la inflamación y el desarrollo de fibrosis, esta incrementada en los músculos mdx y Duchenne. Por lo tanto, la inhibición o remoción de las células T CD4 y CD8 y también la modulación de citocinas activas disminuirían posiblemente la velocidad de la degradación de los músculos distróficos. Un número de fármacos anti-inflamatorios aprobados o potenciales ya existen. Si estos pudieran mostrar que influyen positivamente en la distrofia Duchenne, el tiempo para la aprobación adicional para el tratamiento de DMD podría ser acertado considerablemente.

Tres de los fármacos están siendo ahora evaluados en el laboratorio de la Dra. Spencer para ver si serían benéficos para los pacientes con Duchenne. Estos ya están siendo probados en ensayos clínicos para otras enfermedades: el *CTLA-4Ig* en contra de la artritis reumatoide, para la *Galectina-1* están siendo presionados ensayos clínicos para la artritis y ya ha demostrado mejora la regeneración muscular, y el *GM1 anti-asialo* un anticuerpo esta siendo usado en el mal de Parkinson – por nombrar algunas de las enfermedades objetivo.

Las pruebas de otros cuatro fármacos que seguirán: *Raptiva*®, aprobado para la soriasis; *Tisabri*®, aprobado para la esclerosis múltiple y la enfermedad de Crohn; *Remicade*® y *Enbrel*®, ambos aprobados para artritis reumatoide y otras enfermedades.

Estudios de tratamiento a largo plazo serán necesarios para determinar si estos fármacos pueden volverse terapias para distrofia Duchenne y por lo tanto poder mejorar la calidad de vida para pacientes con Duchenne.

**Biglicano.** Al final de la conferencia como "noticia de último momento", **Justin Fallon** de la Universidad Brown en Providence RI describió un descubrimiento inesperado que podría conducir a una terapia para distrofia muscular Duchenne. Su laboratorio en los ocho años anteriores ha estado trabajando en la proteína *biglicano (biglycan)* extracelular, BGN. Esta proteína hasta ahora algo desconocida conecta los dos extremos de las proteínas sarcoglicanos alfa y gamma del complejo en el exterior de las membranas de los músculos esqueléticos. En experimentos con ratones cuyo gen para el BGN fue eliminado, fue descubierto que la cantidad de varias proteínas del complejo distrofino eran reducidas. Tratar a estos ratones con inyecciones locales y sistémicas del BGN resultó en la reaparición de sintrofina-beta, que fue una señal de que el complejo distrofino fue restituido. El biglicano pareció ser particularmente importante en los ratones juveniles en el momento cuando el músculo no necesita distrofina, pero depende bastante de la utrofina.

El muy reciente trabajo presentado en la reunión mostraba que el biglicano también podía ser administrado a ratones mdx donde tuvo efectos positivos en contrarrestar la patología distrófica del músculo. Debido a que el BGN está normalmente presente en concentraciones bajas en ratones no aparecieron reacciones inmunológicas, y no serían esperadas tampoco en humanos. Los sarcoglicanos alfa y gamma están solamente presentes en los músculos esqueléticos y cardíacos. Y debido a que el BGN se une a estas dos proteínas, podría estar activo principalmente en estos dos tipos de músculos, y por lo tanto tendría efectos secundarios mínimos.

Los experimentos con animales continuarán para optimizar las condiciones del tratamiento. La fase I de pruebas clínicas entonces podría ser empezada en dos años con este nuevo fármaco potencial inesperado para Duchenne: biglicano.

## ¿Por qué el ratón mdx no está realmente enfermo?

**GAMT.** Esta pregunta fue hecha por **Brian Tseng** y su equipo de investigación en la Universidad de Colorado en Denver. El ratón mdx no tiene proteína distrofina debido a un codón de parada prematuro en el exón 23 de su gen de la distrofina, sin embargo no muestra características clínicas incapacitantes de la distrofia muscular Duchenne humana, ¡es excepcionalmente sano! Por ejemplo, corre aproximadamente 5-6 Km. por noche todas las noches en ruedas para ratón voluntarias. Vive casi dos años, tanto como los ratones normales. Si observa juntos a un ratón mdx no puede ser distinguido de un ratón normal. El ratón mdx muestra algunas características de laboratorio de la enfermedad de Duchenne, p.e, altos niveles de CK en el suero, núcleos celulares centralmente ubicados; fibrosis ligeramente incrementada, y un diafragma algo seriamente afectado aunque insuficiencia respiratoria no es vista.

¿El ratón mdx podría enseñarnos cómo desarrollar estrategias de tratamiento para una forma más benigna de distrofia muscular distrofino-deficiente? El Dr. Tseng cree que hay *genes modificadores* que están más activados en el ratón mdx, pero inactivos en niños con Duchenne. El aumento de la utrofina, células satélite, fibras revertantes, y disminución de la miostatina son los efectos de un gen modificador que son expresados en paralelo tanto en ratones mdx como niños con distrofia Duchenne. El Dr. Tseng está más interesado en estudiar los genes que son expresados en direcciones opuestas en ratones mdx versus niños con Duchenne. Como probablemente hay otros genes modificadores que causan los diferentes síntomas de la enfermedad, el Dr. Tseng y sus colegas buscaron con las técnicas de búsqueda automáticas a gran escala en el nivel

del ARNm entre 30,000 genes del músculo esquelético de ratón mdx adulto comparado a ratones normales.

