

Omisión de Exón y Lectura a través de los codones de Parada: Dos acercamientos de investigación para una terapia para distrofia muscular Duchenne.

**Reporte de la Conferencia de Mesa Redonda realizada en Mónaco el 17 y 18 de Enero del 2004
junto a una entrevista sobre cuando la omisión de exón estará lista para los afectados.**

El Parent Project de Francia y la Asociación Monaguesca Contra las Miopatías invitaron a 35 científicos y representantes de grupos de padres de afectados de DM Duchenne para esta mesa redonda en Mónaco. Dos acercamientos científicos hacia una terapia para distrofia muscular Duchenne fueron discutidos. El siguiente texto no es un reporte científico para expertos que fue escrito para las familias de chicos con DM Duchenne en Enero y Febrero

del 2004. Algunos de estos experimentos son descritos en gran detalle, debido a que este reporte debe ser hecho de forma clara a pesar de la increíble complejidad de la estructura genética humano, nuevas técnicas experimentales y la habilidad de los científicos hace posible manipular la información del muy largo gen de la distrofina sin interferir con los otros 25 000 a 30 000 genes de cada célula de un chico con DM Duchenne.

Introducción

**Algunos hechos y bases científicas son explicados
Y como las mutaciones causan distrofia Duchenne y Becker.**

Los **genes** son las unidades funcionales del material genético o **ADN (ácido desoxirribonucleico)**. Esta estructura luce similar a dos escaleras de caracol entrelazadas, la *doble hélice*. Los escalones de estas escaleras consisten en cuatro diferentes pequeñas moléculas, las **bases**: *adenina, guanina, timina, y citosina* (abreviando A, G, T, C). Por razones de espacio, cada nivel de escalones puede solo contener dos tipos de combinaciones de bases, en **pares de bases** A-T y G-C. Por lo que, la **secuencia** de **bases** en una de las dos cadenas de ADN es *complementaria* a la secuencia de la otra.

La *letra* de la información genética es el **nucleótido** o el **par base**. Cada una de las cerca de 100 billones (10^{12}) de células del cuerpo humano contienen en su núcleo 46 **cromosomas** que contienen el material genético formado por seis billones de pares de bases, agrupados en cerca de 25 000 a 30 000 genes.

La mayoría de los genes contienen las instrucciones para la construcción de las **proteínas**. En el núcleo celular, las instrucciones genéticas son copiadas o **transcritas**, de los genes en otra sustancia genética, el **ácido nucleico pre-mensajero** o **ARNpre-m**. La mayoría de los genes consisten de regiones activas, los **exones**, y regiones inactivas, los mucho más largos **intrones**. Después de la transcripción, los intrones son removidos del ARN pre-mensajero, y los exones transcritos son unidos o **empalmados** unos con otros en el **ARN mensajero**, **ARNm**, el cual entonces se mueve hacia los **ribosomas**, estructuras que sintetizan proteínas en el exterior del núcleo. Los ácidos ribonucleicos, **ARN's**, usan la base *uracilo* (abreviado como U) en vez de la muy similar base T del ADN.

En el ARN mensajero, tres bases consecutivas se conocen como **codón** o *tripletas*, que significa o es igual a un aminoácido de acuerdo al **código genético**. Tres de los 64 codones diferentes posibles, UAA, UAG, y UGA, son **codones de parada**, donde la síntesis de proteína es terminada. Es importante saber que entre los codones no existen espacios. En los ribosomas, las instrucciones genéticas del ARN mensajero son usadas para la construcción de proteínas con 20 diferentes clases de **aminoácidos**.

La distrofia muscular Duchenne es causada por una **mutación** o defecto en el **gen de la distrofina**. Con 2,6

millones de pares de bases, es el más largo gen humano. Solo 13 973 pares de bases a través de 79 exones del gen contienen la secuencia codificada activa, las instrucciones para la síntesis de **distrofina**, una larga proteína con forma de varilla que consiste de 3 685 aminoácidos. La distrofina es necesaria para la estabilidad mecánica de las células musculares. Esta se localiza en el interior de la membrana de las células musculares la cual se ancla con varias otras proteínas, el **complejo distrófico-glicoproteínico**.

