

PPMD Annual Connect Conference, Philadelphia, 12 - 14 July 2007

Trabajando juntos para finalizar la DM Duchenne.

Más de 400 personas vinieron a Filadelfia para asistir a la conferencia anual del 2007 del Parent Project Muscular Dystrophy de EUA, PPMD. Durante tres días, cerca de 60 presentaciones sobre investigación terapéutica, manejo médico y social, y asuntos legales estaban en el programa. Yo, *Günter Scheuerbrandt*, un bioquímico de Alemania, se me pidió por *Patricia Furlong*, presidenta del PPMD, escribir un informe sobre esta reunión para usted, los chicos y jóvenes con Duchenne y sus familias, que desean saber cómo el trabajo de los investigadores y los otros expertos esta progresando para encontrar terapias eficaces para distrofia Duchenne.

Este informe es mi tercero sobre las reuniones del PPMD, los otros dos fueron de la reunión del PPMD en Cincinnati en julio del 2006 y la reunión de PPUK en Londres en octubre del 2006. Usted puede ver estos informes anteriores en mis páginas de Internet en www.duchenne-research.com y descargarlos desde allí como archivos pdf.

El informe contiene los resúmenes de solamente las presentaciones científicas porque no soy un experto médico o social. No es una publicación científica, y he tratado de escribirlo en una manera que le deje comprender qué esta ocurriendo en los laboratorios.

En los resúmenes, estoy usando los nombres de los presentadores sin sus títulos, la mayoría son profesores y tiene postdoctorado o título en medicina o ambos. Y casi todos son cabezas 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. Todos los científicos cuyas presentaciones son parte de este informe, han tenido la oportunidad de ver el borrador de mi texto y corregirlo si necesario y muchos lo han hecho.

Introducción

Al principio de la reunión, *Richard Finkel* del Hospital Infantil de Filadelfia, *Dominic Wells* del Colegio Imperial en Londres, y *Steve Wilton* de la Universidad de Australia Occidental en Perth, hablaron en detalle de los hechos generales de la distrofia muscular Duchenne y las diferentes estrategias de investigación. Como mi informe de la reunión del año pasado en Cincinnati empieza con una presentación similar, he acortado esos párrafos anteriores, actualizándolos con nueva información, y los repito aquí para ayudarle a que comprenda cómo los genes hacen las proteínas, por qué la distrofia es tan importante, qué enfoques de investigación están siendo seguidos activamente, y cómo trabaja la omisión de exón.

¿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. Si GGCTTAATCGT es la secuencia de estas bases en una de las cadenas, la secuencia de la cadena opuesta debera ser CCGAATTAGCA por lo tanto ambas secuencias son *complementarias* una de otra:

```
—GGCTTAATCGT—  
| | | | | | | |  
—CCGAATTAGCA—
```

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 los a menudo más largos **intrones**, los cuales no contienen solo "basura genética", como una vez se pensó, si no importante información para el control de las actividades del gen. Después de la transcripción, los intrones son retirados del ARN pre-mensajero, y los exones son **empalmados** 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 empacado en un núcleo celular de un diámetro de cerca de 0.01 mm solamente porque el material genético esta empacado 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, al menos cerca del 30% 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 si 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, apoptosis. 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, sino también los músculos lisos y cardiacos. 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, **uplicaciones**, 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 la 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 cambio 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 **prematureo codón de parada** es alcanzado. La distrofina incompleta no puede cumplir su función normal,

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** la **omisión de exón** (exon skipping), tampoco toca el gen dañado. Este solamente interfiere en el procesamiento de la información genética desde el gen a la proteína. Con esta tecnica, 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**.

El **segundo 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 suficiente-

desaparece y la **distrofia muscular Duchenne** se desarrolla.

Curso clínico de la distrofia muscular Duchenne. Las primeras señales clínicas aparecen cerca de los dos a tres años de edad causando dificultades al caminar y especialmente al subir escaleras. Sin una detección temprana, incluso hoy, la enfermedad es en general diagnosticada cerca de los tres a cinco años de edad. Debido a las contracturas crecientes en el pie, rodilla, y articulaciones de la cadera, los pacientes pierden su habilidad de caminar entre los 10 y 12 años. Deformidades crecientes de la columna vertebral, escoliosis, y restricciones del movimiento hace que pronto sea dependiente de cuidado permanente. La implicación de las funciones respiratoria y cardiaca resulta en deceso por insuficiencia cardiaca y circulatoria a una edad adulta temprana. El tratamiento con corticoesteroides, la fisioterapia, las operaciones ortopédicas para evitar deformidades por contracturas y en la columna vertebral, así como también ayudas respiratorias y otras medidas de manejo pueden mejorar la calidad de vida y prolongar la esperanza de vida significativamente.

Algunos de los métodos de atención médicos y sociales fueron hablados en esta y anteriores reuniones del Parent-Project. Espero que haya una posibilidad de que se escriba un informe similar a este científico en el futuro por un equipo de especialistas, porque será necesitado por chicos con Duchenne en todas partes para concientizarse, y aprovechar lo que ha sido logrado durante los últimos años para reducir el sufrimiento, prolongar su vida y hacerlo más significativo.

mente 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 acortada 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.

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 es-

pera 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.

¿Por qué necesitamos pruebas clínicas?

Cómo llevar un fármaco a los pacientes. En su presentación con el título *Introducción a las pruebas clínicas*, **Kate Bushby** de la Universidad de Newcastle antes Tyne, explicó cómo la idea de un científico para una terapia, una nueva *hipótesis*, se hace una realidad y resulta en un fármaco eficaz para distrofia muscular Duchenne. En este resumen, estoy repitiendo un poco la información general más importante dada por Dr. Bushby en la reunión del 2006 del PPUK en Londres, con algunos nuevos detalles que mencionó en esta reunión.

Las pruebas clínicas son la parte más importante del desarrollo de un proceso de terapia que toma muchos años. Pero los chicos con Duchenne no tienen muchos años para esperar hasta que un fármaco está disponible para ellos. Pero ellos y sus familias deben comprender que los científicos entienden su situación y están trabajando tan rápido como ellos pueden, con varios colaboradores y con los reguladores para tener certeza que los fármacos que buscan son eficaces y seguros. Pero desde el principio, en la etapa preclínica, tienen que trabajar cuidadosamente y un paso después de otro, antes de que las pruebas clínicas puedan ser empezadas. Y estos experimentos de laboratorio pueden tomar varios años. Por ejemplo, después de las primeras ideas en 1993 sobre la omisión de exón como un posible método de combatir una enfermedad hereditaria, tomó 13 años hasta que esta técnica está ahora siendo usada en las primeras pruebas clínicas con chicos con Duchenne.

La primera tarea de los científicos, que empiezan a desarrollar un fármaco terapéutico, es recoger los datos experimentales poniendo a prueba su nueva idea en un modelo de una enfermedad como distrofia Duchenne, p.e., en células de músculo aisladas *en vitro* en un plato del laboratorio, y *en vivo* en ratones mdx y perros GRMD distróficos. Para determinar si su método cambiaría el proceso de la enfermedad, la patología, y determinar precisamente las consecuencias bioquímicas y biológicas de su tratamiento propuesto, como la actividad de la de enzima creatina kinasa, la estructura de los músculos, p.e. su histología, la presencia y las propiedades de la distrofina y su ARN mensajero. Con los experimentos en animales, una mejora de la función muscular puede ser determinada y la toxicidad verificada, para ver si una nueva sustancia tiene un efecto positivo y que no es venenosa.

Pero incluso los resultados de alta calidad y confiables de los experimentos preclínicos no prueban que un nuevo compuesto, un nuevo fármaco potencial, indicaría los mismos resultados cuando se pruebe en chicos. Aunque los ratones mdx no tienen distrofina en sus músculos, estos animales pequeños no están realmente discapacitados, su enfermedad es mucho más moderada que en el humano. La distrofia del mucho más grande perro perdiguero dorado, GRMD, es más como la enfermedad humana. Los perros están realmente discapacitados y tienen problemas para levantarse. Pero incluso, todos los resultados de los expe-

rimentos obtenidos con estos animales no necesariamente pueden ser esperados sean iguales a cuando los experimentos son hechos en chicos. *¡Un niño no es un ratón grande o un perro de dos patas!* Por esta razón, las pruebas clínicas con chicos con Duchenne son necesarias.

Usualmente, las pruebas tienen que pasar por tres fases, y es importante notar que en las fases I y II los participantes en la prueba pudieran no experimentar ningún beneficio clínico porque esta clase de pruebas son diseñadas principalmente para contestar cuestiones de seguridad y eficacia limitada: (1) Fase-I para probar la toxicidad, (2) fase-II para probar la dosis y seguridad y algún efecto del tratamiento, y (3) fase-III sigue contestando cuestiones de seguridad, pero esta diseñada para confirmar un efecto clínico positivo relevante y demostrar la eficacia del tratamiento, es decir, mostrar definitivamente que el nuevo tratamiento hace una verdadera diferencia, una mejora funcional en la calidad de vida.

Las pruebas clínicas para encontrar una terapia para Duchenne presentan varios problemas especiales: (1) Esta enfermedad es rara, por lo tanto la industria farmacéutica no siempre está interesada, pero su participación es necesaria para el desarrollo de un fármaco. También necesitan un motivo de ganancia para atraer capital suficiente, así como la regulación de enfermedad-huérfana para deducción de impuestos es importante. (2) Debido a que la distrofia Duchenne es algo rara, los pacientes con mutaciones específicas en su gen de la distrofina serán escasos, a menudo causado por la falta de diagnóstico molecular completo. Así que los padres deben insistir en que la mutación exacta en el gen de la distrofina de su hijo afectado sea determinada lo antes posible. (3) Registros nacionales e internacionales, que contendrán los datos de diagnóstico completos de tantos pacientes como sea posible de todas partes del mundo, están siendo ahora establecidos. Detalles del programa pueden ser encontrados en www.treat-mmd.eu. Las familias deben ser animadas a enterarse sobre estos registros y tener los datos de su niño registrados.

La distrofia muscular Duchenne es un trastorno complicado y los tratamientos eficaces a largo plazo probablemente tendrán que actuar sobre la maquinaria genética que hace distrofina en los músculos sanos pero no en los Duchenne. Tal fármaco genético será probablemente un totalmente nuevo tipo de fármaco, capaz de trabajar por un muy largo tiempo, para tratar todos los músculos de un chico, incluso aquellos de los pulmones y el corazón. Por lo tanto, las demandas para la seguridad y la eficacia de tal fármaco para Duchenne son muy severas.

La supervisión y regulaciones impuestas por las diferentes autoridades están ahí para proteger a los pacientes de un daño, y también a sus médicos de las consecuencias legales de un tratamiento posiblemente peligroso. Tienen que asegurarse que una prueba es adecuada para responder la pregunta que está siendo hecha. Las regulaciones también deben asegurar la consistencia y exactitud de los datos para la aprobación reguladora final. El papeleo

extensivo, las largas demoras, y el gran gasto de las pruebas clínicas aseguran de que todo esté siendo hecho correctamente en pro de los chicos con Duchenne y sus familias.

Hay mas pruebas clínicas negativas que positivas, así que ningún paciente debe detener o descuidar la mejor atención médica posible que ya está disponible. Y solo diseñar y realizar correctamente las pruebas clínicas traerán una terapia eficaz dentro de un tiempo razonable. Los errores deben ser evitados a todo costo: regresaría atrás esfuerzos enteros de investigación y prolongarían el tiempo que los chicos tienen que esperar para un cambio decisivo y positivo de su futura vida.

Los resultados de las pruebas clínicas deben ser precisos y significativos. *Richard Finkel* en su segunda presentación explicó que para evaluar las pruebas clínicas fiablemente en pacientes con Duchenne, y comparar sus resultados con aquellas otras pruebas con los mismos fármacos o similares, los investigadores tienen que coincidir en las así llamadas *medidas de resultado*. Ejemplos de propiedades médicas, genéticas y biológicas a ser medidas son la actividad de la creatina kinasa, la presencia y estructura de la distrofina, las funciones musculares como la fuerza, resistencia, respiración, función del corazón, y también algunos aspectos de la calidad de vida del chico. Las mediciones deben permitir determinar si los resultados son estadísticamente importantes con un valor-p de al menos 0.05, que significa, que la probabilidad de que un resultado ocurrió por casualidad es menos a 5%.

Los métodos deben estar estandarizados y capaces de determinar si el fármaco potencial investigado causa cambios en los síntomas de la enfermedad, que son clínicamente significativos y específicos para la enfermedad, distrofia Duchenne o Becker. También deben ser seguros y fáciles de realizar, suficientemente sensitivos para identificar los cambios pequeños, y deben ser aceptables para los pacientes, sus padres, y los organismos reguladores. Por lo tanto, y sobre todo, tienen que mostrar claramente si un tratamiento propuesto sería en interés del niño, eso es, que si no está proveyendo una cura completa, por lo menos sea una terapia que disminuye la velocidad de la evolución de la enfermedad.

Las compañías de biotecnología necesitan capital.

Jeremy Gelber de la Banca de Inversión Morgan Stanley habló del lado financiero del desarrollo de un fármaco para una enfermedad rara como la distrofia Duchenne. El promedio del costo del desarrollo de un fármaco hasta su aprobación es de cerca de \$300 millones de dolares, o capitalizarlo en más de \$800 millones. Este dinero tiene que venir de inversionistas que aceptan el riesgo del fracaso, pero esperan una ganancia si un fármaco es comercializado con éxito. Las sociedades de inversión pueden aumentar millones de dólares, lo saben las compañías de biotecnología a menudo recién fundadas, lo saben los mercados farmacéuticos y aconsejan a los inversionistas, sus clientes, sobre los riesgos y los beneficios posibles. Estos especialistas son muy conscientes de qué importante es el resultado positivo de las pruebas clínicas. Por lo tanto las pruebas tienen que ser diseñadas y realizadas muy cui-

dadosamente, porque una prueba fallida tiene una influencia grande sobre la cotización y la cotización en el mercado de una compañía. Una prueba negativa puede incluso destruir una compañía y por lo tanto causar la demora del desarrollo de un fármaco, todo lo que las familias de Duchenne están esperando.

"Por favor deje a nuestro hijo ser parte de las primeras pruebas clínicas, estamos preparados a hacer todo e ir a donde sea, porque entonces obviamente el tendría una oportunidad para una cura". Los muchos correos electrónicos, algunos de países lejanos, me llegan con esta petición desesperada. Los siguientes párrafos son una respuesta para esa pregunta.

Solo muy pocos niños, menos de 10, participan en las primeras tres pruebas clínicas fase I en chicos con Duchenne en los Estados Unidos, Holanda y Gran Bretaña. Vienen de las cercanías de los centros clínicos porque los chicos tienen que ser verificados clínicamente repetidamente y deben tener una mutación conocida de forma precisa en su gen de la distrofina.

Solamente un solo músculo está siendo tratado a nivel local en estas primeras pruebas. Incluso si los resultados son positivos, p.e., si suficiente nueva distrofina aparece sin efectos secundarios serios, y si después este solo músculo está funcionando mejor, sin embargo a pesar de este cambio positivo, los chicos *no obtendrán ningún beneficio terapéutico*. ¡Su distrofia muscular no será curada ni disminuida la velocidad! Con estas primeras pruebas, uno desea solamente probar que dos nuevos métodos - la omisión de exón y la transferencia de mini-gen - están funcionando realmente en músculos humanos. Uno busca solamente una *prueba de principio*.

En general, solo cuando esto ha sido demostrado, el próximo paso, una aplicación sistémica será probada. Los fármacos potenciales - oligorribonucleótidos en antisentido, AONs, o virus adeno-asociados cargados con los mini genes - serán inyectados en la circulación sanguínea con el propósito de que puedan alcanzar todos los músculos. La primera prueba sistémica empezará probablemente en Holanda en el 2008 y será realizada también con pocos chicos de las cercanías de los centros clínicos.

Por estas razones, no tiene sentido que los padres viajen con su niño a centros de prueba lejanos o incluso en otros continentes y vivan cerca de ellos por muchos meses. Esto sería mucho muy costoso y no curaría al niño. Lo mejor que las familias pueden hacer para conseguir acceso a una terapia tan pronto como está lista y aprobada es ser miembro de una de las asociaciones activas de distrofia muscular, tener hecho un análisis genético del niño, y registrar su mutación exacta y toda otra información clínica en los bancos de datos para Duchenne que están siendo establecidos ahora. Entonces los investigadores podrían contactarse con familias cuyos hijos tienen una mutación necesitada, porque más y más pruebas clínicas serán llevadas a cabo en los próximos años, también con chicos que tienen una mutación infrecuente y anormal. Y las familias deben leer informes de investigación actualizados con el propósito de que sepan qué esta ocurriendo y cuándo y dónde estará disponible un fármaco realmente eficaz.

Omisión de exón y transferencia génica.

La omisión de exón no es una cura. La técnica de *omisión de exón* trata de disminuir la velocidad de la rápida distrofia Duchenne a una distrofia Becker mucho más leve. *Esta no cambia al gen mismo con su mutación*, pero afecta cómo es leído y procesado el gen defectuoso. La omisión de exón *no será una cura para distrofia Duchenne*, solo debe reducir la gravedad de sus síntomas, es solamente una terapia.