Ellos encontraron 45 genes más activados que, en contraste, estaban inactivados en chicos con Duchenne. Dos de ellos parecían muy prometedores: los genes de las enzimas *Arginina:glicina amidotransferasa*, AGAT, y *guanidinoacetata metiltransferasa*, GAMT, que son necesarias para la biosíntesis de creatina, un compuesto de bajo peso molecular que tiene un papel importante para el suministro de energía química para la contracción del músculo y la salud celular. En el ratón mdx, ambas enzimas están aumentadas así que el ratón mdx puede hacer creatina en sus músculos. El Dr. Tseng cree que la ausencia de distrofina en niños con Duchenne y en ratones mdx causa problemas con otra proteína, el transportador de la creatina en las membranas del músculo así que la creatina oral no funciona bien. Al parecer el aumento de la AGAT y GAMT y la localización errada de la proteína transportadora de creatina es toda consecuencia secundaria de la ausencia de distrofina en los ratones mdx. Por lo tanto, un ratón mdx fue

creado cuyo gen de la GAMT fue desactivado. Este *ratón sin dos proteínas* no puede caminar apropiadamente, muere temprano y sus estructuras musculares parecen similares a las de biopsias de chicos con Duchenne.

Además, los chicos con Duchenne tienen solamente 20 % de la cantidad normal de creatina en sus músculos, mientras que los ratones mdx, tienen 80-90 % del nivel normal de creatina presente. Esta puede ser una de las razones para los síntomas distróficos mucho más graves en los chicos comparado con los del ratón mdx. Investigaciones adicionales de éstas y otras diferencias pueden ayudar explicar por qué el ratón mdx no está realmente enfermo, y puede revelar nuevos tratamientos para distrofia muscular Duchenne. ¡Una dirección para mantener la examinación de auto caudal, quizás en el *proyecto Catalyst* en busca de estos genes modificadores! Volviendo "buenos genes modificadores" con *seguridad* en un razonable objetivo para conseguir hacer una distrofia muscular más benigna de niños con Duchenne.

### ¿Si todavía no hay ninguna cura, por qué necesitamos conocer la mutación exacta?

**Kevin Flanigan** de la Universidad de Utah en Salt Lake City dio la respuesta: la mutación exacta de un chico que parece tener distrofia Duchenne debe ser conocida para confirmar que tiene realmente distrofia Duchenne, y no alguna otra enfermedad muscular, p.e., una de las muchas distrofias de cinturas (Anillo Óseo) que pueden mostrar síntomas similares a Duchenne. Aunque el tipo de mutación no siempre predice distrofia muscular Duchenne versus Becker, si la mutación muestra que el marco de lectura de la distrofina está cambiado, una distrofia muscular Duchenne es mucho más probable. Además, en la mayoría de los casos, una biopsia muscular puede ser evitada. Igualmente importante, conocer la mutación exacta permite un asesoramiento genético confiable de la familia del chico y sus parientes maternos, entre quienes las portadoras de Duchenne pueden ser detectadas. Finalmente, nuevas terapias, como los métodos omisión de exón, y fármacos para leer a través de los codones de parada requieren conocer la mutación específica dentro del gen de la distrofina del paciente.

Para detectar las deleciones y duplicaciones, la técnica analítica ahora ampliamente usada es el método de *amplificación múltiple con sonda dependiente de ligado*, MLPA, desarrollado hace algunos años por el Dr. *Jan Schouten* de la compañía *MRC-Holanda* en Amsterdam. Para dar una descripción muy breve del procedimiento: 158 oligodesoxirribonucleótidos con secuencias especialmente diseñadas para unirse en dos sitios de cada uno de los 79 exones de la distrofina son usados. Si un exón está presente, los dos nucleótidos diseñados para su secuencia en especial se unirán en dos sitios y entonces son conectados, ligados, unos con otros. Los nucleótidos ligados sirven como una plantilla para la amplificación con PCR, un método de multiplicación. El producto amplificado puede entonces ser leído después de la separación por electroforesis como picos en una gráfica. Si un exón en especial no está presente porque está eliminado, los dos nucleótidos para este exón no pueden unirse a la secuencia del exón y por lo tanto no pueden reunirse entre sí, así que el pico máximo correspondiente está faltante en la gráfica.

Esta técnica detecta las deleciones y las duplicaciones de todos los 79 exones del gen de la distrofina en pacientes con Duchenne, pero no detecta mutaciones puntuales. Pero porque es un método cuantitativo, deleciones y duplicaciones también pueden ser detectadas fiablemente en sólo uno de los dos genes de la distrofina de mujeres portadoras con Duchenne, incluso si la deleción o duplicación en el paciente emparentado es desconocida. Ésta es una de las ventajas más importantes del uso extendido de este método.