Hay tres tipos de **mutaciones** o defectos del gen de la distrofina: las **deleciones**, cuando uno o mas exones del gen están faltantes, **duplicaciones**, cuando partes del gen se encuentran repetidas, y las **mutaciones puntuales**, cuando un par de bases esta cambiado, eliminado u agregado. Ya que el mecanismo de lectura en el ribosoma siempre lee las tres letras de los codones una tras otra sin interrupción, el **marco de lectura** no es perturbado, pero si la mutación elimina o agrega codones enteros de tres bases cada uno, en este caso, el marco de lectura es **mantenido** y la distrofina solo será mas larga o corta. Si este cambio no afecta estructuras esenciales de la distrofina, como la *parte central*, esta puede todavía ser parcialmente funcional. Es entonces que una forma más benigna de distrofia se desarrollaría, siendo esta **distrofia muscular Becker**.

Sin embargo, si la mutación crea un cambio en el marco de lectura por una o dos bases, el orden del marco de lectura se **pierde**. Entonces un número de aminoácidos incorrectos son incorporados a la proteína en el lugar donde empieza la mutación hasta que finalmente un nuevo y **prematureo codón de parada** es alcanzado. La distrofina incompleta resultante no puede realizar su función normal, por lo que desaparece y se desarrolla **distrofia muscular Duchenne**.

El animal usualmente usado para la investigación de distrofia es el **ratón mdx**. El cual tiene una mutación puntual en el exón 23 de su gen de la distrofina, donde esta cambiado un codón CAA, que significa el aminoácido ácido glutámico, por un codón TAA, el cual es un codón de parada prematuro. Por lo que este ratón no tiene distrofina en sus músculos, aunque su distrofia es mucho menos

severa que la de un chico con DM Duchenne. Por consiguiente, los resultados experimentales obtenidos con estos ratones no pueden siempre ser esperados de la misma forma en humanos. *¡Un niño no es un ratón grande!*

Los **sitios de empalme** son secuencias específicas en los bordes de los exones e intrones, los cuales son esenciales para una correcta remoción de las secuencias no codificadas de los intrones del ARNpre-m. El empalme por sí mismo es llevado a cabo por los **splicesomas**, un grupo de pequeños ARN's y proteínas de los que sus detalles y papel todavía no es completamente comprendido.

Los **oligonucleótidos** (oligo significa pocos) son cortos ácidos nucleicos compuestos por 15 a 30 nucleótidos. Estos pueden ser oligorribonucleótidos o oligodesoxiribonucleótidos, dependiendo de cual estructura tienen, si ARN o ADN respectivamente. Para la omisión de exón ellos se unen a secuencias genéticas específicas del ARNpre-m de acuerdo a la regla de emparejamiento específico de bases característico de todos los ácidos nucleicos: A se une con T o con U, y G con C, y viceversa. Para la correcta unión, su secuencia debe estar en "**antisentido**", lo que significa que la secuencia debe en orden reverso en relación a la secuencia que va ser el objetivo. La razón es que los ácidos nucleicos tienen polaridad, una dirección llamada 5' a la terminación 3'. Un ejemplo de esto al final del reporte explica esta relación.

No hay todavía una cura para distrofia muscular Duchenne. *Jean-Claude Kaplan* (Paris) dice en su texto introductorio rememora una conferencia en Versalles, Francia, sobre la investigación de DM Duchenne en 1987 cuando todo mundo estaba excitado un año después de la detección del gen cuya mutación causa la distrofia Duchenne y su producto la distrofina, creyéndose una terapia al parecer estaba cerca. Ahora, 17 años después, todavía no

hay una cura. Para los investigadores quienes ahora ven los severos problemas científicos, ven esa conferencia como si hubiera sido ayer. Pero para los padres es una historia algo diferente, ¡17 años son toda una generación de chicos con DM Duchenne!

Pero la investigación ha abierto varias vías, no obstante la distrofia Duchenne no es una enfermedad fácil de ser tratada por manipulación génica. Varias técnicas ahora existen para transportar las partes activas de un gen hacia las células musculares o sus versiones cortas, para reparar sus mutaciones, para ignorar las seniles de parada que aparecen en lugares equivocados, y tratar de influenciar el progreso de la enfermedad con sustancias parecidas a drogas. Pero, con la excepción de los esteroides, ninguna otra sustancia ha ido aplicada en chicos, aunque si en células musculares aisladas en el laboratorio o en animales. Sin embargo, pruebas clínicas están empezando a ser planeadas para un futuro cercano, principalmente con los acercamientos más promisorios (al presente), la omisión de exón y leer a través de los codones de parada.