Si una mutación, una delección, duplicación o mutación puntual, altera el marco de lectura del ARN mensajero, ARNm, y causa por lo tanto distrofia Duchenne, el marco puede ser restaurado retirando artificialmente del ARNm uno o más exones con *oligorribonucleótidos en antisentido*, AONs. Son pequeños trozos de ARN cuyas secuencias son diseñadas en tal manera de que se unen por sí mismos precisamente a la secuencia complementaria del ARNpre-m dentro del exón a ser retirado o en sus regiones fronterizas, *y en ningún otro lugar*. Estos AONs por lo tanto interfieren en la maquinaria de empalmado con el propósito de que el exón o exones seleccionados no sean más incluidos en el ARNm, son *omitidos*.

Como a este ARNm se le omitieron exones es más corto de lo normal, la proteína distrofina es también más corta, contiene menos aminoácidos. Si los aminoácidos faltantes son parte de regiones no-esenciales, como el dominio de varilla (rod domain), la proteína más pequeña puede a menudo todavía realizar su papel estabilizador en la membrana celular del músculo. El resultado sería el cambio de los síntomas de Duchenne severos en los síntomas mucho más leves de distrofia muscular Becker.

Para las primeras pruebas de omisión de exón, dos clases de AONs químicamente protegidos son usadas. Tienen que ser protegidos porque son destruidos lentamente en las células musculares por enzimas destructoras del ácido nucleico. Los dos tipos de AONs son los *2'O-metil-fosforotioatos*, también llamados *2O-metilos* y los *morfolinos*. Debido a su estructura inusual, los morfolinos no son realmente nucleótidos así que la abreviación AON no es muy correcta para ellos. Pero por razones prácticas, estoy usando AON para ambos tipos en este informe como esta siendo hecho también en muchos trabajos científicos.

Prueba de omisión de exón en Holanda. *Judith van Deutekom*, ahora jefa de investigación de Prosenza B.V., una compañía biotecnológica en Leiden en Holanda, fue incapaz de estar presente en la reunión en Filadelfia, por lo tanto, *Elizabeth Vroom*, presidenta del United Parent Project Muscular Dystrophy internacional, UPPMD, informó sobre la *primera prueba en humanos con la técnica de omisión de exón* que fue completada a fines del 2006.

El objetivo de esta prueba fue probar que la omisión de exón es viable en los pacientes con Duchenne. Fue un *estudio local* en un área pequeña de un solo músculo, el músculo *tibialis anterior* de la espinilla, que estaba siendo tratado con un AON 2O-metilo contra el exón 51. La prueba fue diseñada solamente para proveer una *prueba de principio* y no un beneficio terapéutico en los niños tratados.

Los investigadores holandeses escogieron la versión AON 2O-metilo contra el exón 51, porque tenían experiencia extensiva con este tipo de AONs químicamente

estabilizados, no sólo tratando con éxito fibras musculares en cultivos de células, sino también por inyección local y sistémica en músculos individuales y la circulación sanguínea de animales vivos. El exón 51 fue escogido como el primer blanco a omitir porque omitiendo exitosamente este solo exón permitiría la restauración del marco de lectura de la proteína en hasta 25 % de todos los chicos de Duchenne con delecciones.

Porque la omisión de exón es un nuevo procedimiento médico, pruebas genéticas clínicas y moleculares intensivas fueron realizadas en cada chico antes del inicio de la prueba. Como el organismo regulador holandés no permitió que una biopsia de músculo fuera realizada antes de la prueba, una biopsia de piel será tomada, de la cual cultivos de células fueron preparados. En estos procedimientos de laboratorio, la delección en especial, se determino previamente a nivel del ADN, fue confirmada en el ARNm, y las secuencias de bases de las regiones fronterizas antes y después de los exones eliminados fueron determinadas también. Además, el gen de la distrofina entero fue analizado para asegurarse de que no había ninguna irregularidad inesperada. Aunque ya era conocido que el omitir el exón 51 trabajaba bien en animales vivos y en cultivos de células de pacientes con Duchenne, el procedimiento de omisión fue repetido en cultivos de células musculares de las biopsias de piel de cada chico, con el fin de excluir cualquier riesgo de que no podría funcionar en el músculo viviente durante la prueba. Por razones de seguridad adicionales, los chicos fueron tratados secuencialmente, uno después de otro, lo que significa que solamente después de que los resultados en el primer chico fueron positivos y no indicaban ningún efecto secundario, el segundo niño fue tratado, y así.

Los resultados de la prueba, aunque sean muy alentadores, no pueden ser resumidos aquí, porque al momento de escribir este informe a fines de Noviembre del 2007, no eran todavía publicados. Después de su publicación, serán parte de mi próximo informe de investigación disponible en el primer cuarto del 2008.

Cuatro chicos, que ya usan silla de ruedas, participaron en este estudio de método abierto. Tienen entre 10 y 13 años de edad y habían demostrado delecciones de los exones de la distrofina 50, 52, 48-50, y 49-50. Fueron tratados en secuencia, esto significa que solo después de que los resultados en un chico eran positivos y no mostraban ningún efecto secundario serio, el próximo chico era tratado. Cada chico recibió cuatro inyecciones de 0.2 mg de PRO051 disuelto en 0.2 ml de solución salina (0.9% NaCl) bajo anestesia local, en una región pequeña de 1.5 cm de extensión del músculo tibialis anterior.

Después de cuatro semanas, tejido muscular fue obtenido por una biopsia del sitio de la inyección y se probó para buscar el ARNm omitido y distrofina acortada esperada. Estas pruebas mostraron que el 64%, 85%, 97%, y 73% de las fibras musculares todavía presentes en el músculo distrófico, contenían nueva distrofina en sus membranas después de este tratamiento de 4 semanas. En comparación con la laminina $\alpha 2$, una proteína no afectada por el proceso distrófico, el contenido de distrofina fue de 33%, 35%, 17%, y 25%. Esta comparación tiene en cuenta la

extensión de la degeneración muscular. Sin este ajuste el chico de 13 años con mucho tejido conectivo y grasa en sus músculos tenía solamente 3% de la cantidad normal de distrofina, mientras que el chico con los músculos menos afectados tenía 12%. Los métodos moleculares de secuenciación probaron que la nueva distrofina tenía exactamente la estructura esperada con un marco de lectura restaurado. Fue imposible determinar si la cantidad de nueva distrofina habría sido capaz disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad en el músculo entero, porque el volumen de tejido muscular tratado era demasiado pequeño.

Estos resultados significan que un tratamiento de omisión de exón, cuando este disponible, debe empezar cuando la mayoría de los músculos todavía están intactos, esto es, apenas la mutación precisa de la distrofina sea conocido causa un cambio del marco de lectura.

Los investigadores holandeses están ahora preparando la próxima prueba clínica durante la que intentaran la administración por todo el cuerpo o *sistémica* del AON 20-metilo contra el exón 51, para que así el fármaco potencial pueda alcanzar todos músculos, incluyendo aquellos del pulmón y corazón. Estos estudios serán de corto plazo, de un mes, y de largo plazo, de seis meses, y serán hechos con cantidades diferentes de AON para determinar la dosificación más eficaz que posiblemente pueda disminuir significativamente la velocidad de los síntomas de Duchenne de los chicos. Que tanto será mejorada la función muscular también dependería de la actual funcionalidad resultante de las proteínas tipo Becker obtenidas después de la omisión.

También más estudios sistémicos con ratones serán llevados a cabo para investigar la farmacodinámica de los AONs, para ver qué exactamente ocurre con ellos dentro de las fibras musculares. En algunos de estos estudios animales, los AONs serán inyectados subcutáneamente, bajo la piel, porque esto será el tipo más práctico de aplicación si inyecciones repetidas son necesitadas. En estudios similares, ha sido mostrado que la aplicación sistémica trabaja bien, que incluso los músculos del corazón pueden ser tratados, y que no hay ningunos efectos adverso serios en las enzimas del hígado o otros valores sanguíneos.

El desarrollo completo de la omisión del exón 51, es sólo el principio del programa de investigación de Prosenza para encontrar un tratamiento eficaz para distrofia muscular Duchenne. El desarrollo de otros AONs para las otras delecciones seguirá poco después. En adición al AON 20-metilo para omitir el exón 51, la compañía ya ha diseñado y producido en cantidades suficientemente grandes otros AONs para omitir los exones 43, 44, 45, 46, 50, 52 y 53. Estos AONs juntos permitirán el tratamiento de más del 65% de todos los pacientes con delecciones.

En el futuro, será también posible usar esta técnica para restaurar el marco de lectura en algunas duplicaciones o cuándo tiene que ser omitido más de un exón. P.e., la omisión de multiexón de los 11 exones del 45 al 55 produciría una distrofina Becker en hasta el 63% de los chicos con Duchenne con delecciones como es descrito por *C. Beroud et al.* en la publicación *Human Mutation* 28:196-202 (2007). El estado actual de tratar las duplicaciones fue descrito por *A. Aartsma-Rus et al.* en la publicación *BMC Medical Genetics* 8:43-47 (2007), y una reseña sobre la omisión exón fue publicada por *A. Aartsma-Rus y G-J. B. van Ommen* en la publicación *RNA* 13:1-16 (2007).

Prueba clínica de omisión de exón en el Reino Unido.

En la reunión en Filadelfia, la fase I de prueba de omisión de exón no fue discutida, la cual después de un poco de demora, está a punto de empezar en el Reino Unido a principios del 2008. Pero porque esta prueba es tan importante, estoy repitiendo algo de mi resumen del 2006 de la reunión del PPUK en Londres con información más reciente añadida:

El consorcio MDEX fue creado en enero del 2005 para desarrollar la técnica de omisión de exón más allá y llevar a cabo estudios clínicos. Los miembros del consorcio son *Francesco Muntoni, Kate Bushby, Volker Straub, Dominic Wells, Jenny Morgan, George Dickson, Ian Graham, Matthew Wood, Steve Wilton, y Jenny Versnel*. El Departamento de Salud del R.U., el Concilio de Investigación Médica, el Parent Project UK (ahora Action Duchenne), y las asociación de distrofia muscular Británica, Muscular Dystrophy Campaign, están también involucradas.

Francesco Muntoni del Colegio Imperial como presidente del Consorcio MDEX, dijo en la reunión del 2006 de Londres que en este prueba, se intentara omitir el exón 51, porque en 20 % de los chicos con Duchenne, aquellos con la delección de los exones 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63 podrían ser tratados por la omisión de sólo éste exón 51. Seis oligos en antisentido diferentes, AONs, fueron probados en cultivos de músculo humano normal, en cultivos de músculo de niños con Duchenne, en preparaciones enteras de músculo (con Steve Wilton) y en ratones distróficos humanizados que contienen músculo de pacientes con Duchenne (con Judith van Deutekom). Los mejores resultados fueron obtenidos con el AON morfolino H51A desarrollado en el laboratorio de Steve Wilton. *Dominic Wells* podía mostrar en los experimentos con ratones mdx, y que este AON morfolino era suficientemente estable para un tratamiento a largo plazo en chicos con Duchenne. Este resultado fue obtenido por la cooperación de cuatro laboratorios, dos británicos, uno holandeses, y uno australiano, fue publicado en Septiembre del 2007 en la publicación *Human Gene Therapy*, 18: 798-810. Como se dijo antes, los morfolinos tienen una estructura que es químicamente diferente pero tienen una forma similar a los 2'O-metilos, por lo tanto, ellos no son realmente nucleótidos, pero para no hacer las cosas demasiado complicadas, también los abrevio como AONs.

El AON morfolino a ser usado por los británicos, es de 30 unidades de largo, incluye la secuencia entera del AON 2'O-metilo utilizado por los holandeses, que tiene solamente 20 unidades. Ambos componentes en antisentido se unen exactamente a su secuencia complementaria del in-centivador de empalmado exónico, ESE, dentro del exón 51 del ARNpre-m de la distrofina y en ningún otro lugar. Este bloqueo del ESE impide la unión de las proteínas SR que son componentes esenciales del complejo de proteínas del empalme del ARN. La consecuencia es la exclusión del exón seleccionado del ARNm, p.e. el exón es omitido. Las secuencias ESE de exones en genes diferentes tienen algunas semejanzas estructurales, pero son suficientemente diferentes, y ésta es la razón para la precisión de la omisión de exón: solamente el exón seleccionado es omitido en el gen seleccionado y no otro exón en el mismo gen o en alguno otro de los más de 20,000 genes humanos, así que es estadísticamente improbable que haya otra secuencia totalmente complementaria de la longitud de las dos

estructuras en antisentido en el genoma humano entero. Por lo tanto, es improbable que esta técnica genética cause cualquier efecto secundario genético.

En la prueba británica, tres grupos de dos chicos con Duchenne cada uno, de 12 a 18 años de edad, participarán. Tres dosis diferentes: 0.09, 0.297, y 0.9 mg de AON morfolino en una solución de 0.9 ml será usada en cada grupo, entregada en un volumen de un centímetro cúbico de tejido muscular, con nueve inyecciones directamente en uno de los dos músculos *extensores brevis digitorum*, en el exterior del pie que es necesitado solamente para mover los dedos del pie. Así que puede ser retirado sin serias consecuencias si algunos efectos secundarios inaceptables ocurrieran. Chequeos clínicos extensivos incluyendo biopsias serán hechos antes y 30 día después de las inyecciones para valorar los resultados del tratamiento.

Como la prueba holandesa, la prueba británica también solamente proveerá la *prueba de principio* de que la administración local del AON morfolino en un solo músculo humano es segura y es eficaz en restituir por lo menos un poco de la producción de distrofina. Es esperado que por lo menos con alguna de las dosis diferentes distrofina acortada aparezca en más del 10 % de las fibras musculares. Los chicos participantes no conseguirán ningún beneficio terapéutico. Pero todos los resultados de esta prueba serán necesarios después para una aplicación sistémica de los fármacos potenciales para Duchenne en la circulación sanguínea para que todos los músculos puedan ser alcanzados.

Después de una demora de varios meses, el último de los permisos necesarios por las autoridades reguladoras del R.U. ha sido dado en octubre del 2007, así los primeros chicos recibirán sus inyecciones de AON a principios del 2008 después de la terminación de todos los preparativos pre-clínicos.

Janet Rose Christensen es Vicepresidenta de Asuntos Regulatorios y Calidad de la compañía BioPharma AVI Inc. en Portland, Oregón en EUA. Explicó el papel de su compañía en la prueba de omisión exón en pacientes con Duchenne en el Reino Unido. Por varios años, esta compañía farmacéutica ha desarrollado los oligos morfolinicos en antisentido, *morfolinicos* para abreviar, como fármacos genéticos contra muchas enfermedades cardiovasculares, virales, y de hígado. Once pruebas clínicas con compuestos de esta clase ya han sido realizadas con más de 300 participantes. Por lo tanto, la compañía tiene una gran pericia química y clínica con estos fármacos en antisentido. Secuencias seleccionadas en el gen de la distrofina para inducir omisión de exón han sido identificadas, en cooperación con **Steve Wilton** en Perth en Australia. Con el consorcio MDEX, estarán activamente involucrados en la fase I de prueba clínica ahora a ser empezada en el R.U. aproximadamente.

El morfolino, llamado AVI-4658 por la compañía, que será usado en esta prueba para omitir el exón 51, es una cadena que consta de 30 subunidades. Los estudios de investigación han mostrado que este induce eficazmente la omisión de exón del exón 51. Este se une muy específicamente a la secuencia complementaria seleccionada en el centro del exón 51, usando el emparejamiento de bases Watson-Crick. Este morfolino consta de 1,144 átomos de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, y fósforo. Es sintetizado en el área de fabricación clínica de AVI por

personas entrenadas de acuerdo a los "*buenos procedimientos de fabricación*", GMP, para la producción de fármaco.

Antes de que el AVI-4658 pueda ser usado en la prueba británica, tuvo que ser aprobado por el MHRA (Autoridad Reguladora de Medicamento de Salud) en el Reino Unido. **Janet Christensen** describió los procedimientos complicados de aprobación en los Estados Unidos: Porque la distrofia Duchenne es considerada una "enfermedad seriamente debilitante y pone en riesgo la vida", se espera que la así llamada "Regulación de la FDA 21 CFR 312 Parte E" sea aplicada y que dice "...es apropiado ejercitar la flexibilidad más amplia para aplicar estándares estatutarios, mientras se preserven las garantías apropiadas para la seguridad y efectividad. Estos procedimientos reflejan el reconocimiento de que los médicos y pacientes son generalmente voluntariosos en aceptar grandes riesgos o efectos secundarios de productos que tratan enfermedades que ponen en riesgo la vida y seriamente debilitantes, de los que aceptarían de productos que tratan las enfermedades menos serias."

Janet Christensen terminó su presentación diciendo: "Estas regulaciones otorgan poder a la FDA de ver de manera un poco diferente en estas aplicaciones para una terapia de Duchenne, de aquel otro fármaco para el dolor de cabeza, y es ahora importante conseguir la primera prueba clínica con este morfolino en marcha y terminarla con éxito. Esperamos que esto abra un proceso de aprobación mucho más rápido para las muchas siguientes que serán necesarias para tratar a todos los chicos cuya enfermedad puede ser tratada por omisión de exón."

Los primeros pasos hacia la multi-omisión de exón.

Terence Partridge del Centro Médico Nacional Infantil en Washington habló de algunos problemas abiertos con la omisión de exón, y luego de la suya y la nueva investigación de sus colegas que trabajan para omitir dos exones en perros distróficos para abrir el camino para la multi omisión de exón que llevara la nueva técnica también a los chicos con Duchenne, que necesitan que más de un exón sea omitido para restaurar el marco de lectura cambiado de la distrofina.