Sin embargo, resultados falsos positivos, que indican una deleción de un solo exón cuando no hay ningún exón delecionado, podrían ocurrir en el raro evento de un polimorfismo en el sitio donde las sondas del MLPA se unen a la secuencia del gen. Un polimorfismo es un cambio - no causante de enfermedad - de una sola base en el ADN. Por lo tanto, cuando el método MLPA encuentra una deleción de un solo exón, la confirmación de una sola deleción de exón por otro método es requerida.

Si ninguna mutación puede ser encontrada con la prueba MLPA, el paciente tiene probablemente una mutación puntual. Con la técnica de *secuenciación con primer interno/amplificación de una sola condición*, SCAIP, desarrollada en el laboratorio del Dr. Flanigan, es posible fiablemente encontrar y caracterizar en detalle todas mutaciones puntuales, incluyendo los codones de parada, deleciones pequeñas e inserciones, tanto como mutaciones en sitios de empalme. En este método de dos pasos, la secuencia de bases completa de todos los exones del gen de la distrofina, así como de todas las regiones de la frontera intrón-exón con la señal de empalmado, y también de todos los promotores puede ser determinada. Todas estas regiones distintas del gen son amplificadas primero en una sola *reacción en cadena por polimerasa*, PCR, y luego directamente secuenciadas usando métodos estándar de secuenciado genómico automáticos para detectar mutaciones puntuales y otras.

La experiencia con los dos métodos de prueba, MLPA y SCAIP, ha mostrado que el 93-95 % de todas mutaciones pueden ser encontradas usando muestras de sangre. Sin

embargo, el 5 a 7 % restante de todas las mutaciones no pueden ser encontradas con ellos. Si el paciente tiene síntomas positivos de Duchenne o Becker, pero ninguna mutación detectable en muestras de sangre, entonces una biopsia muscular se hace necesaria con el propósito de que pueda ser determinada la presencia o la ausencia misma de la proteína distrofina en las fibras musculares por uno de los dos métodos de detección de proteína Western Blot o inmunofluorescencia. El western blot tiene la ventaja de dar una indicación de la cantidad y el tamaño de la proteína distrofina, pero la inmunofluorescencia está extensamente disponible. El tejido muscular también puede ser usado para extraer ARN mensajero, que puede ser usado para encontrar mutaciones infrecuentes que causan la incorporación de fragmentos intrónicos a los exones en el ensamblaje del gen DMD.

Debido a que los datos precisos de las mutaciones del gen de la distrofina en pacientes con Duchenne y sus síntomas clínicos exactos se vuelven cada vez más importan-

tes no sólo para los pacientes mismos sino también para la investigación terapéutica y el diseño de los ensayos clínicos, el laboratorio del Dr. Flanigan está colectando estos datos para un banco de datos general de diagnóstico en cooperación con centros clínicos en seis otras universidades en los Estados Unidos. Pero también centros clínicos y especialistas individuales de enfermedades neuromusculares de otras partes de los Estados Unidos e incluso de otros países son invitados a enviar datos de sus paciente al centro de Utah. Más y más pruebas clínicas serán llevadas a cabo en el futuro que necesitaran a participantes con mutaciones y síntomas clínicos definidos. En base de la información de este banco de datos, el centro puede entonces recomendar la inclusión de ciertos pacientes en estas pruebas. La información sobre la inclusión de los datos del paciente en este banco, sobre las posibilidades de prueba y los precios puede ser encontrada en la Internet en [www.genome.utah.edu/dmd](http://www.genome.utah.edu/dmd).

## Una entrevista con Stephen D. Wilton

El profesor Wilton de Jefe del Grupo de Medicina Molecular Experimental en el Centro de Desórdenes Neuromusculares y Neurológicos de la Universidad de Australia Occidental en Nedlands cerca de Perth. El 16 de Julio del 2006, después de la conferencia, *Steve Wilton* respondió a mis preguntas, en cursiva, sobre la omisión de exón y el estado general de la investigación de una terapia para Duchenne. El nombre completo del fármaco potencial de omisión de exón, *oligorribonucleótido en antisentido*, abreviado como AON u oligo.

**Pruebas clínicas con tecnica de omision de exon comienzan.** *Para iniciar, por favor explique a las familias con chicos con Duchenne, lo que los resultados muy prometedores de la investigación de omisión de exón significarán a quienes esperan desesperadamente una cura de esta terrible enfermedad.*

Yo no usaría la palabra cura, la omisión de exón nunca curara la DM Duchenne. Lo mejor que podemos hacer es reducir la severidad, y en algunos casos, podemos ser capaces de reducirla mucho.

Prefiero ser cautelosamente optimista y decir que si vamos a hacer una diferencia con la omisión de exón, y será una diferencia modesta. Y si esto funciona mejor de lo que pensamos, será magnifico. Es muy importante mantener las expectativas muy templadas.