A pesar de todo, cuando estas hayan sido totalmente desarrolladas, tales dos técnicas solo podrían ser capaces de ayudar aquellos chicos con DM Duchenne cuya mutación exacta es bien conocida. Y deberá también ser conocidos cuales podrían ser los síntomas de la presencia de una distrofina acortada resultante de la omisión de exón. En varios casos, esto puede ser predicho, pero hay algunas excepciones de la reglas del marco de lectura. Por lo que, un gran banco de datos con detallada información genética y clínica de pacientes individuales será importante. Tales bancos de datos ya existen o están siendo establecidos en el hospital Cochin en Paris, en la universidad de Utah en Salt Lake City y en Leiden en Holanda. Su infamación esta disponible de forma gratuita para todos los investigadores.

La omisión de exón puede cambiar una mutación Duchenne en una Becker.

Cortos oligonucleótidos artificiales pueden ser inyectados en células musculares humanas y de ratón en cultivos y en ratones vivos para inducir la síntesis de distrofina acortada.

Estos oligonucleótidos pueden ser también ser creados en las células musculares las cuales recibieron sus genes. Pruebas clínicas con chicos con DM Duchenne están siendo preparadas, y una de ellas se realiza actualmente en Japón.

La técnica de *omisión de exón* trata de cambiar una mutación Duchenne en una Becker. Si la deleción o la mutación puntual perturban el marco de lectura, causando así distrofia Duchenne, el marco de lectura puede ser *restaurado* con la remoción artificial de uno o más exones directamente antes o después de la deleción o mutación puntual del ARNm.

Los exones pueden ser eliminados del ARNm con *oligonucleótidos en antisentido*. Estos son cortas estructuras de ARN que consisten de cerca de 20 nucleótidos cuya secuencia esta construida de tal manera que se una por sí misma solo donde corresponde o es complementaria a la secuencia dentro o en los bordes del exón que será removido y *en ninguna parte mas*. Estos oligonucleótidos así interfieren con la maquinaria de empalme de forma que los exones objetivo no sean más incluidos en el ARNm, estos serán *omitidos*.

El gen por sí mismo con su mutación no es alterado por

la *omisión de exón*, pero su ARNm no contiene mas la información del exón omitido. Ya que el ARNm es mas corto que lo normal, la proteína distrofina estará también acortada, conteniendo esta menos aminoácidos. Si los aminoácidos son parte de la región central de la distrofina, estos a menudo no son esenciales, y el resultado será una proteína acortada que puede realizar su rol estabilizando la membrana de la célula muscular. El resultado podría ser un cambio de síntomas severos de DM Duchenne a síntomas mucho mas leves de distrofia muscular Becker.

Esta técnica influenciara la conversión de ARNpre-m en ARN. Ya que el gen mismo *no será* alterado, el efecto de tratamiento de antisentido no será permanente, así que tendría que ser repetido a intervalos todavía a ser determinados.

Como la secuencia de pares de bases del gen entero de la distrofina que incluye los bordes de todos los 79 exones es conocida en detalle, se puede predecir cual exón o exo-

nes deben ser eliminados u *omitidos* para restaurar el marco de lectura de un paciente individual. No obstante, no hay certeza de que tanto los resultados experimentales ahora obtenidos en cultivos de células o ratones, serán los mismos en chicos con DM Duchenne, y que tanto la distrofina acortada realmente conducirá a síntomas de distrofia muscular Becker. Hasta este momento, tales predicciones son puramente teóricas.

El proceso de empalme puede ser cambiado en experimentos de laboratorio. George Dickson (Londres) discute los diferentes métodos para inducir la omisión de exón, p.e., interfiriendo con los splicesomas en uno o ambos extremos de los exones o bloqueando secuencias enteras dentro de las secuencias del exón. Los oligonucleótidos en antisentido – en la mayoría de los casos estructuras de ARN – son molécula inestables. Para incrementar su tiempo de vida, estos han tenido que ser modificados. Agregando un átomo de carbono y tres de hidrogeno a las unidades de azúcar del ARN y también a las bases de citosina, así como cambiando un átomo de oxígeno por uno de azufre en la parte de la estructura de ácido fosforico, se logra estabilizarlos. Inclusive las unidades enteras de ribosa pueden ser cambiadas por aminoácidos, y los péptido de ácido nucleico, PNA en sus siglas en ingles, son también algo activos.