La omisión de exón en ratones mdx trabaja bien con los AONs *2'O-metil* y *morfolinicos* contra el exón 23, inyectados repetidamente en su circulación sanguínea produciendo nueva distrofina en algunos músculos de hasta 50% del nivel normal. Pero los morfolinicos no ingresan a los músculos del corazón y la razón para este fallo no es conocido. **Dominic Wells** del Colegio Imperial en Londres informó en la conferencia del 2006 del PPUK en Londres, sobre los primeros experimentos que mostraban que los morfolinicos entran en el corazón bajo tratamiento de ultrasonido. El Dr. Partridge y sus colegas también están trabajando en este problema.

Aunque los ratones mdx no tienen ninguna distrofina en sus músculos, sus síntomas de distrofia son muy leves, por lo tanto, no son un modelo animal ideal de la distrofia muscular Duchenne humana. Y ya que viven solamente cerca de dos años, los experimentos a largo plazo de varios años no pueden ser realizados con ellos. Sin embargo, los perros viven mucho más tiempo que los ratones, y los perros perdigueros dorados GRMD distróficos son físicamente discapacitados, por lo tanto, los experimentos con estos

perros darían resultados que podrían ser probablemente muy similares a lo que uno podría ver después en estudios clínicos de pacientes con Duchenne.

Los experimentos con perros GRMD tienen otra ventaja: en las dos pruebas clínicas en Holanda y el R.U. para omitir el exón 51 en chicos con Duchenne se ha visto y mostrado posteriormente que la omisión de exón trabaja realmente en pacientes. En estas pruebas, solamente un solo exón está siendo omitido. Pero cerca del 50% de todas las distrofias Duchenne son causadas por deleciones, duplicaciones, y mutaciones puntuales, mencionadas en la base de datos de Duchenne de Leiden, necesitarán omitirse dos o más exones para restaurar el marco de lectura. Y algunas multi-omisiones de exón serían una terapia para grupos algo grandes de pacientes. Por ejemplo, omitir los 11 exones del 45 al 55 causaría una distrofia Becker con síntomas muy leves en hasta 63 % de los chicos con Duchenne con deleciones. Y ya que los perros distróficos necesitan una omisión doble de exón, los experimentos con ellos abrirían el camino para un tratamiento de esos chicos con Duchenne con mutaciones más difíciles.

Los perros distróficos tienen una mutación en el sitio de empalme del exón 7 en el gen de la distrofina que causa la deleción del exón 7 en el ARNm, y un cambio del marco lectura con un codón de parada prematuro pronto después. Omitiendo los dos exones 6 y 8 se 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, fueron inyectados localmente en el músculo tibialis-anterior de perros GRMD adultos jóvenes. Dos semanas después de la inyección, biopsias fueron realizadas, que mostraban que nueva distrofina había aparecido en todas las fibras musculares alrededor del sitio de la inyección y que la estructura del músculo parecía casi normal.

El *Dr. Partridge* y sus compañeros de trabajo han colaborado recientemente con *Shin 'ichi Takeda* en la Instalación de Investigación Animal General en Tokio, donde podían aplicar inyecciones sistémicas en la circulación sanguínea de los perros con resultados muy prometedores. Como los detalles de estos experimentos todavía no son publicados, no pueden ser resumidos aquí.

La omisión de exón con AONs morfolinos tiene varias ventajas: (1) resultan en una entrega de cuerpo completo a todos los músculos, pero todavía con la excepción del corazón; (2) son muy eficaces; (3) no parecen ser tóxicos; (4) no son metabolizados, degradados, en el cuerpo pero se excretan con la orina; (5) solamente tienen un efecto de corto plazo así que serán necesarios tratamientos repetidos, pero esto permitiría poner fin al tratamiento si una mejor terapia esta disponible; y (6), no crean problemas inmunitarios porque no contienen proteínas foránea y la nueva proteína distrofina es solamente producida dentro de los músculos.

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 garantía de que estos fármacos potenciales surtirán efecto y durante mucho tiempo suficiente en chicos con Duchenne. La mayoría del trabajo en los años anteriores ha sido hecho con los AONs morfolinos y los 2'O-metilos. Una terapia final futura bien pudiera necesitar de una mezcla de ambos tipos de AONs para optimizar el efecto de omisión y minimizar la toxicidad.

Y los problemas todavía desconocidos que puedan aparecer que uno podría quizás tener que resolver con otros cócteles de AONs o incluso con otras clases de AONs.

¿Pero cuándo habrá un fármaco de omisión de exón para chicos con Duchenne? Hice esta pregunta a *Gertjan van Ommen* en Leiden en una entrevista en Enero del 2004. Su respuesta algo larga fue acortada aquí a 5 palabras: "estará lista en 10 años". La entrevista entera está en mi informe de Mónaco 2004-1 en www.duchenne-research.com. Los diez años no significaban un intervalo de tiempo científicamente preciso. Sólo fue un estimado por un científico destacado que trabajaba en esta nueva técnica, que supo muy bien qué pasos de investigación lentos todavía eran necesarios y que hay muchas cosas que podían ir mal. Ahora, a fines del 2007, usted podría decir que un poco más de 6 años es lo que falta de los 10 originales, si usted toma estos 10 años en su primera impresión. ¡Pero usted no debe hacer eso! El número de años restantes podría ser 8, 9, e incluso 10 otra vez, o, si todo va bien, pocos como 4 o 3.

Y me fue dicho por algunos, que uno no debía dar ningún estimado de tiempo, porque usted, los padres, tomarían esta información literalmente y empezarán a contar los meses y días que faltan. Por otro lado, sé que aquellos, que tienen una idea de cómo trabaja el mundo real de la vida, y el mundo de la ciencia en especial, comprenderán esta situación y apreciarán la siguiente declaración, que recibí de *Francesco Muntoni*, que lo escribió después de haber hablado con su colega van Ommen:

"Estoy enteramente de acuerdo en que es importante proveer información realista; y es realista esperar que durante los próximos 6 años la comunidad científica, después de haber omitido el exón 51, hayan terminado más pruebas sistémicas de AONs para omitir algunos exones adicionales. Es importante darse cuenta de que un curso experimental hacia una terapia nunca se detiene. Por ejemplo, hay nuevos antibióticos que son producidos constantemente. No creo que tengamos que esperar 6 años para ver el primer beneficio potencial; pero igualmente estoy muy seguro que el tipo de AONs y su modo de la entrega que estamos usando ahora serán considerados obsoletos para ese entonces. Es por lo tanto probable que durante los próximos 6 años, veremos el desarrollo de un método eficaz y seguro para la administración repetida de algunos AONs, y con suerte esto resultará en una respuesta clínica importante y positiva. Al mismo tiempo también es muy probable que nosotros, la comunidad científica, estaremos estudiando todavía mejores estructuras químicas y métodos de entrega, y no podríamos estar sorprendidos si en otros 6 años, estudios clínicos adicionales serán iniciados para evaluar AONs nuevos y mejorados.

El punto que realmente quiero para lograrse, es que éste sea un curso amplio, no un único objetivo, y las cosas proveídas estén avanzando, éste será un curso muy lleno de acontecimientos en la dirección correcta. A veces las cosas ocurren más rápido de lo que esperamos, y estos estallidos de genialidad de alguien que los causa, son siempre muy bienvenidos pero totalmente imprevisible. Esperamos aprender mucho de las pruebas tempranas con AONs, y lo que aprendemos afectará positivamente la entrega, diseminación y eficacia, y reducirá significativamente el tiempo

de espera para los muchos que miran y esperan.

La transferencia del gen de la distrofina, la primera prueba clínica con un vector de virus. La siguiente descripción está basada en los resúmenes de mis informes de las reuniones de Cincinnati y Londres sobre las presentaciones de **Scott McPhee** de la compañía *Asklepios Biopharmaceuticals* y **Xiao Xiao** de la Universidad de North Carolina, así como en Chapel Hill NC. La información anterior es actualizada con los nuevos datos dados en la reunión en Filadelfia por **Christopher Shilling** del Centro para Terapia Génica Muscular en el Laboratorio de Investigación Infantil en Columbus/ Ohio donde la prueba tiene lugar.

La transferencia de un gen de la distrofina modificado con un *vector viral*, un transportador de un gen, a las células musculares es una de las estrategias para una terapia de distrofia muscular Duchenne. El uso de virus adeno-asociados, AAV, como vectores tiene algunas ventajas importantes. Son muy eficaces en el músculo y corazón y pueden probablemente ser usados tratar a todos los pacientes con Duchenne sin considerar sus mutaciones. Los estudios pre-clínicos de prueba-de-principio en ratones y perros distróficos han ayudado al desarrollo de un vector de mini-gen de la distrofina para la primera prueba clínica de este método de terapia génica. El vector usado es un AAV de serotipo 2.5, uno así llamado nano partícula biológica *Biostrophin*TM desarrollada por la compañía Asklepios. Estos virus no pueden ser multiplicados por las células que infectan, porque la mayoría de sus genes fueron retirados. Esta modificación hizo el espacio para las secuencias de codificación del gen terapéutico a ser transferido.

Sin embargo, los vectores AAV son algo pequeños, pueden solo aceptar material genético foráneo de no más largo de aproximadamente 5,000 pares de bases. Por esta razón, el ADNc de la distrofina normal, los 79 exones combinados sin los intrones, que es de aproximadamente 14,000 pares bases de largo, tuvo que ser acortado considerablemente para ajustarse a este vector pequeño. Una transferencia de tal *ADNc del mini-gen* no curaría por lo tanto la distrofia muscular Duchenne, pero puede transformarla en una forma Becker de progresión mucho más lenta.

Por lo tanto, los vectores usados en la primera prueba están llevando la construcción de gen de mini-distrofina delta-3990, con partes eliminadas del exón 17 y todos los exones del 18 al 59 y del 70 a 79. Eso significa que la esperada distrofina Becker será un tercio de larga de la proteína normal. En 1990, un paciente de Becker de 61 años fue diagnosticado y quien todavía era capaz de caminar y tenía esta clase de distrofina acortada en sus músculos.

Esta prueba clínica fase-Ia de terapia génica es ahora realizada bajo la supervisión del *Dr. Jerry Mendell* en el Hospital Infantil de la Escuela de Medicina en la Universidad Ohio State en Columbus. Fue aprobada por la Agencia Federal de Fármacos FDA, siguiendo pruebas de seguridad y toxicología del vector AAV de mini-distrofina en animales de laboratorios. Ha empezado el 28 de marzo del 2006, cuando el primer chico recibió las primeras inyecciones de *Biostrophin* en tres sitios, con 0.5 cm. de separación, en su músculo bíceps de un brazo, mientras los bíceps del otro brazo recibió solo solución salina. La prueba

es hecha con método doble-ciego, ni los pacientes ni los investigadores médicos y científicos saben hasta el final de la prueba entera en qué bíceps fueron inyectados los vectores.

Ningún beneficio terapéutico es esperado en los chicos en esta primera prueba, cuyo objetivo principal es proveer la *prueba de principio* de que este tipo de terapia génica no solo trabaja en un músculo esquelético de ratones y perros, si no también en un músculo humano. Los otros objetivos eran coleccionar datos de seguridad, para determinar la dosis requerida para conseguir la producción de la mini-distrofina en el músculo; y ver si hay cualquier reacción inmunológica a la mini-distrofina o al material del vector.

Seis chicos con Duchenne que tienen al menos cinco años y de quienes las mutaciones del gen de la distrofina son conocidas precisamente, estaban participando. Todos los seis ahora han recibido sus inyecciones. Dos dosis diferentes fueron usadas para cada grupo de tres pacientes. Muestras de tejido muscular del sitio de la inyección fueron obtenidas por biopsias de cuatro chicos a las cuatro semanas y de dos chicos a las doce semanas después de las inyecciones.

Ningunos eventos adversos relacionados con terapia génica fueron observados, indicando que el procedimiento es bien tolerado. Debido a la naturaleza del diseño doble-ciego, las muestras de la biopsia muscular fueron guardadas congeladas hasta el final de la prueba entera, cuando fueron examinadas en busca de la presencia de nueva distrofina acortada. Los resultados de estos análisis estarán disponibles a finales del 2007.

Los próximos estudios fase-Ib están siendo ahora preparados con perros y monos. Transferencia génica alentadora y resultados de expresión ya han sido obtenidos. Esta fase de estudio con chicos con Duchenne se espera sea realizada en el 2008 y 2009. En esta prueba, un miembro entero recibirá infusiones de los vectores a través de circulación sanguínea temporalmente obstruida. Esta entrega regional puede potencialmente brindar un poco de mejora en la calidad de vida de los participantes. Finalmente, una fase II/III de prueba con entrega sistémica de cuerpo entero es planeada para el 2009/2010 con un número grande de pacientes.

Transferencia génica con pericitos, células madre de músculo adultas. *Giulio Cossu* del Instituto de Célula Madre en el Hospital San Raffaele en Milán describió el muy prometedor trabajo suyo y sus colegas hacia una terapia de células madre para distrofia Duchenne.

Para una terapia de células madre eficaz de la distrofia Duchenne, una fuente segura y éticamente aceptable de una cantidad grande de células madres de músculo adultas es necesaria, eso daría lugar predominantemente a células musculares y no a células no deseadas como tumores. Y debe ser posible aplicar estas células sistémicamente inyectándolas en el sistema de vasos sanguíneos que puede distribuir las alrededor del cuerpo. Luego tienen que cruzar el vaso y las paredes celulares de músculo, y quedarse dentro de las fibras sin crear algún problema local. Estas condiciones al parecer fueron encontradas en los *meso-angioblastos*, que son células madre adultas ubicadas en el exterior de los pequeños vasos sanguíneos dentro del tejido muscular de donde pueden ser aislados.

Para sus primeros experimentos en animales, los inves-

tigadores italianos usaron un ratón con un tipo de distrofia muscular de cinturas (anillo óseo, limb-girdle), que tiene ausente una proteína de las proteínas del complejo distrofina. Después de las inyecciones de mesoangioblastos de ratones normales, estas células madre "Sanas" eran capaces de causar la re-aparición de más del 80 % de la cantidad normal de la proteína faltante, el *alfa-sarcoglicano*, en todos los músculos esqueléticos de los ratones distróficos.

Para una posible terapia de Duchenne con esta nueva técnica, el gen intacto de la distrofina tiene que ser transferido del tejido muscular de un donador sano a los mesoangioblastos de los pacientes, en un procedimiento de laboratorio con un vector viral. Entonces algunas células transducidas que contienen el gen de la distrofina normal, deben ser multiplicadas y re-inyectadas finalmente en la circulación sanguínea del paciente. Tal tratamiento autólogo evitaría problemas inmunológicos. Por otra parte, los mesoangioblastos de un pariente sano con genes de la distrofina normales pueden ser usados. Pero esta clase de tratamiento heterólogo necesitaría la supresión inmune a largo plazo.

Los mesoangioblastos usado en estos experimentos fueron aislados de las paredes de vasos sanguíneos de ratones y perros. Pero para realizar el próximo paso hacia el desarrollo de un método terapéutico para pacientes de Duchenne, tales células madre deben ser obtenidas de una fuente humana y ser usadas en los experimentos con animales. El Dr. Cossu y sus colegas han hecho efectivamente esto durante los últimos meses y publicando sus nuevos resultados en Febrero del 2007, en la revista *Nature Cell Biology* 2007: 9, 255-267.

Por lo tanto, los investigadores buscaron células madre similares en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos de tejido muscular humano obtenido de biopsias diagnósticas. Encontraron allí tales células madre, pero sus propiedades eran algo diferentes de los mesoangioblastos. Por lo tanto, estas células fueron llamadas "células derivadas de pericito", o *pericitos* para abreviar. Sus propiedades eran exactamente esas que las células madre deben tener para ser usadas en una terapia de Duchenne, concretamente: (1) son fáciles de aislar del material biológico humano como tejido muscular; (2) pueden ser multiplicados considerablemente en el laboratorio a las cantidades necesarias para un tratamiento sistémico de chicos; (3) es posible transferir las secuencias del gen de la distrofina "sanas" en ellos con vectores virales; (4) pueden emigrar de la circulación sanguínea a los músculos; y (5) desarrollan células musculares funcionales dentro del tejido muscular viviente.

Los resultados más decisivos fueron obtenidos en experimentos con ratones mdx que, en adición de no tener alguna distrofina, también tenían su sistema inmunológico desactivado por manipulación genética. Uno mes después de tres inyecciones sistémicas de pericitos normales, esto es no-distróficos, en las arterias de la pierna de cinco de estos ratones, 200 a 450 nuevas fibras musculares con distrofina fueron encontradas por norma en las muestras representativas que investigaron. Cuando pericitos humanos de pacientes con Duchenne con genes de la distrofina mutados, tratados primero con los vectores de virus conteniendo genes de mini-distrofina, fueron inyectados de forma semejante en estos ratones, 190 a 320 nuevas fibras musculares con mini-distrofina fueron encontradas en los músculos investigados. La función de los músculos en los

ratones tratados se encontró fue mejorada significativamente.

Por lo tanto, como próximo paso hacia una aplicación humana, el equipo del Dr. Cossu aisló mesoangioblastos de perros normales y distróficos, los multiplicó en cultivos y los inyectó en una arteria de las patas delanteras de los perros distróficos. Las células de perro no han sido caracterizadas en gran detalle, y por tanto no era conocido si correspondían realmente a los pericitos en seres humanos. Para esta razón fueron llamados mesoangioblastos otra vez.