*He discutido la omisión de exón muy a menudo con padres. Se los explico tan bien como puedo, y siempre añado que sólo ha sido probada en animales, y que nadie puede decir en este momento si esto funcionara en chicos también. Entonces explico que las pruebas clínicas con chicos con Duchenne que están siendo hechas ahora mostrarán si la omisión de exón funcionara en niños o no.*

Esto es por qué en esta reunión particular decía que nuestro laboratorio era capaz de inducir la omisión de cada exón en la cadena del gen de la distrofina excepto el exón 1 y 79. Todos los exones del 2 al 78, podemos omitirlos. Tenemos un manuscrito en preparación y esta tomando más tiempo del esperado para afinar detalles. Muchos exones son fácilmente quitados, y unos cuantos son más obstinados pero desarrollamos modos de omitir exones

difíciles.

Nuestras pruebas clínicas tienen que ser hechas despacio, concienzudamente, y paso a paso, lamentablemente para los padres que quieren un tratamiento ahora. Pero lo importante es que, tan pronto como un paso es tomado, estamos listos a tomar el próximo. Cualquiera es siempre muy optimista cuando una prueba inicia, esperando que los resultados sean positivos. No hay ningunos grandes problemas de seguridad esperados cuando sólo un músculo está siendo tratado y luego más tarde quitado para el análisis. Hay un mayor riesgo cuando la prueba progresa a un tratamiento de cuerpo entero con cantidades mucho más grandes de AONs a ser administradas y hay una posibilidad de algún efecto secundario inesperado.

Pero uno no sabe cuanto durara la distrofina después de dos o cuatro semanas del tratamiento inicial. En la prueba británica propuesta, de una a cuatro semanas después del tratamiento, una porción entera de músculo será quitado y analizado primero por pruebas moleculares para ver si distrofina está presente. Esto será una prueba de principio para mostrar que la omisión de exón va a funcionar en humanos.

En este momento pienso que, uno no debería experimentar con diferentes dosis o tiempos, porque la prueba real será un tratamiento de cuerpo entero, un tratamiento sistémico para demostrar que la omisión de exón realmente trabaja en músculos humanos. Y esto va a ser muy, muy difícil, porque no sabemos cuantos AONs necesitaremos, y con que frecuencia ellos tendrán que ser administrados.

Ahora para la omisión de exón, tendremos que buscar compuestos diferentes para pacientes diferentes dirigidos a mutaciones diferentes. Cada paciente responderá diferentemente. Esto va a ser una muy, muy difícil investigación. Pero puedo ser demasiado pesimista aquí.

*Los investigadores Holandeses en Leiden tratan ahora de omitir los exones 51 y 46. Y ellos ampliarán esto a otros exones. ¿Tendrán ellos que pasar por los largísimo procedimientos enteros de aprobación?*

Tendrán que tener aprobaciones, porque técnicamente cada nuevo oligo es una nueva medicina. Pero lo que espe-



ramos es que los oligos para los primeros procesos sean ejemplos seleccionados, y que para oligos subsecuentes en fila los procedimientos de aprobación puedan ser acortados, si todos oligos se comportan de manera similar y no inducen ningún efecto secundario.

Trabajamos, y me refiero al consorcio británico MDEX, con oligos modificados de una química diferente llamados *morfolinos*. Este tipo de compuesto ha sido ya sistemáticamente administrado a humanos como antibióticos potenciales. Ellos han mostrado ser seguros, porque ellos no son destruidos en el cuerpo, y parecen ser absolutamente estables. Extensas pruebas ya han sido hechas con ellos, y así pueden no necesitar tales pruebas clínicas extensas como, por ejemplo, otros AONs modificados, los investigadores Holandeses usan, los 2O-metil-tioato-protégidos, que no han sido administrados a humanos.

Los morfolinos, por otra parte, tienen una estructura central completamente diferente. Ellos no están cargados y porque ellos son tan raros, no hay manera que ellos puedan integrarse en el genoma. Así que lo que hacemos realmente no es terapia génica, pero es una modificación de la expresión génica.

Si los pocos primeros morfolinos muestran ser seguros como fármacos para distrofia muscular, esperaríamos que la gente a cargo de la regulación de fármacos tomara experiencias previas en los perfiles de seguridad de los morfolinos en la consideración, y puede ser posible relajar ligeramente las pautas en lo que tiene que ser hecho para nuevo oligos. Si tuviéramos que hacer pruebas extensas para cada oligo, podríamos bien detenernos ahora, sería simplemente completamente insostenible y no seríamos capaces de tratar muchas de las mutaciones diferentes que causan distrofia muscular Duchenne.

Uno de los aspectos más importantes a considerar es, que los oligos no son simples fármacos convencionales, y que ofreceríamos un tratamiento personalizado, una terapia molecular personalizada para un chico con Duchenne.

Ahora, la compañía **AVI Biopharma** en Portland, Oregon, EUA, desarrolla oligo morfolinos como agentes antivirales, que podrían usarse potencialmente en cientos de miles de personas. Y por lo tanto, con algo dirigido a la población general, usted debe tener pruebas de seguridad extensas para asegurarse que el 0.1 % de ellos no tenga ninguna reacción adversa inesperada o imprevista. En contraste, nuestros oligos para Duchenne no serían administrados a miles de personas, si no a casos muy específicos de distrofia Duchenne. Así que si hay un evento adverso, y esperamos no pasará, esto concerniría sólo a uno o dos muchachos, y ya que estos pacientes serán muy estrechamente supervisados durante el tratamiento, cualquier efecto adverso debería ser visto rápidamente y medidas apropiadas tomadas.