Los experimentos son realizados mayormente en *cultivos de células musculares* de ratones mdx los que tienen una mutación puntual en el exón 23, causando un codón de parada prematuro, que puede ser evitado al eliminar este exón entero del ARNm por omisión durante el proceso de empalme. Ya que los extremos de tal exón están entre los codones y no dentro de ellos, su pérdida no perturba el marco de lectura, pero hace a la distrofina un poco mas corta.

Para encontrar los oligonucleótidos más efectivos, sus secuencias de bases fueron cambiadas para que sus sitios de unión puedan ser movidos a través de los bordes exon-intrón. Oligonucleótidos de diferente extensión fueron también usados. El tamaño óptimo al parecer es de 18 nucleótidos y el mejor sitio de unión se localiza en el extremo 5' del exón. Mas del 60% del ARNm de la distrofina tenía faltante la secuencia del exón 23. En estos experimentos de laboratorio, mostró que este procedimiento conduce a la producción de nueva distrofina y la localización correcta bajo la membrana celular.

En esta discusión, se dijo que hay dos maneras de realizar la omisión de exón: que el blanco del bloqueo con el oligonucleótido sean secuencias internas del exón, o que el blanco sean los extremos del exón. Pero se mantiene sin aclarar cual de estos enfoques podrá ser mas específico, p.e., que conduzca a la omisión de únicamente el exón seleccionado y no otros: las secuencias seleccionadas en los intrones en el borde con los exones los cuales muestran algunas similitudes, o las secuencias seleccionadas enteramente en los exones las cuales pudieran ser las mismas en genes de proteínas similares, como la utrofina, debido a que ellas están conservadas por la evolución.

La omisión de exón en células musculares aisladas de pacientes, mostró que las mutaciones Duchenne de la mayoría de los pacientes pueden ser corregidas: *Judith van Deutekom* (Leiden) dijo que el exón 45 del gen de la

distrofina es el exón único deletado mas frecuentemente en chicos con DM Duchenne, causante de una pérdida del marco de lectura en el ARNm. No obstante, si ambos exones 45 y 46 están faltantes simultáneamente, el marco de lectura no es perturbado. En experimentos de laboratorio con un cultivo de células musculares de un paciente con DM Duchenne con una delección del exón 45, el exón 46 pudo ser omitido. La distrofina producida fue mas corta de lo normal, 108 aminoácidos no esenciales de la parte central de la proteína estaban faltantes. Los pacientes con una delección doble de los exones 45 y 46 se sabe tienen síntomas moderados de distrofia Becker.

La omisión del exón 46 en estas células musculares humanas fue provocada con un *oligonucleótido en antisentido* que se unió por si mismo a una secuencia específica del exón 46. Después de 16 horas, nueva distrofina podía ser detectada en las células, y después de 48 horas esta se había movido a la membrana celular. Con la misma técnica, fue posible omitir otros 19 exones en cultivos de células musculares humanas. No solo delecciones que causan distrofia Duchenne pueden ser corregidas con esta técnica, si no también mutaciones puntuales. En esos casos, sería omitido el exón que contiene la mutación puntual y, en adición, uno de los exones vecinos que tiene los bordes correctos para restaurar el marco de lectura.

Ya que algunas mutaciones que causan la pérdida del marco de lectura no pueden ser corregidas omitiendo un solo exón, mas de un exón puede ser omitido con la aplicación de oligonucleótidos específicos para todos los exones a ser omitidos al mismo tiempo. Esta *omisión doble o múltiple de exón* puede ser aun hecha mas efectiva al conectar los oligonucleótidos químicamente para así prácticamente no ocurra una única omisión de exón cuando mas exones sean omitidos simultáneamente. Y al ser seleccionados los exones 45 y 51 en el punto exacto de la delección del gen al mismo tiempo, todos los exones entre el 45 y 51, p.e los exones 45 y 50, serán también omitidos independientemente de cual de ellos esta deletado o no por la mutación. Así que, con una de esta estructura de dos oligonucleótidos conectados, 17% de todos los chicos con DM Duchenne con delecciones pueden ser tratados.