Cuatro perros fueron tratados con cinco inyecciones sistémicas mensuales de células autólogas aisladas de cada perro tratado, en las que el gen, el ADNc, de una micro-distrofina humana fue transferido con un vector viral en el laboratorio. En este caso, ninguna supresión inmune era necesaria. Pero, contra la expectativa, este tratamiento no fue exitoso. La razón para el fracaso podría haber sido que la longitud corta de la distrofina producida, después de la transferencia del gen de la micro-distrofina, era insuficiente para mantener la función muscular en un animal grande como el perro.

En un tratamiento heterólogo, seis otros perros fueron inyectados de forma semejante con células donadas de perros sanos pero con inmunosupresión con ciclosporina. En este caso, una expresión extensiva de distrofina normal y una mejora de la función muscular fueron obtenidas. En un animal, las células fueron soltadas de un catéter en la aorta. Esto permitió la diseminación más extendida de las células. Los resultados de las inyecciones de células madre eran dramáticos: este último animal exhibió una mejora notable en su distrofia y caminaba bien cinco meses después de la inyección final; los otros animales se recuperaron en un grado menor.

Los investigadores planean repetir los experimentos con las células autólogas después de la transferencia de genes de una mini-distrofina en vez de los micro-genes más cortos, y posiblemente también usen el método genético de omisión de exón desarrollado por Luis García en Francia.

El Dr. Cossu terminó su presentación con la declaración: "Proponemos ahora una prueba clínica con pacientes de Duchenne. Pero primero tenemos que realizar estudios a largo plazo con los perros, y tenemos que hacer pruebas de toxicología y preparar las células humanas bajo las condiciones de grado clínico. Este trabajo ya ha empezado y tomará otro año. En la prueba, tres pacientes recibirán inyecciones a nivel local en un músculo para ver si estas células madre humanas producen distrofina humana realmente en un músculo humano. De allí en adelante, tres otros pacientes recibirán inyecciones sistémicas de células donadas con fármacos contra el rechazo inmune de las células foráneas.

La primera y más importante medida será la seguridad durante mucho tiempo. Ya sabemos que nada pasó a los ratones y perros, pero no sabemos qué pasaría a los niños cuando los tratemos realmente en una prueba clínica. La segunda medida será ver si la fuerza muscular es mantenida o aun incrementada. Hemos desarrollado un nuevo método de medir la fuerza en fibras musculares solas. Y, obviamente, seguiremos todas recomendaciones de TREAT-NMD.

Este tratamiento de células madre todavía está en su

infancia. No sabemos qué eficaz será, y cuales serian ser los riesgos. Después de todo, estaremos inyectando muchas células en los chicos, y podría haber problemas serios. El procedimiento es complicado, tomará unos años, y

costará mucho. Pero tiene un gran potencial, y estamos excitados sobre sus posibilidades. Lo probaremos en chicos porque podría resultar en una cura verdadera."

Acercamientos farmacológicos.

Aumento de la utrofina para reemplazar la distrofina.

Hay cuatro grandes desafíos que tienen que ser encontrados por alguien que trata de encontrar una terapia para distrofia Duchenne: (1) la función de la enorme proteína distrofina que está faltante en los niños de Duchenne, tiene que ser restituida; (2) para hacer una diferencia, al menos 20 % del nivel normal de distrofina tiene que reaparecer otra vez, o si no esta proteína, entonces otra, como la utrofina que puede reemplazarla; (3) esto debe ocurrir en todos los músculos esqueléticos, y en aquellos del corazón y los pulmones, también; y (4), cualquier respuesta inmune en contra de una nueva proteína tiene que ser evitada.

Cuando *Kay Davies*, ahora en la Universidad de Oxford, trató de encontrar el gen Duchenne hace más de 20 años, encontró en su lugar una proteína, la *utrofina*, y su gen. La utrofina es una proteína con una estructura y función muy similar a la distrofina. En humanos, su gen está ubicado en el cromosoma 6, tiene 75 exones, y es aproximadamente de un millón de pares de bases de largo. Como la distrofina, conecta la estructura de la F-actina en las células con un complejo de proteínas en las membranas, similares al complejo asociado con la distrofina. La utrofina está presente en varios tejidos del cuerpo, también en el músculo humano, pero allí está concentrada en las regiones donde los nervios motores hacen contacto con las membranas del músculo en las *junciones neuromusculares*.

En pacientes con Duchenne, la utrofina empieza a extenderse de las junciones nervio-músculo a las membranas del músculo. Cuanta más utrofina un paciente tiene, él más tarde debe usar una silla de ruedas. Eso quiere decir que una más grande cantidad utrofina por la activación de su gen haría la distrofia Duchenne más benigna. Durante el desarrollo fetal a las 12 semanas, los músculos contienen ambas, utrofina y distrofina, luego la utrofina desaparece lentamente de las membranas celulares, hasta que en el parto solamente distrofina queda en las membranas. Por lo tanto, la utrofina es una forma fetal de la distrofina. Esto quiere decir, que la reactivación del programa de desarrollo para la utrofina resultaría en un tratamiento para distrofia Duchenne.

Los ratones mdx cuyo gen de la utrofina fue inactivado experimentalmente, que no tienen ni distrofina ni utrofina en sus músculos, tienen síntomas como de Duchenne y se mueren temprano, en contraste con "la normalidad" de ratones mdx cuyos músculos indican un daño menos severo a pesar de la ausencia de distrofina.

En otros experimentos con ratones mdx transgénicos que tenían mini-genes de utrofina en su línea germinal, introducidos por una técnica que no puede ser usada en humanos, fue mostrado, que la utrofina, si está presente en cantidades más grandes, puede reemplazar a la distrofina. Incrementando la cantidad de utrofina por un factor de tres a cuatro, el desarrollo de los síntomas distróficos algo ligeros de los ratones mdx podían ser prevenidos.

Por lo tanto, para una posible terapia de Duchenne, uno debe tratar de incrementar los bajos niveles de utrofina junto al *aumento* de la actividad de su gen. El gen tiene dos sitios de inicio diferentes, las secuencias promotoras, al que los compuestos de señalización se unen para iniciar la síntesis de la proteína. Un promotor induce la producción de una forma predominante de dos formas similares de utrofina, la *utrofina-A*, que se localiza exclusivamente en cantidades algo pequeñas en las junciones neuromusculares de todas las células musculares. Los investigadores entonces empezaron a interferir en este proceso de señalización, así que más de la forma-A de la utrofina es hecha y dirigida a las membranas celulares del músculo, donde posiblemente ocuparía los sitios desocupados por la distrofina en chicos con Duchenne. Sin embargo, se reconoció rápidamente que encontrar una sustancia que podía aumentar la utrofina, y luego desarrollarla a un fármaco potencial para una terapia eficaz de distrofia Duchenne, era una tarea difícil y costosa que no podía ser realizada en un laboratorio de la universidad. Así que la Dra. *Davies* co-fundó la compañía *Summit plc*, antes *VASTox plc*, ubicada en Abingdon cerca de Oxford.

En esta compañía, a finales del 2007, más de 30,000 compuestos químicos habían sido analizados por su habilidad de aumentar la actividad del gen de la utrofina en los cultivos de tejido de ratones mdx. La enzima productora de luz, luciferasa, de luciérnagas es usada en un sistema de reactivo recientemente desarrollado para probar la presencia de utrofina. Hasta julio del 2007, 31 sustancias prometedoras fueron encontradas, las cuales pudieron incrementar la luciferasa varias veces. Están ahora siendo optimizadas y evaluadas en ratones mdx vivos con el objetivo de incrementar la eficiencia más allá, y asegurar que la utrofina es suficientemente aumentada en todos los músculos de los animales. Pruebas de detección adicionales con el pez cebra distrófico están en curso, que identificaran posiblemente otros fármacos para tratar la distrofia Duchenne.

Dos de los compuestos activos más tempranos, el VOX A y VOX B, ya han sido evaluados sistémicamente en ratones por inyección intraperitoneal, en el abdomen. Después de 12 semanas de inyecciones sistémicas semanales, en los músculos esqueléticos evaluados de los ratones fue aumentada la utrofina con evidencia de beneficio muscular. Después de la optimización posterior de los compuestos, un candidato de desarrollo clínico, el SMT C1100, mostraba reducción de la degeneración muscular, fibrosis, deposición de grasa, e inflamación crónica, por lo tanto, los animales habían recuperado significativamente su función muscular. Después de las inyecciones diarias durante 28 días, ningún efecto secundario apareció, así que el compuesto parece ser seguro. Si la toxicología y manufactura preclínica en curso son exitosas, las pruebas de seguridad en humanos con voluntarios sanos podrían tener lugar a mediados del 2008 y con pacientes con Duchenne

podrían empezar probablemente a principios del 2009.

Tratamiento con biglicano aumenta la utrofina. En la reunión del 2006 en Cincinnati, *Justin Fallon* de la Universidad Brown en Providence, RI, describió el trabajo de su laboratorio sobre la proteína *biglicano* (biglycan), ahora, en Filadelfia, presentó los nuevos resultados mostrando que el biglicano puede aumentar la utrofina dramáticamente.

La proteína biglicano está presente durante el desarrollo en el exterior de los músculos esqueléticos y del corazón, y conecta con sus dos extremos a las proteínas alfa- y gamma-sarcoglicano, que son dos componentes del complejo distrófico-proteico en las membranas celulares del músculo. El biglicano es importante para la regulación de muchas proteínas señaladoras y estructurales de las membranas. Los experimentos con ratones no-distróficos cuyo gen para el biglicano fue desactivado, mostraban que en ausencia del biglicano muchas proteínas del complejo distrófico habían desaparecido. Tratando a estos ratones con inyecciones locales y sistémicas de biglicano recombinante humano, artificialmente hecho, resultó en la reaparición de la proteína beta-sintrofina, que era un indicativo de que el complejo distrófico fue restituido.

Biglicano humano también fue administrado por inyecciones locales y sistémicas a ratones mdx, donde mejoró mucho los síntomas de estos animales ligeramente distróficos que no tienen distrofina en sus músculos. Sin embargo, el descubrimiento más sorprendente fue, que después de las solas inyecciones sistémicas, su normal nivel bajo de utrofina en el músculo tratado fue aumentado aproximadamente cerca de 2.5 veces de dos a tres semanas después del tratamiento.

El próximo paso fue ver si el tratamiento con biglicano mejora la función muscular en ratones mdx. Después de tres meses de repetidas inyecciones sistémicas con biglicano humano, los músculos de estos ratones sin distrofina eran mucho más resistentes al daño causado por alargamiento forzado y contracciones.

El biglicano está presente en el desarrollo en humanos, por lo tanto, su uso como un fármaco no se esperaría cause un rechazo inmune importante. Debido a que actúa fuera de las células musculares, no tiene que cruzar las membranas del músculo cuando se usa como un agente terapéutico. Los alfa- y gama- sarcoglicanos, las dos proteínas a las que el biglicano se une, están solamente presente en los músculos esqueléticos y cardíacos. Eso significa que el biglicano puede 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. Tardará aproximadamente de 12 a 18 meses fabricar suficiente biglicano humano en grado de pureza clínica, así que una fase I de prueba clínica podría entonces ser empezada en aproximadamente dos años con este fármaco potencial para Duchenne.

Leer a través de los codones de parada prematuros con PTC124. *Langdon Miller* de PTC Therapeutics en South Plainfield, NJ, actualizó los resultados resumidos en mis informes sobre las conferencias de Cincinnati y Londres, con la información más nueva sobre la fase II de prueba

clínica con PTC124.

Cerca del 13 a 15 % de los pacientes con Duchenne tienen una mutación sin sentido o de parada en su gen de la distrofina, que cambia un solo codón de aminoácido en uno de tres codones de terminación prematuros, 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 distrofina sea ensamblada completamente. En este caso, una distrofina trunca es producida, que es demasiada corta para tener su función normal. El PTC124 es un fármaco de molécula-pequeña, diseñado para permitir que la maquinaria creadora de proteína *lea a través* (o por encima) de la señal de alto prematura, resultando en la producción de la proteína de largo completo. Para que un niño se beneficie de este fármaco, la mutación exacta debe ser determinada por la secuenciación de la región alrededor del sitio de la mutación, para ver si realmente hay una mutación sin sentido que causa su distrofia Duchenne. Solamente cuando eso es verdadero, es posible que el PTC124 pueda tener actividad. Por lo tanto, el PTC124 puede ayudar a que la maquinaria celular supere una de las causas genéticas de la DM Duchenne. Tal tratamiento es diferente de la terapia génica o de omisión de exón.

El PTC124 es un fármaco nuevo, primero en su clase. Fue encontrado en un programa de búsqueda de fármaco automatizado de alto-caudal, que evaluó cerca de 800,000 compuestos de bajo peso molecular por su habilidad de superar los efectos de mutaciones sin sentido. Éstos compuestos fueron entonces optimizados químicamente durante varios años de trabajo de laboratorio. Aunque fue el antibiótico gentamicina el primero en demostrar inducía la lectura a través de los codones de parada, el PTC124 no está relacionado con la gentamicina y no es un antibiótico. Los detalles del PTC124, incluyendo su estructura molecular y su prueba pre-clínica intensiva, han sido divulgados en la revista *Nature*, 447, 87-91 del 3 mayo del 2007 con un comentario de *News & Views* "Ignore the nonsense" en la página 42.

El PTC124 no está todavía disponible comercialmente, todavía está bajo el desarrollo de estudios animales y humanos. Es un medicamento oral, un polvo cristalino blanco con un sabor suave de vainilla, proporcionado en paquetes pequeños. El fármaco es mezclado con agua, leche o jugo antes del uso.

Ya que el PTC124 puede inducir la lectura a través de las mutaciones sin sentido en cualquier ARNm, es también un fármaco potencial para otros trastornos genéticos atribuibles a mutaciones sin sentido, p.e., fibrosis quística. De hecho, PTC Therapeutics ya ha dirigido algunos estudios fase II y espera iniciar estudios a largo plazo con la fibrosis quística así como con pacientes de Duchenne.

Para determinar si el PTC124 puede ser un fármaco útil para Duchenne, experimentos preclínicos fueron hechos en cultivos de células. El tratamiento de PTC124 en células musculares mdx en estos cultivos, mostraba que distrofina de largo completo fue producida y se trasladó a su correcto lugar debajo de la membrana muscular. En ratones mdx vivos, después de la dosis oral por hasta ocho semanas aparecía nueva distrofina en los músculos esqueléticos, diafragma y corazón, lo que redujo la fragilidad del músculo y las concentraciones de CK sanguíneo. Los estudios de toxicidad en ratones, ratas y perros a los que se les dio

dosis altas del fármaco, no han indicado en general efectos secundarios serios agudos. Inflamación de riñones fue observada en ratones e inflamación de la glándula suprarrenal fue vista en perros. Tumores de grasa marrón fueron encontrados en ratas en un estudio pero no se vieron otra vez cuando el estudio fue repetido. Pruebas claras de cualquier problemas de riñón o adrenal similar en humanos no han sido vistos. Los humanos no tienen mucha grasa marrón así que es improbable que este efecto sea significativo para los humanos. En estudios clínicos la atención especial será dada a la prueba para problemas de riñón o glándula adrenal.

En la primera prueba clínica del PTC124, una fase I de prueba de método abierto fue realizada en 61 voluntarios adultos sanos de 18 a 30 años de edad. Este rango de edad fue escogido porque era similar al de los adultos jóvenes con Duchenne. Recibieron el fármaco tres veces al día durante tanto como dos semanas. La absorción del fármaco también era evaluada con y sin comida. El fármaco fue bien absorbido en el cuerpo y era posible mantener las concentraciones de plasma de 2 a 10 microgramos/ml, como se sabía era activo en ratones mdx. El PTC124 demostró pocos efectos secundarios como náusea, diarrea y dolor de cabeza en dosis muy altas de más de 150 mg/kg. Algún aumento leve de enzimas de hígado fue visto a veces. Dosis de hasta 100 mg/kg/día fueron toleradas bien por estos adultos sanos, una dosis mayor que la planeada a ser dada a niños con Duchenne.

Estos resultados respaldaron el inicio de una fase-II de estudio clínico. En la parte inicial de esta prueba clínica de método abierto, 26 niños con Duchenne, de 5 a 13 años, completaron el enrolado y la prueba. Seis niños recibieron una dosis de 16 mg/kg/día y 20 niños recibieron una dosis de 40 mg/kg/día divididos en tres partes por día. Los niños tenían mutaciones de parada diferentes: 15 con UGA, 6 con UAG, y 5 con UAA, distribuidas entre los exones 6 a 70. Los pacientes fueron valorados clínicamente por más de 21 días antes del tratamiento, entonces recibieron el fármaco diario durante 28 días y finalmente seguían exámenes durante 28 días adicionales. Biopsias musculares fueron realizadas antes y después del tratamiento en los músculos del pie *extensor digitorum brevis*, para buscar la restauración de la producción de distrofina de largo completo. Otras pruebas químicas y funcionales también fueron hechas para medir el efecto terapéutico y monitorear la seguridad.