Todavía podría haber efectos dependientes de las diferentes secuencias de nucleótidos de los oligos. Tenemos que ser conscientes de tal riesgo. Pero este sería un caso de comparar los riesgos contra las ventajas. Aun si hay algunos efectos secundarios adversos con estos morfolinos en la localización de las mutaciones Duchenne, las ventajas de restaurar alguna expresión de distrofina podrían pesar más que los riesgos. Los corticoides tienen numerosos efectos secundarios pero éstos son aceptados actualmente como la mejor opción de tratamiento.

En esta reunión, *Dominic Wells* mostró que cuando él

sólo inyectaba AONs directamente en los músculos de ratones, él conseguía una muy buena omisión de exón en el nivel del ARN después de 14 semanas. Así que estos morfolinos inducen la omisión de exón durante 14 semanas. Y la proteína va a ser más estable que el ARN. ¡Por lo que después de 14 semanas, usted debería conseguir mucha distrofina, y esto puede durar posiblemente durante hasta 26 semanas, que son 6 meses! Nunca esperé que esto durara tanto tiempo. Esto funciona mejor de lo esperado. Y si hay una reacción adversa después de darle al chico un morfolino, quizás hay modos de controlar eso. Y entonces, el muchacho tendría quizás una semana incómoda, y luego esto va a ser 6 meses antes del siguiente tratamiento. Otra vez, tenemos que calcular si un tratamiento dos veces al año sería adecuado. Podríamos comparar esto con quimioterapia y radioterapia en el tratamiento del cáncer. Hay efectos secundarios terribles. Y son aceptados porque no hay nada más.

**Dos tipos de oligonucleótidos en antisentido.** *Los investigadores holandeses intentan en sus oligos, los 2O-metil-fosfotioatos, para omitir primero el exón 51, y usted y los británicos probarán morfolinos. ¿Pero ustedes trabajarán juntos, verdad?*

Los holandeses buscan una variedad de exones diferentes, y los ingleses han hecho una comparación y han encontrado que los compuestos que desarrollamos, en particular los morfolinos, trabajaban muy bien, y decidieron usarlos para su prueba clínica que está todavía en la etapa de planificación. Ellos tratarán de omitir el exón 51, también, para tener esencialmente un estudio paralelo a la prueba holandesa. De este modo, ellos serán capaces de comparar diferentes químicas, diferentes secuencias, y comparar la eficacia de estos tratamientos diferentes. Esto realmente no podría ser hecho si ellos trataran de omitir otro exón. Así que, si ambos tipos de AONs están mostrando ser seguros, el trabajo en ambos lados va a ser alcanzado. Esperamos que ambos den resultados similares.

Nadie realmente sabe lo que va a pasar cuando hay una exposición a largo plazo a cualquiera de estos oligos diferentes. Es hasta posible que un tratamiento necesite una combinación de oligos. La idea es, que la competencia es sana, y que no guardamos todos los huevos en una cesta. Si ambos sistemas prometen, ambos tienen que ser alcanzados. Y otra vez, si algo pasa después de tres años del tratamiento morfolino, entonces retrocederemos a los 2O-metililos. Pero si no tuviéramos nada más que los morfolinos en aquel momento, estaríamos en problemas. Pero además de los morfolinos y los 2O-metililos, hay otros tipos de AONs disponibles con otras químicas con las que trabajamos.

**Los primeros experimentos de omisión de exón.** *¿Quién realmente tuvo la primera idea sobre la omisión de exón?*

Pienso que fue desarrollada simultáneamente en varios sitios diferentes. Yo había estado haciendo un trabajo en fibras revertantes con distrofina que aparecen espontáneamente en los músculos con Duchenne, y trataba de encontrar cual era el mecanismo. Y para mí era lógico que esto fuera algún mecanismo de omisión de exón. Era alrededor de 1994, y encontramos algunas transcripciones de genes, y algo de funcionamiento de ARNm para distrofina acortada. Y luego al final de 1996, en una reunión en el Lago

Tahoe, EUA, encontré a *Ryszard Kole* de la Universidad de Carolina del Norte. Él hablaba de la supresión del empalme anormal en el gen  $\beta$ -globina como una terapia para la talasemia. Por lo que sé, él era la primera persona en modificar la expresión de un gen por modificación del empalme. ¡Después, Ryszard y yo hablábamos bastante tiempo, y luego en uno de esos momentos que pasan cuando algo le golpea casi literalmente como un ladrillo! Era simplemente tan obvio, que este era el modo de ir. ¿Si usted pudiera usar AONs para suprimir el empalme anormal, por qué no aplicar el mismo acercamiento para el empalme normal, también? Unas semanas después del regreso a Perth, recibí algunos oligos de Ryszard. Teníamos algunos cultivos con fibras de músculo que no estaban muy bien, pero hicimos algunos experimentos de todos modos en seguida, y conseguimos la omisión de exón en nuestro primero experimento con uno de los oligos de Ryszard.