Antes de que los niños de los primeros dos grupos recibieran el fármaco, el tejido muscular de su biopsia inicial fue tratado con PTC124 en el laboratorio. Los aumentos esperados dependientes de la dosis en la cantidad de distrofina de largo completo, fueron detectados en el 100% de los niños en estos experimentos de laboratorio. En cerca del 50% de los 26 niños en ambos grupos de dosis, 3 de 6 en el grupo de dosis más baja y 11 de 20 en el grupo de dosis más alta, un aumento ligeramente visible de distrofina podía ser detectado en el material de la biopsia que se obtuvo al final del tratamiento con el fármaco durante 28 días. Una de las razones de por qué nueva distrofina no fue encontrada en todos los niños, podría ser que la concentración de PTC124 en la sangre estaba debajo del rango de concentración esperado de 2 a 10 microgramos/ml de plasma, posiblemente debido a la rápida degradación del fármaco en niños comparado con adultos. Pero todos estos

niños mostraron una reducción de la actividad del CK durante el tratamiento, que aumentó luego otra vez durante el período de continuación sin el tratamiento, como se esperaba para un agente farmacéutico que tiene que ser administrado continuamente. Fueron observados algunos efectos secundarios de leves a moderados pero infrecuentes, como diarrea, náusea y dolor de cabeza, y no había ninguna anomalía de laboratorio clínicamente relevante.

Algunos padres y profesores observaron que, después del tratamiento, algunos de los niños mostraron mayor actividad, incrementaron la resistencia, y menos fatiga que antes del tratamiento. Estos son solamente informes informales de los padres, así que esta clase de descubrimientos tienen que ser valorados en más detalle.

Basados en estos resultados, se asumió que una dosis más alta de PTC124 podía resultar en la aparición de nueva distrofina en cantidades suficientes para tener un efecto terapéutico. Por lo tanto 12 niños adicionales con Duchenne fueron enrolados en esta prueba. Estos niños recibieron 80mg/kg/día de PTC124 dividido en tres dosis separadas y dadas por 28 días. Esta dosis debe ser suficiente llegar a una concentración de al menos 2 a 10 microgramos/ml en el plasma sanguíneo. Esta extensión de la prueba ha sido completada, los datos están siendo analizados ahora, y los resultados finales estarán disponibles pronto.

Al final de su presentación, el Dr. Miller mencionó tres preguntas que tienen que ser respondidas antes de que el PTC124 pueda volverse un fármaco para chicos con Duchenne: (1) ¿Actividades positivas a corto plazo del PTC124 se traducirán en beneficios clínicos deseados a largo plazo como la función muscular, la fuerza, y resistencia aumentada, así como mejor calidad de vida? (2) ¿Qué dosis del PTC124 proveerá el mejor beneficio clínico sin peligro? (3) ¿Cuántos meses tomará traducirse la actividad farmacológica de corto plazo en un beneficio clínico a largo plazo?

Solamente una prueba clínica a largo plazo y controlada puede abordar estos asuntos. Los próximos pasos a ser tomados por PTC Therapeutics por lo tanto, son terminar el análisis de los datos de los estudios de fase-IIa terminados, y luego preparar todos los requisitos para la evaluación de una prueba clínica a largo plazo por la FDA estadounidense y el EMEA europeo antes del final del 2007. Esta prueba más larga es esperado empiece en los meses venideros. PTC también abrirá una extensión de estudio a largo plazo para los niños tratados en la fase-IIa de prueba.

Proyecto Catalyst: Descubriendo y desarrollando cuatro nuevos fármacos para tratar la distrofia Duchenne. La compañía PTC Therapeutics en South Plainfield, NJ, esta enfocada en el descubrimiento y desarrollo de fármacos de pequeña-molécula, que modifican el control *post-transcripcional* (PTC) de la biosíntesis de proteínas, después de que la información genética es copiada, transcrita, del gen al ARN. *Ellen Welch*, una jefa de grupo de esta compañía, presentó el *Proyecto Catalyst*, un programa para descubrir y desarrollar pequeños compuestos químicos que pueden volverse fármacos para una terapia de distrofia muscular Duchenne.

El Proyecto Catalyst fue empezado en mayo del 2004 con el objetivo de identificar con métodos de búsqueda automáticos entre varios cientos de miles compuestos,

aquellos que pueden modificar la producción, *expresión*, de cuatro objetivos biológicos en las células musculares. Estos cuatro objetivos fueron escogidos, porque la investigación ya había mostrado que aumentando o disminuyendo su expresión pueden mantener y mejorar la estructura y función del músculo en pacientes de Duchenne: La disminución o inactivación de la *miostatina* y el aumento del *factor de crecimiento similar a la insulina* IGF-1 específico del músculo, pero no de la isoforma específica del hígado, promovería el crecimiento y regeneración muscular. El aumento o activación de la *utrofina e integrina-alfa7* estabilizaría la membrana muscular y mejoraría la función muscular por lo tanto.

Los métodos de búsqueda automáticos para encontrar estos fármacos potenciales para Duchenne, usan un procedimiento de prueba recién creado para medir sus actividades con un sistema de reporte de proteína: los ARNm para cada uno de los cuatro objetivos fueron combinados con el gen de la enzima luciferasa de luciérnagas. En presencia de un compuesto activo, luz intensa es producida por la luciferasa la cual entonces es incrementada o reducida. Medir de forma exacta y automática la intensidad de la luz es mucho más fácil que analizar los efectos biológicos de los objetivos.

Un relativo pequeño número de compuestos con al menos algunas de las propiedades deseadas, están siendo ahora optimizados, cambiando su estructura química y caracterizar sus propiedades biológicas, farmacológicas y médicas. Cambios de la estructura química que afectan, p.e., la actividad, potencia, solubilidad, permeabilidad, metabolismo, toxicidad, efectos secundarios, biodisponibilidad oral, y otras propiedades, están en marcha. Este proceso de optimización ocupa a muchos químicos durante varios años. Finalmente, para los compuestos más prometedores, la síntesis del laboratorio tiene que ser aumentada suficientemente para producir suficiente material para una prueba pre-clínica en tejido muscular aislado y animales vivos como ratones mdx. Un número de compuestos con la habilidad de modificar la expresión de los objetivos están ahora en varias etapas de este proceso de optimización.

PTC Therapeutics tiene ahora varios fármacos potenciales disponibles que disminuyen la miostatina a concentraciones muy bajas, aumentan la isoforma muscular del IGF-1, pero no la específica de hígado, y aumentan la utrofina e integrina-alfa7 dos veces. Estos muy prometedores fármacos potenciales serán optimizados adicionalmente durante los próximos años, con el objetivo de empezar estudios clínicos de fase-I para la toxicidad con niños con Duchenne alrededor del 2009.

La información del gen de la distrofina mismo, incluyendo sus mutaciones, no será cambiada por estos fármacos, tendrán probablemente que ser tomados por toda la vida del paciente. Pero posiblemente después podrán ser usados en combinación entre ellos, y con otros fármacos y técnica genéticas como la omisión de exón para proveer una terapia de Duchenne óptima y muy eficaz.

La inhibición del NFκB mejora la estructura y función muscular. *George Carlson* y su equipo en la Universidad Still en Kirksville, Missouri, estaban tratando de comprender por qué la pérdida de distrofina resulta en una distrofia muscular en el ratón mdx, porque deseaban diseñar un enfoque de investigación centrado en una terapia. Había sido

propuesto que la entrada, el influjo, de cantidades grandes de iones de calcio, átomos de calcio cargados, en las células musculares era responsable de los síntomas distróficos. Pero la medición del influjo de calcio en fibras aisladas severamente distróficas del músculo expiratorio *triangularis sterni*, TS, de ratones mdx, mostraba que este influjo no estaba incrementado realmente en estas fibras estresadas, comparado con el influjo en fibras musculares normales bajo las mismas condiciones. Esto indicó que un aumento del influjo de calcio no es responsable de la degeneración muscular en la distrofia muscular. Sin embargo, el músculo TS es estirado pasivamente cada vez que el animal aspira, sugiriendo que ese estiramiento pasivo de las fibras distróficas activaba un mecanismo que promueve la degeneración del músculo. Otros investigadores mostraron que el estiramiento pasivo activa la vía de señalización NFκB en el músculo. El Dr. Carlson y sus colegas pronto empezaron a probar la hipótesis de que la activación de esta vía era responsable del daño del músculo TS distrófico estirado.

Esta proteína NFκB fue encontrada en 1986, el mismo año que el gen de la distrofina. Está presente en el citoplasma de todas las células, pero la mayor parte del tiempo, esta inactivada por otra proteína, la inhibidora κB, o IκB. Cuando la inflamación es iniciada por complejos procesos reguladores para combatir una infección viral o bacteriana, el complejo IκB kinasa, IKK, añade dos grupos de fosfato al NFκB y por lo tanto, lo libera de su inhibidor. El NFκB ahora activado migra del citoplasma al núcleo de la célula y, debido a que se une ahí a regiones promotoras y activadoras de muchos genes, causa la activación de estos genes. Varios cientos de genes se conocen que son parte de los diferentes pasos de cadenas de reacción, llamadas *cascadas*, que dependen del NFκB activo en el núcleo de la célula. Cuando la inflamación no es necesitada más, la activación del NFκB es detenida por los factores anti-inflamatorios. Si mutaciones genéticas, otras situaciones patológicas o de estrés no permiten que estos factores desactiven el NFκB, algunas enfermedades crónicas se desarrollan, como la arteriosclerosis, fibrosis de pulmón, asma, artritis reumatoide, y probablemente también distrofia Duchenne.

El Dr. Carlson empezó a evaluar fármacos que impiden la activación del NFκB y estudió los efectos de estos fármacos sobre el músculo TS crónicamente estirado. Hay varios fármacos que pueden impedir la activación del NFκB. Uno de éstos es el ditiocarbamato de pirrolidina que ha sido demostrado previene se separe el complejo inactivo NFκB-IκB, con el propósito de que el NFκB no pueda moverse hacia el núcleo de la célula. Este fármaco se encontró era eficaz para mejorar la estructura y función del músculo distrófico. Algunos de estos fármacos inhibidores del NFκB ya está aprobada su venta para el tratamiento de otras condiciones. Uno de éstos es la Sulfasalazina, que es usada para el tratamiento de la artritis reumatoide juvenil.

El Dr. Carlson y sus compañeros de trabajo ya han evaluado estos dos fármacos sobre fibras aisladas del músculo TS de ratones mdx, y encontraron que su diámetro y su función habían aumentado significativamente. En este momento, el Dr. Carlson está revisando algunos fármacos que impiden la vía del NFκB, y está particularmente interesado en probar compuestos que están siendo

ahora usados en tratar otras condiciones. Al final, el Dr. Carlson dijo: "Tal vez debemos empezar a considerar pruebas clínicas para algunos de estos fármacos inhibidores del NFκB que están ahora siendo usados para tratar otras enfermedades humanas."

Beta-agonistas, fármacos potenciales para distrofia Duchenne. *Gordon Lynch* de la Universidad de Melbourne en Australia presentó el trabajo de investigación de su laboratorio, del uso de los fármacos bien conocidos llamados beta-agonistas para mantener e incrementar los músculos de pacientes con Duchenne. Los beta-agonistas son sustancias similares a las hormonas, que se unen a proteínas receptoras específicas en las membranas celulares, y luego influyen en su actividad iniciando vías de señalización dentro de la célula, por las cuales, a través de una cadena de proteínas especializadas interactuantes, señales químicas son enviadas a objetivos biológicos en la célula que tienen que ser activados, inhibidos, o modificados para asegurar el funcionamiento apropiado de las células bajo condiciones cambiantes. La vía, o *reacción en cascada*, influida y modificada por los beta-agonistas, es la llamada *vía de señalización beta-adrenergica* que es, entre otros efectos biológicos, importante para el control de síntesis y degradación de proteína.

Algunos beta-agonistas son fármacos que ya son ampliamente usados por inhalación para relajar los músculos lisos de la vía aérea de pacientes de asma, son *broncodilatadores*. Otros tienen poderosos efectos anabólicos en los músculos esqueléticos, especialmente cuando se inyectan en dosis altas en la circulación sanguínea. Son a veces explotados ilegalmente por atletas que buscan mejoras en el tamaño del músculo y reducciones de grasa del cuerpo.

Como los beta-agonistas podrían ser también útiles para revertir el deterioro muscular en personas de edad, el Dr. *Lynch* y sus colegas probaron su potencial anabólico en experimentos con ratas de 28 meses, que se estaban acercando al final de su duración de vida acostumbrada de aproximadamente 30-32 mes. En el 2004, los investigadores mostraron que el tratamiento diario de estas ratas viejas por 4 semanas con 1.4 mg/kg con *fenoterol* por inyección intraperitoneal, en el abdomen, anuló el deterioro muscular ligado a la edad. En comparación con ratas adultas de 16 meses, que habían terminado su crecimiento, la masa muscular de las ratas viejas era significativamente más grande, las fibras musculares tenían un diámetro más grande, la fuerza del músculo fue incrementada, y muchas de las fibras musculares lentas se habían hecho fibras rápidas, resultando en contracciones musculares más rápidas y más fuertes. Estos resultados indicaron que los beta-agonistas posiblemente podían ser usados en la *sarcopenia*, el deterioro y debilidad muscular asociada a la población en crecimiento de personas de edad. El fenoterol es uno de la generación vieja de beta-agonistas, y en experimentos siguientes el Dr. Lynch y sus colegas han revisado la eficacia y mas fuerza de los beta-agonistas de nueva generación, como el formoterol y salmeterol, ambos están aprobados para tratar el asma en humanos.

Si el deterioro muscular de personas de edad sanas pudiera ser tratado por beta-agonistas, entonces es obvio que también pudieran ser beneficiosos para los pacientes con enfermedades con deterioro muscular como la distrofia muscular Duchenne.

De hecho, una primera prueba clínica con pacientes con distrofia Duchenne y Becker ya ha sido realizada. Como el fenoterol no pudo ser usado, los participantes fueron tratados por 28 semanas con 8mg/día de *albuterol*, otro beta-agonista que es un fármaco aprobado. Esta dosis baja fue escogida después de otra prueba de un año con pacientes con distrofia FSH adulta, en la que se mostró que en dosis de 16 y 32 mg/día el albuterol resultó en algunos problemas cardíacos inaceptables. La dosis reducida en la prueba con Duchenne no causó ningunos efectos secundarios, pero produjo solamente un aumento modesto de la fuerza muscular que era insuficiente para tener un efecto terapéutico.

Por lo tanto, el Dr. Lynch y sus colegas se preguntaron si el beta-agonista más fuerte, *formoterol*, sería eficaz en ratones mdx distróficos. Dosis muy bajas de formoterol, 25 microgramos/kg, aumentaron el tamaño de la fibra muscular y mejoraron la función de dos músculos esqueléticos probados de estos ratones distróficos. Importante, estas mejoras en la fuerza muscular no fueron relacionadas con ningún cambio en la fatiga del músculo.

Los planes para futura investigación hacia una terapia de Duchenne incluirán experimentos pre-clínicos adicionales, especialmente de separar los efectos positivos de los beta-agonistas sobre los músculos esqueléticos, de su potencial influencia negativa en el corazón. Debido a que estos beta-agonistas actúan en la misma clase de receptores que son encontrados en los músculos esqueléticos y el corazón, separar sus efectos es un desafío científico importante. Después de todo, los pacientes con Duchenne no necesitan un aumento de sus corazones. También, otro efecto secundario, la desactivación de los receptores beta en las membranas celulares del músculo, debe ser evitada para permitir el desarrollo de beta-agonistas con efectos a largo plazo. Después de que estos problemas hayan sido resueltos en ratones y perros, será posible realizar nuevas pruebas clínicas con chicos con Duchenne.

Bloquear los agentes inflamatorios. La degradación y muerte de células musculares en la distrofia muscular causa procesos inflamatorios que limpian los residuos celulares. Los corticoesteroides pueden suprimir la inflamación, y esto es probablemente una de las razones por el qué el fármaco *prednisona*, su forma activa *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 incómodos. Están siendo usados extensamente en chicos con Duchenne para mantener la función muscular por lo menos algunos años. Pero su mecanismo exacto de acción todavía no es conocido.

Melissa Spencer de la Universidad de California en Los Angeles informó sobre los experimentos para contrarrestar la inflamación y la respuesta inmune, y así encontrar las maneras de reemplazar eventualmente los corticoesteroides con fármacos que se centran en el daño mediado por el sistema inmune. Alguno del siguiente texto está basado en la presentación de *Sylvia Lopez*, una estudiante postgraduada en el laboratorio de la Dra. Spencer, en la reunión del año pasado del PPMO en Cincinnati.

Estudios han indicado que niveles aumentados de células T CD4 y CD8, y más importante, células mieloides del sistema inmune aceleran la evolución de la enfer-

medad. Estas células segregan citocinas, moléculas que promueven la inflamación y el desarrollo de fibrosis, en músculos mdx y Duchenne. En personas sanas, éste es un proceso normal de curación de una herida que estabiliza el tejido débil y promueve la curación. En niños con Duchenne, este proceso se sale control y se vuelve crónico, así que es como una herida constantemente curándose. Por lo tanto, la inhibición o el retiro de células inmunes, y también la modulación de citocinas activas, posiblemente disminuiría la velocidad de degradación y fibrosis de músculos distróficos. Varios fármacos anti-inflamatorios aprobados ya existen. Si pudieran demostrar influyen positivamente en la distrofia Duchenne, tomaría mucho menos tiempo obtener el permiso de la FDA para el tratamiento adicional de Duchenne que para la aprobación de un totalmente nuevo fármaco.

Tres de estos fármacos están ahora siendo evaluados en el laboratorio de la Dra. Spencer con ratones mdx. Y ya están siendo probados en pruebas clínicas en pacientes con otras enfermedades: *CTLA-4lg* contra la artritis reumatoide, *Galectin-1* también contra la artritis, ya ha sido demostrado mejoran la regeneración muscular, y el *Anti-asialo GM1*, un anticuerpo usado en el Mal de Parkinson. La prueba en ratones mdx de otros dos fármacos continúa; *Remicade®* y *Enbrel®*, ambos aprobados para artritis reumatoide y otras enfermedades. Otro objetivo importante para fármacos anti-inflamatorios es la proteína NFkappaB, que fue hablado en esta reunión por el Dr. Carlson.

Al final de su presentación, la Dra. Spencer mencionó importantes nuevos resultados. La *osteopontina* es una proteína que se encuentra en el flujo sanguíneo y que tiene muchas funciones en biología ósea, regulación inmune, supervivencia celular, inflamación y metástasis del cáncer. Ha sido mostrado que su concentración está aumentada en la sangre y también en los músculos de ratones mdx. Los ratones mdx sin osteopontina tienen mejor fuerza muscular, valores de CK menores, y fibrosis reducida. Por lo tanto, si un fármaco puede ser encontrado que inhiba la osteopontina en pacientes con Duchenne, probablemente mejoraría la reparación muscular, mejoraría su función, y reduciría la fibrosis.

Los estudios de tratamiento a largo plazo serán necesarios para determinar si estos fármacos podrían volverse terapias para pacientes con Duchenne, y por lo tanto podrán usarse en lugar de los corticoesteroides, y posiblemente en combinación con métodos genéticos como la omisión de exón para mejorar su esperanza y calidad de vida.

Prueba clínica con MYO-029 para inhibir 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 luego inicia una serie de reacciones químicas dentro de la célula, que limita el crecimiento de los músculos. Por lo tanto, desactivando la miostatina, debe ser posible estimular la regeneración de fibras musculares de niños con Duchenne para que no sean destruidas tan rápido o incluso podrían aumentar de tamaño.

Ratones no-distróficos cuyo gen de la miostatina fue desactivado por métodos genéticos, tienen músculos esqueléticos hasta tres veces más grandes, con significa-

tivamente más fibras de diámetro mayor de lo normal. Hay un ganado vacuno, la raza Azul Belga, que es muy musculoso porque su gen de la miostatina fue desactivado por una mutación hace los siglos. Recientemente fue descubierto que en los perros de carreras ingleses *bully whip-pets*, sus músculos muy grandes eran también causados por la ausencia de miostatina. Y en Berlín, un niño físicamente muy fuerte ahora de 8 años fue identificado, cuyos músculos esqueléticos son dos veces mas grandes de los de un niño normal. Ésta es una señal poderosa de que la inactivación o inhibición de la miostatina resultaría en un aumento del crecimiento muscular en niños con Duchenne también. Sin embargo, una terapia de miostatina no podría influir en la causa genética de la enfermedad, pero podría probablemente, en combinación con tratamientos genéticos más básicos como la transferencia del gen de la distrofina y la omisión de exón, aumentar sus efectos terapéuticos.

Kathryn Wagner del Centro Wellstone de Distrofia Muscular en la Universidad Johns Hopkins en Baltimore, informó ya en la reunión en Cincinnati que su equipo de investigación había criado a ratones mdx que, en adición a no tener distrofina, tampoco podían hacer miostatina. Los ratones adultos de estos animales sin miostatina tenían músculos más normales, tenían menos fibrosis, tejido cicatrizante, y regeneraron sus músculos más rápido que los ratones mdx "normales".

Para responder a la pregunta si la ausencia de miostatina tendría efectos similares en el corazón, las investigaciones adicionales con ratones mdx mostraban que el bloqueo de miostatina no tenía ningún efecto sobre el corazón. Esto significa que la actividad de la miostatina parece estar restringida a solo los músculos esqueléticos.

En la cooperación con la compañía Wyeth Pharmaceuticals en Collegeville cerca de Filadelfia, una prueba clínica con Myo 029, un anticuerpo específico que se une a la miostatina y bloquea su actividad, está siendo realizada ahora. Esta proteína no causa rechazo inmune porque su estructura es humana, esta "humanizada". Puede ser inyectada en la circulación sanguínea o bajo la piel.

Tres grupos de 36 pacientes de distrofia muscular adulta, entre algunos de ellos pacientes de Becker, están siendo tratado por vía intravenosa con 1, 3, y 10 mg/kg de MYO-029 cada dos semanas por 24 semanas, seguido de 12 semanas de pruebas y supervisión clínica.

El objetivo de este fase I/II de prueba clínica es valorar la seguridad y probar hay alguna eficacia. Los resultados preliminares muestran que el MYO-029 es tolerado bien y que su seguridad a corto plazo es excelente. Habrá una publicación tan pronto como la prueba este terminada y los resultados sean completamente analizados y valorados.

Como será importante saber los efectos a largo plazo de este fármaco, un estudio con perros distróficos es planeado. Wyeth no es la única compañía activa en este campo. Otras compañías están desarrollando otros métodos de bloquear la actividad de la miostatina, no sólo para el tratamiento de distrofias musculares, sino también para otros problemas de salud mucho más importantes económicamente como el deterioro muscular en personas viejas.

La Dra. Wagner terminó su presentación en Cincinnati con la advertencia, repetida aquí: Los padres no deben comprar supuestos inhibidores de la miostatina ofertados en Internet. Estos compuestos no han pasado por pruebas clínicas y son probablemente inútiles o incluso peligrosos.

El BBIC inhibe las proteasas, pero el Myodur (C101) no lo hace. *Lee Sweeney* de la Universidad de Pennsylvania en Filadelfia habló de la nueva investigación en la inhibición de proteasas. La degradación de proteínas del músculo en la distrofia Duchenne es causada por varias proteasas diferentes, enzimas destructoras de proteínas, entre ellas la enzima *calpaína*, que es activada por el calcio, y un gran complejo de proteína, llamado el *proteasoma*. Cuando, como en la distrofia Duchenne, las membranas celulares del músculo se agujerean porque la distrofina está ausente, iones de calcio, átomos cargados, de afuera de las células activan a la calpaína e indirectamente también al proteasoma. Esta actividad enzimática aumentada resulta en la destrucción extendida de proteínas celulares importantes, que son requeridas para la función de la célula muscular y su supervivencia. Los investigadores están tratando de inhibir la actividad de la calpaína y otras proteasas y retrasar la degradación de la célula muscular por lo tanto.

Uno de estos inhibidores es el *inhibidor concentrado Bowman-Birk*, BBIC, una proteína natural compuesta de 71 aminoácidos, que puede ser aislada de las semillas de soya (soja). Es una sustancia soluble en agua que puede ser tomada de forma oral. Como es demasiado grande para entrar en las células musculares, bloquea varias proteasas como las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina fuera de las células, e interrumpe vías de señales que pueden producir procesos de inflamación en la distrofia Duchenne. El BBIC bloquea el proceso distrófico en ratones mdx inhibiendo la degeneración muscular, este efecto es comparable a la prednisona. El tratamiento a largo plazo con BBIC incrementa la masa y fuerza muscular en ratones mdx. La actividad de la CK y fibrosis son también reducidas considerablemente. De otras aplicaciones en pacientes con cáncer, es conocido que el BBIC es un fármaco muy seguro.

Pruebas clínicas fase I están ahora siendo preparadas junto con el Dr. *Kenneth Fishbeck* en los Institutos Nacionales de Salud de EUA en Bethesda acerca de Washington, y empezarán tan pronto como la aprobación de la FDA sea obtenida. Si las pruebas clínicas muestran que resultados similares a aquellos encontrados con ratones mdx pueden ser obtenidos en niños con Duchenne, este fármaco algo benigno, aunque no puede resolver el problema genético básico, puede posiblemente disminuir la velocidad de la degradación muscular en la distrofia Duchenne. Las semillas de soya también contienen otras proteasas, así que el BBIC debe ser aislado y purificado de ellas. Comer las semillas directamente no tiene ningún efecto.

El tripéptido *leupeptina* fue el primer inhibidor identificado que posiblemente podía reducir la actividad de la enzima calpaína en ratones mdx. La leupeptina consta de tres aminoácidos con un grupo aldehído químicamente reactivo que es esencial para la actividad inhibitoria. El *Myodur*, el compuesto C101 investigado y desarrollado por la compañía CepTor en Baltimore, es una combinación de leupeptina con carnitina, que fue pensado para inhibir la calpaína más eficazmente que la leupeptina como informo la Dra. *Theresa Michele* de CepTor en la reunión del 2006 del PPMD en Cincinnati. En el laboratorio del Dr. *Sweeney*, fueron realizados estudios pre-clínicos adicionales para verificar los efectos de la leupeptina, así como del *Myodur*, antes de que estudios clínicos pudieran ser empre-

dos. Los resultados fueron decepcionantes: en los experimentos con ratones mdx, fue mostrado que el *Myodur* después de un tratamiento de 8 semanas, o la leupeptina después de un tratamiento de 6 meses, no incrementó el tamaño del músculo, y no mejoró la función muscular, y no redujo el daño muscular. En efecto, la calpaína no era inhibida si no aumentada por estos fármacos, y la calpastatina, un inhibidor natural de la calpaína, fue disminuida. Así que la calpaína no parece ser un objetivo útil para un fármaco de Duchenne. La prueba clínica planeada por CepTor no tendrá lugar.

Pruebas clínicas internacionales con agentes farmacológicos: el *Grupo Cooperativo Internacional de Investigación Neuromuscular*, CINRG, es una cooperación de 22 hospitales en EUA, Canadá, Bélgica, Italia, Suecia., Argentina, Australia, e India, que realiza pruebas clínicas en niños con Duchenne. *Diana Escolar*, del Centro Médico Nacional Infantil en Washington, DC, quien organiza y supervisa estas pruebas, habló de las pruebas terminadas y todavía en curso más recientes. Para la documentación de estos estudios, métodos de control estandarizados han sido desarrollados para medir no sólo las funciones musculares, sino también muchos otros parámetros incluyendo la calidad de vida.

La Dra. *Escolar* no habló de los resultados de dos pruebas recientemente terminadas que ya han sido publicadas. Son la prueba con *creatina* y *glutamina*, publicada en la revista *Annals of Neurology* 58:151-155 (2005), que indicaban un efecto leve pero no importante sobre la función muscular, y la prueba con *oxatomida*, publicado en la revista *European Journal of Pediatric Neurology*, Abril 23, 2007, que no indicaba una mejora importante de la función muscular.

La Dra. *Escolar* presentó entonces los primeros resultados de un estudio piloto fase I/II piloto de método abierto con pentoxifilina, en niños con Duchenne que no recibieron corticoesteroides al menos durante un año fueron reclutados. Diecisiete niños con Duchenne de 4 a 7 años de edad participaron. La prueba empezó en marzo del 2002 y fue terminada en julio del 2006. Al principio, cada niño fue clínicamente controlado por 3 meses y luego tratado por 12 meses. El efecto del tratamiento fue medido por pruebas de función muscular cuantitativa y por varias otras pruebas. Ocho de los niños dejaron el estudio prematuramente, a algunos de ellos debido a efectos secundarios como leucopenia, una disminución del número de glóbulos blancos.

El más importante, sin embargo negativo, resultado fue que el tratamiento de un año con pentoxifilina *fallo al no incrementar* significativamente la fuerza y función muscular. Pero, aunque los niños no recibieron ningún corticoesteroide, no había deterioro de su fuerza muscular. Por lo tanto, puede haber sido un efecto estabilizador del tratamiento. Para verificar si esto es realmente el caso, un estudio más grande y controlado es necesario.

Tal estudio doble-ciego con 64 pacientes con Duchenne mayores a 7 años, pero todavía capaces de caminar al menos 10 metros, ha sido empezado en septiembre del 2005, y será terminado en diciembre del 2007. Cada niño recibió el fármaco o un placebo diario por 12 meses. Los pacientes pueden usar corticoesteroides u otros compuestos adicionales como creatina, glutamina, co-enzima Q10,

etc. pero no era permitido cambiar estos tratamientos durante el estudio.

Una fase II de estudio piloto de método abierto con coenzima Q10, en 13 chicos con Duchenne ambulantes de 7 a 11 años de edad tratados con corticoides empezó en septiembre del 2001, y fue terminado en enero del 2005. La dosis inicial de 90 mg/día fue subida a 400 mg/día, que resulta en el nivel de suero objetivo de al menos 2.5 microgramos/ml. El único efecto secundario fue migraña en un niño en una dosis elevada que pudo ser resuelto con reducción de la dosis. Los niños fueron tratados diariamente por seis meses y luego tenían la alternativa de quedarse con el fármaco hasta la terminación del estudio.

Este tratamiento con co-enzima Q10 *incrementó la función muscular* un 7.3 % sobre el promedio en estos pacientes de Duchenne tratados con corticoide. La función muscular fue medida por pruebas de músculo cuantitativas totales.

En base a este resultado, una prueba clínica aleatoria controlada por placebo con 120 pacientes no ambulatorios de 10 a 15 años será empezado en marzo del 2006, que es esperado se termine en diciembre del 2008. Los pacientes están siendo tratados diariamente por 12 meses en 4 grupos que recibe cada uno 0.75 mg/kg/día de prednisona, o Co-enzima Q10 para conseguir un nivel en suero de 2.5 microgramos/ml, o una combinación de ambos fármacos. Los resultados del tratamiento son comparados con pacien-

tes que reciben un cuidado mejorado estandarizado, pero ningún placebo es usado.

Los resultados de todas las pruebas serán publicados tan pronto como sean valorados completamente. Información sobre estas y otras pruebas en Duchenne están en internet en www.clinicaltrials.gov.

Al final de su presentación, la Dra. Escolar mostró una lista de lo que, como directora de la clínica neuromuscular en el Centro Médico Nacional Infantil, sugiere que los padres deben dar a sus niños con Duchenne:

Tratamiento con 0.75 mg/kg/día de *prednisona*, o 0.9 mg/kg/día de *deflazacort* sólo si el paciente o la familia son obesos y después asesoramiento nutricional, debe empezar inmediatamente después del diagnóstico; *vitamina D* y *suplementos de calcio*; *dieta estricta* basada en alta proteína y baja en carbohidratos y grasas, p.e. carne magra, frutas y verduras frescas; 5 g/día de *creatina*; 0.3g/kg de *glutamina* dos veces un día; 200-400 mg/día de *co-enzima Q10*; otros suplementos aceptados, pero no incentivados que dependen de los padres, son p.e. extracto de té verde, arginina, y anti-oxidantes como el Protandim. Cuando el tratamiento con corticoesteroide es empezado de los 2 a 4 años de edad, el aumento de peso es menos problema que cuándo se empieza después. El crecimiento reducido es otro efecto secundario en todas las edades. Los cambios conductuales son menores o pasajeros cuando el tratamiento es empezado temprano.

¿Cómo aprueba la FDA un fármaco para Duchenne?

Tan Nguyen de la Oficina de la FDA de Desarrollo de Productos Huérfanos en Washington, explicó en una presentación muy comprometida y optimista que la Administración de Fármacos y Alimentos de EUA, la FDA, no está ahí para demorar o parar el desarrollo de fármacos muy necesitados, pero que las preocupaciones y la ansiedad de una familia con un niño con una enfermedad incurable son comprendidas bien por la FDA. Mucho ha sido hecho para acelerar el proceso de aprobación de fármacos para enfermedades raras y serias como la distrofia muscular Duchenne, y disminuir la carga financiera relacionada con su desarrollo.

La Acta Federal de Alimentos, Fármacos y Cosmético original fue firmada en la ley en 1938 después del desastre con el elixir de sulfanilamida, que causó la muerte de 107 pacientes a los Estados Unidos. Pero hasta 1962, la FDA solo podía forzar a los fabricantes a probar que sus fármacos eran seguros. Después de que más de 10,000 niños deformes nacieron en Alemania por talidomida, de nombre comercial *Contergan*, una catástrofe aun mas grande apenas fue evitada en EUA por su aprobación demorada debido a los datos de seguridad insuficientes. El proceso de aprobación de un fármaco de la FDA fue modificado en octubre 1962 de manera radical, con la introducción de las enmiendas Kefauver-Harris. De ese tiempo en adelante, a los fabricantes se les exigió no solo probar que un fármaco es seguro, si no también que es eficaz a la FDA para aprobarlo para su venta.

Un desarrollo de un fármaco no huérfano tiene que pasar por las siguientes etapas: (1) La fase preclínica implica estudios de laboratorio y animales que toman en promedio 6.5 años a un costo de \$1-12 millones para asegurar su se-

guridad, actividad biológica, y formulaciones; (2) la *fase-I* de investigación clínica entre 20-100 voluntarios sanos (duración de 1.5 años en promedio) para determinar su perfil de seguridad en humanos; (3) la *fase-II* de investigación clínica entre 100-500 pacientes (duración 2 años en promedio) para evaluar la dosis óptima, seguridad, y eficacia; (4) la *fase-III* de investigación clínica entre 1,000-5,000 pacientes (duración 3.5 años en promedio) para confirmar la seguridad del fármaco y eficacia de uso a largo plazo. El costo de todas las tres fases investigación clínica es de cerca de \$15-300 millones. Por lo tanto, el tiempo total de desarrollo puede ser de hasta 15 años, con un costo medio de cerca de \$360 millones. En general, de 5,000 compuestos valorados, solamente uno es aprobado y llega al mercado. Para el desarrollo de un *fármaco huérfano* para una enfermedad como la distrofia muscular Duchenne, con un número limitado de pacientes, algunos requisitos de investigación no podrían ser aplicables. Por lo tanto, tienen que ser modificados creativamente dentro de un marco regulador rígido.