**¿Cuándo habrá una terapia de omisión de exón?** *El gen fue encontrado hace 20 años. Todo el mundo estaba muy excitado porque tendríamos el próximo año una cura.*

*¿Qué puede decir actualmente a los padres que sienten que el tiempo para sus niños se está acabando? Hace dos años, Gertjan van Ommen de la universidad de Leiden, Holanda, me dijo en una entrevista que tomaría aproximadamente 10 años hasta que la omisión de exón trabajará en los niños. Dos años han pasado, así que ocho años restan. He preguntado a las familias si realmente desean saber eso, y su respuesta fue: "Si, deseamos saberlo, y entendemos que tales estimaciones no pueden ser precisas, y que esta estimación no quiere decir que en enero del 2014 exactamente ahí habrá algo para nuestro hijo."*

*¿Cual es la situación ahora? ¿Cuánto tiempo piensa usted que pudiera tomar?*

Sí, sé que éstas son cosas terribles. Éste es el sexto año que vengo a los encuentros del Parent Project. Desafortunadamente, conozco a nuevas personas cada año, y cada año, algunas personas no están más aquí. Pero tenemos que proceder despacio y cuidadosamente y un paso antes de otro para evitar errores que harían el tiempo de espera aun mayor.

Sin embargo, soy optimista de que, si los primeros ensayos clínicos son hechos cuidadosamente y sin peligro, entonces muy rápidamente planeamos seguir con nuevas pruebas. Y en las nuevas pruebas incluiríamos nuevos blancos, para poder omitir otros exones y abordar mutaciones diferentes. Así que no esperaremos por años para ver qué ocurre y analizar los resultados. Si obtenemos un resultado positivo en una prueba, pondremos en marcha el próximo pasó lo antes posible.

Y una manera en cómo podríamos acelerar el trabajo es, que en vez de tratar de omitir solamente un exón a la vez, podríamos apuntar a dos exones o aun mas, por lo tanto, hacer multi-omisiones de exón simultáneamente. ¿Porque no usar un cóctel de oligos para omitir varios exones a la vez? Hemos hecho actualmente esto en cultivos de células con una mezcla de oligos para remover los exones 50, 51, 52 y 53 simultáneamente, y trabajan razonablemente bien. Y hemos trabajado con otro preparado, dirigido a los exones 6, 7, y 8, que eran los exones del perro distrófico que necesitan ser omitidos. Así que podíamos probarlo en el perro antes de trabajar con humanos. Muchas mutaciones

diferentes podían ser alcanzadas por uno de estos cócteles. Y una ventaja de usar un cóctel es que usted podía probar de forma segura tres o más oligos de una sola vez. Y pudimos aun combinar diferentes oligos. Eso aceleraría considerablemente la investigación.

Así que, cuando ahora mira, la estimación de Gertjan es muy realista, tal vez el tiempo será más breve, 5 a 6 años desde ahora hasta que podamos tratar a los primeros chicos con buenos resultados.

*Cuando hablo a las familias, a menudo los escucho decir: "¿Por qué la DM Duchenne nos toco? ¿Cuál es la razón?" "La razón son las mutaciones, y ocurren al azar, no pueden ser pronosticadas", contesto. Pero las mutaciones son sólo herramientas de la evolución. Si no hubiera ninguna mutación, no estaríamos aquí, no habría vida real sobre la tierra, quizás sólo fango. Pero la evolución también hizo a científicos - como usted - que están tratando de enderezar esto, reparar el gen, resolver ese problema encontrando una terapia.*

Es una manera interesante de mirarlo. Es verdad, sin la evolución, no habríamos evolucionado ni siquiera. Para mirarlo, todos son diferentes, todos probablemente tienen genes de la distrofina ligeramente diferentes. En algunos casos hay el cambio de una sola base en los exones que codifican la proteína, pero esto cambia un aminoácido y en general no es significativo, a menos que ése fuera un aminoácido muy importante. Cada gen de la distrofina es levemente diferente, y la variación genética se extiende a otros genes y a los genes que controlan la expresión de genes. Somos un paquete genético muy complicado y ésa es la razón para los diferentes síntomas clínicos que encontramos en diferentes pacientes de Duchenne.

**Fabricando los oligos.** *¿Quién actualmente hace los oligos? Son probablemente hechos automáticamente.*

Yo personalmente he hecho los oligos 2O-metil que usamos, con una máquina que tenemos en el laboratorio. Presioné botones para afinar las secuencias de los AON, puse los reactivos y los mantuve en su mayor nivel, y perdí mucho tiempo de sueño, cuando tuve que mirar la síntesis. Los químicos son muy costosos y odio desperdiciarlos así que el sintetizador era mantenido funcionando las veinticuatro horas cuando es cargado con los químicos. Ahora, hay muchas compañías quienes hacen oligos pero prefiero algo de control sobre el proceso. También consigo aprender más sobre la química. Una vez que optimicemos nuestros 2O-metilos en células cultivadas, contactaremos a Avi Biopharma en Oregón, la compañía que ahora hace nuestros morfollinos. Ellos hacen esto en un acuerdo de colaboración y ha sido muy alentador y bueno trabajar con ellos. Más importante, pueden hacer morfollinos de grado clínico para las pruebas.

*¿Estos oligos serán costosos cuando todo este listo para los chicos?*

Serán costosos, pero no tan costoso como la producción de virus para el reemplazo génico. La omisión de exón será muchas veces más barata. El costo de hacer estos oligos es cuantioso, y todavía necesitamos muchos morfollinos con diferentes secuencias. Pero si podemos diseñar oligos que trabajen muy eficientemente en cantidades pequeñas, que usted puede administrar en una dosis baja y todavía ser terapéuticos, entonces estos fármacos podrían no ser tan costosos.

**El diagnóstico preclínico temprano será importante.** Si la omisión de exón u otra técnica trabajan, ¿No debe ser aplicada temprano antes de que los músculos desaparezcan?

La detección temprana será importante. Y posiblemente, si la omisión de exón fuera a trabajar y demuestra ser segura, entonces, después de una diagnosis temprana, usted podría empezar a tratar antes que ningún síntoma se presente del todo. Y eso pudiera hacer una gran diferencia. Así que creo que la detección de recién nacidos para distrofia muscular es una buena idea y debe estar disponible en todos lados.

**¿Entonces hay un mensaje de esperanza?** ¿Al final de esta entrevista, usted diría por favor algunas palabras a los padres para mantener la esperanza después de un encuentro importante como este en Cincinnati?

Déjeme darle una sorpresa primero: el progreso con los morfolinos, que ha sido hecho en el año pasado, fue asombroso, obtuvimos resultados más allá de nuestras expectativas. Somos optimistas que trabajamos mucho, pero mucho mejor de lo que anticipamos. Al principio de nuestro trabajo, encontramos que los morfolinos funcionaban muy pobremente en cultivos de células. Y cuando empezamos el trabajo en ratones con inyecciones in-vivo, estábamos haciendo todos estos trucos extravagantes para conseguir administrar los morfolinos en los músculos. Estaba trabajando en principio, pero entonces sólo probamos un tipo de control negativo, el morfolinos en solución salina, sólo en un 0.9 % de ordinaria solución salina, y funcionaron maravillosamente, sin ningún portador para aumentar la entrega. Los puros morfolinos en solución salina, ¡la más simple manera posible de administración, funcionando muy,

muy eficientemente!

Y entonces la gente en Avi Biopharma les agrego pequeñas secciones de péptido a ellos para aumentar la entrega aún más, y estas cosas trabajan sumamente bien en ratones. Ahora, tenemos que probar esto en humanos. La gente de AVI están desarrollando nuevas químicas, haciendo nuevas modificaciones, y es una maravillosa colaboración con ellos.

Pero para terminar, quiero decir que este encuentro del Parent Project ha sido muy positivo. Hay tantos varios diferentes acercamientos de investigación para distrofia muscular hasta el momento. Hay muy buenas pruebas sobre reemplazo génico, de lectura a través, hay dos pruebas de omisión de exón, esta el trabajo de miostatina, hay tantas varias cosas diferentes que se están haciendo, y los corticoides están siendo estudiado en gran detalle. Hay razón para mucha esperanza.

Pero esto nunca va suficientemente rápido. Deseo que tuviéramos una cura ayer. Pero si podemos hacer una diferencia pronto, será con la omisión de exón. Eso comprará un poco de tiempo hasta que algo mejor o más permanente llegue. No es un tratamiento perfecto. Pero es lo mejor que podemos hacer por el momento con muchos oligos y sin nuevos saltos espectaculares en tecnología.

*Muchas gracias, ciertamente también de parte de muchas de las personas en todas partes del mundo que leerán esto entrevista: los chicos, sus padres y sus parientes, sus doctores y quienes los cuidan, los investigadores de DM Duchenne y quizás incluso personas influyentes que podrían cambiar cosas con el propósito de que usted y sus colegas consigan los fondos y la oportunidad de llegar a nuestro objetivo pronto, una terapia para muscular distrofia Duchenne.*

### Palabras Finales de Pat Furlong.

Mis dos niños, Christopher y Patrick, fueron diagnosticados hace más de 22 años. En ese momento el campo estaba vacío, no había esperanza y ninguna ayuda. El gen de la distrofia era esquivo. En 1986, parecía que el mundo cambió. El gen de la distrofia fue identificado con gran fanfarrea y parecía el tratamiento estaba cerca. Muy pronto después de descubrir el gen de la distrofia, reconocimos que el camino no estaba tan claro como creíamos inicialmente. Teníamos mucho para aprender. En los pasados cinco años el mundo de la distrofia muscular Duchenne ha cambiado dramáticamente y nosotros, los padres y los miembros de la familia, hemos sido decisivos en este cambio. El campo está ahora abierto con posibilidades y en

estos próximos pocos años, veremos varios ensayos clínicos prometedores que esperamos conduzcan al desarrollo de tratamientos. La DM Duchenne será retirada de la lista de condiciones "letales". No espero que removamos mágicamente del mundo la DM Duchenne, mejor dicho creo que la DM Duchenne se volverá una condición crónica que requerirá un cuidadoso manejo médico. Pero será manejada y estos tratamientos emergentes mantendrán y protegerán la función muscular. La comunidad Duchenne y su progreso se volverá un modelo para otras con condiciones raras y nuestros hijos sobrevivirán, crecerán y alcanzaran sus sueños.