Cuando los estudios pre-clínicos han sido terminados, el patrocinador del fármaco presenta una nueva *Solicitud de Nuevo Fármaco Investigado*, IND, en la FDA para obtener el permiso de dirigir estudios clínicos del fármaco. Después de la terminación de todas las fases de investigación clínica, el patrocinador archiva una *Solicitud de Nuevo Fármaco*, NDA, para iniciar el proceso de aprobación de venta final. El proceso de aprobación de la FDA implica examinar los datos pre-clínicos y clínicos para respaldar la seguridad y efectividad del fármaco. Esto toma, en la mayoría de los casos, un año o menos, a un costo de más de un millón de dólares.

Un fármaco es llamado *fármaco huérfano* si, entre otras definiciones, su intención es tratar una enfermedad infrecuente que afecta a menos de 200,000 personas en los Estados Unidos. Con cerca de 10,000 chicos de Duchenne viviendo en EUA, esta enfermedad es considerada una enfermedad infrecuente y un fármaco desarrollado para su tratamiento puede ser considerado un fármaco huérfano. Seis fármacos potenciales para Duchenne ya han recibido la designación de fármaco huérfano: el mazindol, oxandrolona, PTC124, los AONs 2'-O-metilos para omisión de exón, la leupeptina, e idebenona. Desafortunadamente, algunos de estos fármacos no están más en desarrollo clínico activo por varias razones. Hasta ahora, la FDA ha aprobado más de 300 fármacos huérfanos para aproximadamente 180 otras enfermedades raras.

Cuando una compañía desarrolla un fármaco huérfano, consigue varios incentivos financieros a través del proceso de designación de fármaco huérfano. Éstos son: (1) 50% de los costos de desarrollo clínico son abonados en su impuesto federal; (2) exención del pago normal a la FDA de aplicación de venta de más de un millón de dólares; y (3) una exclusividad de venta de siete años seguido a su aprobación de venta. La compañía también puede competir por subvenciones de fármaco huérfano de hasta \$400,000 por un año, hasta cuatro años (\$1.6 millón total) para costear los gastos de las pruebas clínicas. Debe ser apuntado que un potencial acortamiento del tiempo de aprobación de hasta tres años en algunos casos, podría ser posible a través de la *Aprobación de la Subparte E*. Esto es conseguido principalmente aprobando el fármaco en base de adecuados datos de la fase-II de investigación clínica. Un fármaco todavía no aprobado bajo investigación activa, pero que demuestra ser prometedoramente seguro y eficaz, puede ser permitido sea dado a pacientes con una enfermedad seria o inmediatamente con peligro de muerte bajo el uso del programa compasivo, si ninguna terapia alternativa satisfactoria existe.

El Dr. Nguyen también habló de muchos detalles de cómo la FDA supervisa el proceso de desarrollo entero para garantizar la seguridad de los pacientes en las pruebas clínicas y la demostración de la efectividad del fármaco.

Los fármacos huérfanos, también, tienen que ser seguros y eficaces. Entre las muchas respuestas que el Dr. Nguyen tuvo que dar a las preguntas después de su presentación, aquí se ponen dos a continuación:

"Es poco claro para pronosticar con cualquier seguridad razonable en este momento, que tanto cada uno de los muchos oligonucleótidos en antisentido con secuencias diferentes tendrían que pasar por el proceso de aprobación entero como nuevos fármacos. Sería deseable si el primero de cada clase tenga que pasar por el, y para los siguientes, el proceso sería algo abreviado. Es razonable que la comunidad Duchenne deba pensar un poco adelante sobre este asunto y proveer sugerencias apropiadas o recomendaciones en algún foro público."

"La FDA insiste en que la aprobación de un fármaco huérfano esté sujeta a los mismos altos estándares para la seguridad y eficacia como para cualquier fármaco no huérfano. Aún así, la FDA esta consciente de la opinión de algunos padres que debido a que la enfermedad es tan grave, se pueda dar un fármaco no aprobado pero prometedora a sus hijos enfermos inmediatamente y no esperar muchos años más, incluso si esto incrementa el riesgo considerablemente y que algo negativo pueda pasar."

Kate Bushby dijo en este contexto y escribo sus palabras en casi su totalidad: "Sabemos que tenemos que conseguir algo que trabaje en los pacientes rápido. Pero tenemos que minimizar todos los riesgos. No quiero dar algo a un niño de 6 años que no sea posiblemente eficaz, porque la DM Duchenne no mata a niños de 6 años mañana. Uno no aprende lo suficiente de una fase I de prueba para hacer una extrapolación a un tratamiento a largo plazo. Cada paso de una prueba indica algo diferente. En cada paso, un fármaco podría fallar, no queremos eso, pero pudiera. ¡Podría incluso haber fatalidades! Si un médico da un fármaco después de una fase I de prueba y demuestra ser peligroso en la fase II de prueba, estará en un problema legal. Si usted quiere que un fármaco vaya a una amplia comunidad, tiene que pasar por un proceso de regulación. Solamente entonces estará disponible y asequible a todos los que lo necesitan. Si usted hace atajos y baja por la ruta equivocada, usted retrasará los problemas. Uno debe poder tomarse el tiempo y conseguir todos los datos necesarios. Podría ser muy malo, si un fármaco, aprobado después de una prueba de corto plazo, se vuelve inseguro durante un tratamiento a largo plazo, y entonces tiene que ser rechazado. Y los padres no pueden aceptar la responsabilidad y sólo firmar una exención. Eso sería poco ético. Y ¿Que ocurre, si su hijo se muere? Tenemos la responsabilidad para los pacientes y para los padres también."

TREAT-NMD, una Red de Excelencia de la Unión Europea.

Serge Braun, director científico de la Asociación de Distrofia Muscular Francesa AFM, *Association Française contre les Myopathies*, primero describió esta muy activa organización nacional de pacientes. Fue fundada en 1958, tiene ahora 75 centros clínicos en Francia y es conocida en todo el país por su Téléthon, un programa de televisión de 30 horas el primer fin de semana de diciembre de cada año. Después de que fue empezado en 1987 con la ayuda de *Jerry Lewis* y basado en el Teletón de EUA, este evento de recaudación de fondos provee en promedio por si solo 140 millones de dólares todos los años. El presupuesto entero de la asociación para el 2006 era de 170 millones de dólares, de los que 88 millones fueron usados para finan-

ciar cerca de 400 proyectos de investigación para la terapia de enfermedades de neuromusculares, entre ellos cerca de 100 proyectos están fuera de Francia incluyendo los Estados Unidos.

El Dr. *Braun* luego explicó cómo la AFM y otras organizaciones de pacientes en Europa, se dieron cuenta que las actividades de investigación para terapias, diagnósticos, y atención del paciente para enfermedades neuromusculares en los diferentes países de la Unión Europea estaban pobremente coordinados, una situación inaceptable en vista de las severas consecuencias de estas enfermedades raras. El miembro de la AFM *Françoise Salama*, que tiene un hijo con Duchenne, junto con varios de sus colegas

Europeos presionó a la Comisión Europea para que suministrara la financiación para la integración de actividades en esta área, y esto fue muy exitoso, con un llamado para redes de excelencia en esta área que aparecen en el 2004. El objetivo de tales redes es "reforzar la excelencia científica y tecnológica en un tema de investigación particular por la integración a nivel Europeo de la masa crítica de recursos y pericia necesitada al crear a una integración progresiva y durable de las capacidades de investigación de las partes de la red". Luego de un largo proceso de aplicación, este programa, TREAT-NMD, fue aprobado en diciembre del 2006 con un presupuesto de 10 millones de euros – cerca de 15 millones dólares de EUA - durante 5 años, y el trabajo activo fue empezado en enero del 2007.

TREAT-NMD es ahora *una red de excelencia que comparte el conocimiento experto de los miembros académicos básicos y clínicos e industriales con el fin de desarrollar herramientas tecnológicas y metodológicas en vista de acelerar la elaboración de nuevas terapias para enfermedades neuromusculares.*

TREAT-NMD tiene sus oficinas en la Universidad de Newcastle en Inglaterra, es coordinado por *Kate Bushby* y *Volker Straub*, y tiene un Consejo Asesor de Ciencia y Tecnología con *Marianne de Visser* de la Universidad de Ámsterdam en la dirección, y un sitio web: www.treat-nmd.eu, que, entre una gran cantidad de información, contiene un boletín frecuentemente publicado que es enviado a más de 1,000 personas cuyas direcciones están en su lista de distribución.

Esta introducción del Dr. Braun fue seguida por la presentación de *Kate Bushby* con el título de *TREAT-NMD en acción, los primeros seis meses*. Los objetivos más importantes de TREAT-NMD son: (1) La cooperación internacional adicional enfocada en el desarrollo de terapias para Duchenne y distrofias musculares congénitas así como para atrofia muscular espinal; (2) promover múltiples acercamientos terapéuticos sugiriendo y coordinando pruebas clínicas; (3) encontrar a pacientes para participar en las pruebas por la creación de un banco de datos internacional; (4) crear estándares para las pruebas clínicas que permitan que sus resultados sean comparado con otras pruebas similares; (5) desarrollar estándares internacionalmente aceptados para diagnóstico y cuidado, (y 6) distribuir conocimiento actualizado sobre investigación, diagnóstico y cuidado a todos los pacientes, sus familias, y centros de tratamiento sobre todo en aquellas áreas menos privile-

giadas del mundo.

TREAT-NMD tiene 21 miembros activos – universidades, grupos de pacientes, agencias gubernamentales, compañías biotecnológicas, y personas individuales – por toda Europa, que son principalmente responsables de repartir los objetivos de la red. Trabajan juntos con grupos de todas partes del mundo, y nuevas colaboraciones en esta área importante son bienvenidos.

La Dra. Bushby luego mencionó cuatro ejemplos de actividades actuales y futuras:

(1) Hacer un registro internacional de pacientes en acuerdo con registros existentes, con el propósito de que haya una configuración estandarizada mínima de la información clínica y diagnóstica de pacientes para ser usada en el desarrollo y futuro manejo de un banco de datos supranacional. Esto permitiría identificar a pacientes apropiados para las pruebas clínicas, la recolección, observación y comparación de los datos de investigación clínica a largo plazo de pacientes que pasarían por los diferentes tratamientos, y para la información de familias individuales sobre los avances de investigación y cuidado.

(2) Establecer los estándares más avanzados de cuidado en cooperación con el Centro de Control y Prevención de Enfermedad, el CDC, en Atlanta en los EUA. El trabajo en este proyecto ya ha comenzado, cubrirá todos los aspectos del manejo médico y social de los pacientes. Maneras tendrán que ser encontradas para asegurarse de que las recomendaciones sean seguidas en todos los centros de salud y las organizaciones de pacientes asociadas será una manera clave de hacer esto ocurra.

(3) Estandarizar las medidas de resultados clínicos para las pruebas, es decir los cambios tienen que ser medidos de manera clínica. Dos seminarios ya fueron hechos en mayo y junio del 2007.

(4) Un Centro de Coordinación de Pruebas Clínicas, CTCC, ha sido establecido en la Universidad de Friburgo en Alemania, que desarrollará las recomendaciones para el diseño de pruebas clínicas para enfermedades raras en cooperación con compañías farmacéuticas y las autoridades reguladoras.

Al final de su presentación, la Dra. Bushby dijo que TREAT-NMD era una gran oportunidad para la comunidad Duchenne entera de ir hacia adelante, y que *TREAT-NMD ya está en acción*. La oficina en Newcastle puede ser contactada por correo electrónico: info@treat-nmd.eu y siempre es alegre de recibir preguntas y comentarios.

¿Por qué necesitamos saber la mutación exacta?

Robert Weiss de la Universidad de Utah en Salt Lake City respondió a esta pregunta, como lo hizo *Kevin Flanigan* en la reunión del 2006 en Cincinnati. El siguiente texto usa el resumen de la presentación del Dr. Flanigan como la base, con algo de nueva información añadida.

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. Si la mutación muestra que el marco de lectura del ARNm de la distrofina esta cambiado, entonces, es mucho más probable sea distrofia muscular Duchenne,

mientras que una mutación que conserve el marco de lectura intacto, pronostica en la mayoría de los casos distrofia muscular de Becker. Saber la mutación exacta permite un mejor asesoramiento genético de la familia del chico y sus parientes maternos, entre quienes las portadoras de Duchenne pueden ser detectadas. Finalmente, algunas nuevas terapias potenciales, como la omisión de exón, y la lectura a través del codón de parada con PTC124, requieren conocimientos detallados de la mutación en el gen de la distrofina del paciente, la *mutación específica*.

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 esta y otras pruebas genéticas, solo 5 a 10 ml de una EDTA completa de sangre del paciente es necesaria para aislar el material genético de los glóbulos blancos. El paciente no tiene que venir al laboratorio, la muestra de sangre puede ser enviada por el correo.

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 muy fuerte. 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 positivos, que indican una deleción de un solo exón cuando no hay nada, podría ocurrir en el raro evento de un polimorfismo o mutación en el sitio donde las sondas 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 la deleción de un solo exón por otro método es requerida.

Si ninguna mutación puede ser encontrada con la prueba de MLPA, el paciente podría tener 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 empalme, 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 genético automáticos para detectar mutaciones

puntuales y otras.

El método más nuevo de análisis genéticos muy eficaces y exactos del gen de la distrofina está disponible usando nuevas plataformas basadas en microarray, que se refiere a tecnología de chip genético. En efecto, como es descrito en el próximo capítulo sobre el programa CETT, tal prueba de chip genético para grandes deleciones y duplicaciones, y mutaciones puntuales pequeñas, está ahora disponible en la Universidad Emory en Atlanta. Es planeado que los métodos basados en chip genético sean ofrecidos por una red internacional de laboratorios clínicos,

Con estos métodos de prueba, MLPA, SCAIP, y pruebas de chip genético, 95-98 % de todas las mutaciones pueden ser encontradas. Sin embargo, el 2 a 5 % restante pueden no encontrarse. Si el paciente tiene síntomas definitivos de Duchenne o de Becker, pero ninguna mutación detectable en muestras de sangre, entonces una biopsia de músculo se vuelve necesaria, para que la presencia o ausencia de la proteína distrofina misma en las fibras musculares pueda ser determinada por métodos de detección de proteína. La técnica *western blot* tiene la ventaja de dar una indicación de la cantidad y el tamaño de la proteína distrofina, pero la técnica de *inmunofluorescencia* es usada principalmente porque la distrofina, cuando está presente, puede hacerse claramente visible bajo el microscopio. Las membranas celulares de las fibras musculares en una muestra de biopsia muscular de un paciente con Duchenne se quedan oscuras, mientras aquellas de una persona con músculos sanos muestran líneas brillantes ininterrumpidas de luz fluorescente, y en aquellas otras de un paciente con Becker solo algunos segmentos de luz fluorescente brillantes son visibles.

El Dr. *Johan den Dunnen* de Centro Médico de la Universidad de Leiden envió un mensaje diciendo que los datos de ADN no son suficientes para concluir que ocurre realmente a nivel del ARNm y por lo tanto, no es posible decidir qué AON usar para una terapia de omisión de exón. Datos publicados muestran que en 5 a 10 % de los pacientes con Duchenne con deleciones o duplicaciones las consecuencias no son las esperadas. Por lo tanto, antes de que tal tratamiento sea empezado, el ARNm debe ser aislado de una biopsia muscular o de piel, y secuenciado alrededor de la deleción o los puntos de duplicación para confirmar lo que ha sido pronosticado por las pruebas de ADN. Esta revisión ha sido realizada para todos los chicos con Duchenne que participaron en la primera prueba clínica de omisión de exón en Holanda. Además, células cultivadas fueron usadas para probar que el efecto del tratamiento de omisión de exón era como el deseado, p.e., que el último nucleótido antes del exón o exones delecionados estaba conectado con el primer nucleótido después de la deleción sin un cambio del marco de lectura. El ARN mensajero también puede ser usado para encontrar mutaciones raras que causan la incorporación de fragmentos intrónicos a los exones empalmados en el ARNm de la distrofina.

Una nueva era de examinación genética para distrofia muscular Duchenne ha comenzado.

CETT (Programa de Colaboración, Educación y Traducción de Prueba). Este programa fue presentado

por *Madhuri Hegde* de la Escuela de Medicina de la Universidad Emory en Atlanta, Georgia. Este proyecto es

un desarrollo conjunto soportado por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades en Atlanta, CDC, la Oficina de Trastornos Raros de los Institutos Nacionales de Salud en Bethesda, la Universidad Emory en Atlanta, la Sociedad Americana de Genética Humana, el Colegio Americano de Genética Médica, la Sociedad para Trastornos Metabólicos Heredados, y la Alianza Genética. Fue empezado en el 2006 con el objetivo de cambiar la traducción deficiente de la investigación genética de pruebas a laboratorios clínicos para enfermedades raras (1) al apoyar la colaboración clínica y de investigación para el desarrollo de pruebas genéticas de alta calidad, (2) apoyando recolección de datos genéticos y clínicos en bases de datos públicas para promover investigación terapéutica, (3) desarrollando pautas para pruebas de laboratorio, y (4) proveyendo y distribuyendo material de información actualizado para pacientes, sus familias y otros cuidadores médicos. Los detalles del CETT pueden ser vistos en la internet en www.cettprogram.org.