Este informe, escrito en Cadaqués, España, en Agosto y Septiembre del 2006, está también disponible en inglés y alemán. Todos mis informes anteriores en inglés, alemán, y español pueden ser visto en la Internet en [www.duchenne-research.com](http://www.duchenne-research.com). Aquellos que desean recibir mis futuros informes por correo electrónico tan pronto como están listos, deben por favor mandarme su dirección de correo electrónico.

Günter Scheuerbrandt, PhD., Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Alemania. E-mail: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de)

Traducido al español por: Ricardo Rojas C. <http://www.distrofia-mexico.org> E-mail: [distrofiasmusculares@yahoo.com.mx](mailto:distrofiasmusculares@yahoo.com.mx)

## Omisión de Exón, un Ejemplo

Aquí los detalles moleculares de la omisión del exón 46 son explicados cambiando una distrofia muscular Duchenne causada por la delección del exón 45 en una distrofia muscular Becker.

Parte de la secuencia de bases del exón 45 y 46 del ARNm del gen de la distrofina es mostrado sin defectos al final del exón 44 y del inicio del exón 47. En el exón 45, 50 tripletas de bases no son mostradas y 30 en el exón 46. Debajo de cada triplete, se muestra el nombre abreviado del aminoácido que concuerda con el código genético. Las tripletas están seguidas cada una de otra sin espacios entre ellas, pero aquí se usan guiones indicando la separación entre tripletas del marco de lectura y líneas verticales para indicar los bordes de los exones. En la omisión de exón "terapéutica", un oligoribonucleótido se une por si mismo a las 19 bases subrayadas en el exón 46 del ARNpre-m. Las tres bases que señalizan un codón de parada oculto en el código (por lo que no es leído como tal) se encuentra subrayado en azul. El exón 45 finaliza después de la segunda base de su ultima triplete, la cual es entonces completada como AGG con la primera base del exón 46 (-AGG-AG | G-CUA-).

<b>final exón 44</b>		<b>inicia exón 45</b>		<b>final exón 45</b>		<b>inicia exón 46</b>
-UGG-UAU-CUU-AAG		GAA-CUC-CAG-GAU---		AGA-AAA-AAG-AG		G-CUA-GAA-GAA-
trp tyr leu lys		glu leu gln asp		arg lys lys arg		leu glu glu

codón de parada oculto

oligoribonucleótido en antisentido

				<b>GUC-GUU-GAU-UUU-UUU-UUC-G</b>		<b>final exón 46</b>
--AAU-GAA-UUU---		AAA-GAG-CAG-CAA-CUA-AAA-GAA-AAG-CUU-GAG-CAA-GUC-AAG				
asn glu phe		lys glu gln gln leu lys glu lys leu glu gln val lys				

	<b>inicia exón 47</b>
	UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
	leu leu val glu glu leu

Si el exón 45 estuviera faltante en el ARNm, el marco de lectura en el exón 46 es alterado, al quedar incompleta la triplete (AGG), iniciando con solo un nucleótido el exón 46.

Cambiando la lectura de		G-CUA-GAA-GAA-C	por		GCU-AGA-AGA-ACA
		leu glu glu			ala arg arg thr

con la consecuencia de que 16 aminoácidos incorrectos son incorporados en la distrofina hasta que finalmente es alcanzado el codón de parada prematuro UGA el cual antes había estado oculto entre la secuencia (-AAU-GAA-UUU-) y que ahora deja de estarlo y es leído (-AAA-UGA-AUU-). La síntesis de proteína es entonces interrumpida prematuramente, quedando la distrofina incompleta, y la distrofia muscular Duchenne se desarrolla. Después de una delección del exón 45, el exón 44 es seguido directamente por el exón 46:

<b>final exón 44</b>		<b>inicia exón 46</b>
-UGG-UAU-CUU-AAG		GCU-AGA-AGA-ACA---AGA-UUU-AAA-UGA-AUU-UGU-UUU-AUG-
trp tyr leu lys		ala arg arg thr arg phe lys <b>alto!</b>

Si adicionalmente a la falta del exón 45, es removido también el exón 46, el marco de lectura no es alterado, no habría ningún codón de parada prematuro, aunque 108 aminoácidos estarían faltantes en la parte central de la distrofina, sin embargo aunque acortada, esta sería todavía funcional. Esto cambiaría la distrofia muscular Duchenne en una menos severa distrofia muscular Becker.

		<b>final exón 44</b>		<b>inicia exón 47</b>
---		UAC-AAA-UGG-UAU-CUU-AAG		UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
		tyr lys trp tyr leu lys		leu leu val glu glu leu