La distrofia muscular Duchenne fue uno de los primeros grupos en usar el modelo del programa de CETT para desarrollar una colaboración entre los intereses clínicos, de investigación, y representación del paciente. A través de los esfuerzos de muchos representantes como *Jerry Lewis* de la MDA en el pasado, y de *Patricia Furlong* del PPMD actualmente, los problemas y necesidades de los cerca de 10,000 chicos con Duchenne en los Estados Unidos no solo son conocidos por el público en general, si no también entre políticos en Washington y capitales estatales. La colaboración del CETT-PPMD ya ha llegado a su primer objetivo importante, nombrado validación e implementación de la prueba basada en microarray, usando *chips genéticos*, para distrofia muscular Duchenne en la Universidad Emory para detectar mutaciones en el gen de la distrofina. La prueba basada en microarray es sumamente sensible y de tiempo rápido. La "validación" en este contexto significa que los resultados del método de chip genético sobre muchas muestras de pacientes con Duchenne y portadoras con diferentes mutaciones, han sido comparados con los resultados sobre las mismas muestras obtenidos por otros métodos establecidos. En todos los casos, las mismas mutaciones fueron encontradas.

La nueva prueba genética con chip-genético. En la segunda parte de su presentación, el Dr. *Hedge* describió esta nueva prueba la cual es un procedimiento de 2 pasos. El paso 1 usa una matriz (o array) de Hibridación Comparativa de Genoma (CGH) de la secuencia genómica entera de la distrofina de 2.2 millones de pares de bases. En este paso, las deleciones y duplicaciones de los exones son identificadas. El paso 2 se vuelve necesario, cuando ningunas deleciones o duplicaciones son encontradas en el paso 1.

Paso 1: Estos chips genéticos son impresos por la compañía Roche-NimbleGen Systems Inc. en Madison, Wisconsin. En una plancha de vidrio con dimensiones de 1 x 3 pulgadas (25 x 76 mm), al menos 400,000 oligonucleótidos de ADN, conocidos como *oligos de probeta*, son sintetizados por una técnica de propiedad llamada Matriz Sintetizada Sin-Plantilla (Maskless Array Synthesizer) y unidos en un patrón regular, conocido como *matriz (array)*. Los oligos son de cerca de 45 a 60 bases de largo, y cubren, en duplicado, los 2.2 millones de pares de bases del gen de la distrofina. Los oligos son sintetizados con la

secuencia deseada del gen de la distrofina automáticamente en la plancha. La muestra que contiene el ADN de un paciente, es cortada primero en piezas pequeñas de cerca del mismo tamaño de los oligos de probeta y marcadas con un colorante fluorescente. Cuando la muestra es esparcida sobre la matriz, el ADN del paciente puede unirse específicamente, hibridarse, por el emparejamiento Watson-Crick de bases, con los oligos de probeta complementarios en la matriz en la plancha. Esos oligos de probeta que se han combinado con sus parejas de la muestra del paciente, y pueden entonces ser vistos y grabados por la luz fluorescente producida por el colorante sobre la muestra del paciente, después de la iluminación con luz ultravioleta. Si el gen del paciente tuviera una deleción, los oligos de probeta correspondientes se quedan solos, sin hibridarse, y no producen luz por lo tanto. Como la secuencia y la posición de los oligos de probeta sin hibridar es identificada, las fronteras de la deleción, o puntos de mutación, en el gen pueden ser determinados con muy alta precisión. Cuando algunos exones son duplicados, el doble de varios oligos de probeta son emparejados con sus parejas, por lo que la intensidad de la fluorescencia producida por ellos es dos veces más fuerte.

Los resultados de este método son cuantitativos, por lo tanto las deleciones y duplicaciones pueden ser determinadas no sólo en el gen de la distrofina de niños con Duchenne, sino también en cualquiera de los dos genes de la distrofina de mujeres. Por lo tanto, la prueba de chip-genético puede ayudar a determinar si una mujer es una portadora de Duchenne o no, que es muy importante para asesoramiento genético exacto. Como este método detecta las mutaciones a nivel del gen mismo, tiene la ventaja de encontrar los *puntos de mutación aproximados* de las deleciones y las duplicaciones, p.e., sus inicios y finales, que están mayormente dentro de los intrones. Esto podría ser un descubrimiento importante para investigar las razones de los diferentes síntomas clínicos de pacientes con la misma mutación. Esto vuelve más y más obvio que los intrones no son "basura" genética, si no que contienen secuencias reguladoras que, entre otros efectos, pueden influir en el desarrollo de ciertas señales clínicas. Si son perturbados por las deleciones, es posible que esto pueda resultar en diferencias en los síntomas clínicos.

Paso 2: Si ningunas deleciones o duplicaciones son encontradas en el paso 1, el paso 2 debe ser efectuado, que puede identificar mutaciones puntuales, como deleciones pequeñas e inserciones. Para esta segunda parte del análisis, una *Matriz de Resecuenciación* de 47,000 pares de bases es usada para buscar mutaciones puntuales (1) en los 14,000 pares de bases enteros de todos los exones de la distrofina, (2) en los 8 promotores del gen de la distrofina, (3) en las secuencias de intrón de 100 pares de bases de largo en las regiones fronterizas de todos los 79 exones, y (4) en la secuencia de la región alrededor de cinco mutaciones raras conocidas dentro de los intrones. Este paso de resecuenciación verifica en cada paso cada posición de nucleótidos en las regiones objetivo del gen de la distrofina, tanto si la base normal está presente, como si ha sido reemplazada por una de las tres otras bases posibles, o si una base ha sido delecionada o una base adicional esta insertada.

Las mutaciones puntuales, pequeñas deleciones e inserciones, pueden causar (1) el cambio del marco de lectura

en el ARNm, que conduce a la distrofia Duchenne (mutaciones de cambio del marco de lectura), (2) el cambio de un aminoácido por otro en la proteína distrofina que puede o no causar distrofia Duchenne o Becker (mutaciones de pérdida de sentido), (3) la aparición de un codón de parada prematuro donde la síntesis de distrofina es interrumpida (como mutaciones sin sentido), (4) la interferencia con el mecanismo de empalme que puede conducir a la eliminación de exones en el ARNm (mutaciones del sitio de empalme), o (5) el daño en un promotor, que puede parar completamente la síntesis de distrofina y también conducir a distrofia Duchenne.

Raras excepciones. Como con todas las pruebas genéticas, en algunos raros casos, esta prueba de chip-genético no puede encontrar una mutación en un chico cuyos síntomas clínicos indican distrofia Duchenne. Las mutaciones podrían estar fuera de las regiones evaluadas. Para abordar esta necesidad, un chip genético con 2.1 millones de oligos de probeta en una matriz sumamente densa está siendo considerado. También en desarrollo están chips genéticos para pruebas para otras enfermedades neuromusculares, y para el uso de manchas de sangre seca de programas de averiguación a recién nacidos y muestras de saliva. La validación de estos métodos esta en marcha.

Ventajas. En adición a las ventajas de la nueva prueba mencionada, como la alta sensibilidad en encontrar casi todas mutaciones en los genes de la distrofina de pacientes

y portadoras, la ventaja principal es la rapidez de tiempo y la alta sensibilidad y exactitud: lleva solamente cerca de 7 días para el paso 1, la detección de deleciones en el 60 % y de duplicaciones en el 5 % de los chicos con Duchenne, y tarda otros 14 días encontrar las mutaciones puntuales en el 35 % remanente de chicos con Duchenne.

La nueva prueba genética ya está disponible. Si usted desea que su hijo o un pariente de sexo femenino se haga pruebas con esta prueba, contáctese con Emory Genetics Laboratory en Atlanta en www.geneticslab.emory.edu, o al tel. 404 778-8500, donde puede hablar del costo de la prueba y la cobertura del seguro. Para casos donde ninguna mutación es detectada, una secuenciación del ADNc usando ARNm como material de empiezo está también disponible. Esta prueba de secuenciación requiere una muestra de biopsia muscular. Muestras de sangre y biopsia de afuera de EUA son aceptadas.

Futuro del CETT. Dentro de los siguientes años, la colaboración del CETT espera organizar una red de laboratorios clínicos, primero en los Estados Unidos, después probablemente también en otros países, donde esta prueba rápida y segura estará disponible para todos los pacientes de Duchenne y sus parientes mujeres. El PPMD con su nueva iniciativa de DuchenneConnect proveerá el acceso a este programa y a todo material de información que esta siendo preparado para la comunidad de Duchenne entera.

DuchenneConnect animará la colaboración y evaluación genética para distrofia muscular Duchenne.

DuchenneConnect es un centro de información innovador que conecta la comunidad Duchenne/Becker entera: pacientes y familias, médicos y profesionales de investigación, y la industria farmacéutica en una única fuente, para el intercambio de datos, ideas y orientación, así como la más reciente información sobre investigación y tratamientos en curso.

Kyle Brown de Innolyst Inc. en San Mateo, California, cuyo objetivo es "conectar la comunidad de investigación no lucrativa", describió el nuevo programa DuchenneConnect del PPMD, su relación con el programa CETT, y la necesidad de registrar toda la información clínica y genética de tantos pacientes con Duchenne y Becker como sea posible. Kyle Brown se dirigió a las familias en la reunión en una manera personal:

"Queremos conocer a los niños enfermos y sus familias. Queremos que usted entre su información en los programas de DuchenneConnect y CETT. Necesitamos los datos clínicos y genéticos de su hijo y deseamos saber dónde vive usted, pero guardaremos estos datos para mantener su privacidad cuando dejemos a investigadores, compañías farmacéuticas y otros registros tener sus datos clínicos con su permiso. La lista de las preguntas a las que tenemos ya que haber respondido es larga: ¿Cómo fue diagnosticado su niño? ¿Cuáles fueron los resultados de sus pruebas genéticas y otras? ¿Cómo está caminando? ¿Tuvo cirugía ortopédica debido a contracturas o escoliosis? ¿Qué clase de ayudas técnicas está usando? ¿Necesita respiración asistida con qué clase de equipo? ¿Él tiene problemas con su corazón? ¿Hay otros miembros en su familia con la misma enfermedad?"

Esta lista no está completa, hay más preguntas en nuestros cuestionarios y aun más serán añadidas en un futuro próximo. Este proceso de transferencia de información será un acontecimiento de preguntas y respuestas ininterrumpido, porque tendremos que estar en contacto con usted por mucho tiempo.

A través de DuchenneConnect, usted podrá ver cómo la enfermedad de su niño se desarrolla en comparación con otros niños. Y le mostraremos dónde están los mejores asesores genéticos en el área donde usted vive. Y para hacer nuestro trabajo más y más valioso para usted necesitamos sus sugerencias e ideas que usted debe traernos en cualquier momento.

Sus datos están de forma anónima, eso es, sin su nombre y dirección o maneras de identificarlo, serán ofrecidos a científicos de Duchenne en cualquier parte que los necesite para su investigación para una terapia. Y trabajaremos con otros registros en el mundo, proveyendo los mismos estándares como nosotros. También las compañías farmacéuticas tendrán acceso a ellos, por ejemplo si necesitan a pacientes con mutaciones específicas para sus ensayos clínicos. Pero si necesitan contactarse con usted, tendrán que preguntarnos si usted había dado su permiso de compartir sus datos. Así que, siempre usted estará en control de lo que ocurra con su información muy personal.

El resultado de todo esto será una gran colaboración no sólo a nivel nacional, sino también aun después a nivel internacional, en el que su niño y su familia entera tendrán el papel más importante."

Por favor regístrese en el nuevo centro de información de internet del PPMD para volverse parte de esta fuerte

red: <http://www.duchenneconnect.org>. Actualmente, el inglés es el único idioma usado en estas páginas de inter-

net, sin embargo, la traducción en otros idiomas estará disponible en un futuro próximo.

¿Que significa "Connect...", el título de la reunión en Filadelfia?

Palabras conclusivas de Patricia Furlong. Significa que cada niño y hombre joven con distrofia muscular Duchenne *importan* con sus familias, sus médicos y cuidadores que se aseguran de que los chicos puedan llevar una vida significativa, y con los investigadores que están haciendo todo para encontrar una terapia para ellos. *Connect* (conexión en español) significa también que todos ellos, la comunidad Duchenne entera, debe mantenerse junta y trabajar en conjunto con el propósito de que la distrofia Duchenne no acorte los más de 70 años acostumbrados o 25,000 días de vida humana, a 20 años o 7,300 días del día del diagnóstico. El intervalo actual faltante de 50 años tiene que volverse más y más pequeño hasta que desaparezca completamente cuando, quizás no sea una cura completa, pero por lo menos sea una terapia eficaz en el futuro cercano. Mis dos hijos murieron cuando tenían 15 y 17 años de edad, no llegaron a los 7,300 días, pero eso fue hace una década. Ahora, en los últimos 10 años, cerca de 1,500 días fueron añadidos, eso es un cuarto de una vida con Duchenne, y los chicos tienen 8,800 días, esto es unos 25 años más o menos. Así que hay progreso y se acelerará con todos los enfoques terapéuticos que son perseguidos activamente en muchos laboratorios y hospitales del mundo.

La lista de estrategias de investigación es larga. Muchas de ellas han sido habladas durante esta reunión, y usted se dará cuenta de eso, con los descubrimientos positivos acumulativos y más y más pruebas clínicas en marcha, estamos avanzando, y hay incluso una esperanza verdadera de que por lo menos una o más de las nuevas técnica, la omisión de exón y supresión de codones de parada prematuros, tiene el potencial de producir terapias significativas en los siguientes años.

A menudo nos preocupamos de que nuestro esperar puede ser infructuoso, pero esta reunión ha mostrado que hay progreso significativo, no sólo avances de investigación sino también de atención médica para los chicos y jóvenes se vuelve mejor y mejor, y, muy importante, que el público y los gobiernos y sus organismos de salud en muchos países se den cuenta de que la DM Duchenne es un problema mundial y juntos debemos *terminar la DM Duchenne*. Cantidades cuantiosas de dinero se están haciendo disponibles, y nuestros propios esfuerzos, que deben ser siempre intensificados, significativamente añaden a esta financiación para hacer los nuevos programas de

investigación posibles, y acelerar las estrategias a mayor plazo y más maduras.

Algunas de las pruebas clínicas con chicos con Duchenne, especialmente las más importantes como aquellas de omisión de exón, lectura a través de codones de parada prematuros, aumento de la utrofina y transferencia génica, están usando técnicas terapéuticas nuevas. Por lo tanto, estas pruebas deben ser realizadas muy cuidadosamente para ser completamente seguras y eficaces. Más pruebas serán necesarias, por lo tanto, los científicos necesitarán su cooperación persistente a pesar de la privación, el viajar, y los muchos, a veces difíciles, procedimientos de evaluación como biopsias repetidas, incluso cuando ninguna función benéfica terapéutica es esperada. La participación de muchos más de sus chicos es esencial.

La distrofia Duchenne no es una enfermedad simple. Probablemente no habrá una sola terapia que ayude a todos los pacientes. Muy probablemente, habrá una combinación de técnicas diferentes para obtener la manera más eficaz de tratarlos. Y nadie será dejado fuera. El PTC124 entrara en un protocolo fase III. El exón 51 es el primero en ser omitido en pruebas, pero otros seguirán, también mutaciones difíciles y menos comunes. Muchas pruebas con enfoques más convencionales podrían mostrar resultados positivos que pueden resultar en tratamientos que no curarían la enfermedad, pero retrasarían su progresión para preservar músculo mientras esperan hasta que una terapia más eficaz y más permanente este lista.

Y por favor comprenda, que muchas futuras terapias serán para una mutación específica. Esto significa que es importante, que la mutación exacta de cada niño con Duchenne debe ser conocida para determinar qué clase de terapia sería la correcta para él. Métodos poderosos existen con los que las mutaciones pueden ser analizadas precisamente y también para las madres y sus parientes mujeres que hacen el consejo genético muy confiable.

Así que, ésta es nuestra posición: Todos los niños y hombres jóvenes con distrofia Duchenne necesitan en todos lados, y se merecen, el acceso a diagnosis exacta y a tiempo, evaluación genética, cuidado de punta, la oportunidad de participar en pruebas clínicas, y acceder a tratamientos prometedores. Con el fin de terminar la DM Duchenne, tenemos que conectarnos, y trabajar juntos para que esos 8,800 días de vida con Duchenne se vuelvan 25,000 y más.

Este informe, escrito principalmente entre Septiembre y Noviembre del 2007, está también disponible en inglés y alemán. Mis informes anteriores en inglés, alemán, y español pueden ser vistos en internet en www.duchenne-investigacion.com. La reunión anual del 2007 del *Parent Project Muscular Dystrophy* británico, PPUK, ahora llamado *ActionDuchenne*, tuvo lugar en Londres del 2 al 4 noviembre del 2007. Actualizaré el actual informe durante los próximos meses con nuevos resultados de investigación presentados en Londres. Aquellos que deseen recibir mis futuros informes por correo electrónico tan pronto como estén listos, deben mandarme por favor su dirección de correo electrónico. **Gunter Scheuerbrandt**, PhD., Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Alemania. E-mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Traducción al español por: Ricardo Rojas Caballero, Playa Rosarito 319 Fracc. Playa Sur CP 82040 Mazatlán, Sinaloa, México E-mail: distrofiamuscular@yahoo.com.mx Internet: <http://www.distrofia-mexico.org>