En cultivos de células humanas, más del 80% de los exones seleccionados pueden ser omitidos de esta forma. Algunos de los oligonucleótidos agregados estarán todavía presentes después de un mes, así que ellos pueden provocar omisiones por largo tiempo. Lo que significa que tales drogas potenciales posiblemente no tendrían que ser aplicadas diariamente pero si en una frecuencia de largo periodo de tiempo.

La omisión única o múltiple de exón podría en teoría ser capaz de cambiar la distrofia Duchenne en Becker en *mas del 90%* de todos los pacientes con delecciones, duplicaciones, y mutaciones puntuales. Menos del 10% de las mutaciones Duchenne no podrían ser tratadas, como aquellas donde están destruidas secciones esenciales en ambos extremos de la distrofina, sus secuencias de promotores, o mutaciones las cuales conducen a una reconfiguración a gran escala del gen de la distrofina.

La omisión de exón funciona también en ratones vivos: *Terry Partridge* (Londres) reporta que la técnica en-Vitro descrita por George Dickson para omitir el exón 23 en el ARNm de la distrofina de ratones mdx, fue también exito-

sa al usarse en animales vivos. El oligoribonucleótido en antisentido protegido fue preparado en el laboratorio de Steve Wilton. Este consistía de 20 nucleótidos cuya secuencia fue complementaria a una de las regiones de los bordes del exón 23. Cerca de 5 microgramos (una millonésima de gramo) de esta estabilizada "droga génica" potencial fueron inyectados en un pequeño músculo de la pierna de ratones de dos semanas de edad, junto al polímero F127 el cual ayuda a los oligonucleótidos a entrar a las células. Después de dos a cuatro semanas, más del 20% de las fibras musculares contenían al menos cantidades normales de la levemente acortada distrofina. Y, junto con otros componentes del complejo distrófico, fue localizada correctamente en la membrana celular. La fuerza muscular fue mejorada significativamente pero no completamente normalizada. Un repetido tratamiento incremento el número de fibras musculares positivas de distrofina sin el desarrollo de un rechazo inmune.

En el más reciente experimento, se probó la vía sistémica, en la cual se podría alcanzar todos los músculos. Dos miligramos de oligonucleótidos fueron inyectados junto al F127 en las venas de ratones mdx. Los resultados preliminares mostraron que pequeñas cantidades de nueva distrofina pudieron ser detectadas en diferentes niveles en varios músculos. No hay todavía una explicación para esta variación.

¿Cual es el mejor oligonucleótido? Steve Wilton (Perth) reporto experimentos con el objetivo de encontrar la mejor modificación de la estructura básica de los oligonucleótidos en antisentido que cumplan un número de requerimientos: cruzar las membranas de las células musculares y su núcleo fácilmente; inducir la omisión de un exón específico en alto número con concentraciones bajas; que sea suficientemente estable, resistiendo la degradación, y sin efectos adversos que podrían ser nocivos.

Las siguientes modificaciones de los oligonucleótidos son posibles, varias han tenido que ser realizadas y sus efectos analizados en experimentos con cultivos de células: (a) cambiar uno de los átomos de oxígeno no enlazado de la estructura de ácido fosforico por un átomo de azufre; (b) proteger cada unidad de ribosa con un grupo metilico de un átomo de carbono y tres de hidrogeno; (c) agregar grupos metilicos a algunas de las bases; (d) agregar colesterol, cuatro anillos de carbono conectados con un filamento, en los extremos de las estructuras del oligonucleótidos; (e) retener un grupo voluminoso tritilico protector, tres anillos de benceno conectados por un átomo de carbón, en el extremo 5'; (f) examinar la química de grupos morfolinicos y mejorar su entrega por medio de agregar una "correa" de otro oligonucleótido para permitir una formación "lipoplex".

Uno de los oligonucleótidos mejor realizados fue usado en estudios con ratones en el laboratorio de Terry Partridge. Su objetivo era la zona de empalme en el borde entre el exón 23 y el intrón 23 del ARNpre-m del ratón. Este oligonucleótido consta de 20 nucleótidos de extensión y tiene la secuencia GGCCAAACCUCGGCUUACCU. Todos los grupos 2'OH de las unidades de ribosa fueron protegidas con grupos metilicos y en los grupos de fosfato se cambio un átomo de oxígeno por uno de azufre en cada posición de la estructura.

Preparación de una aplicación clínica de la omisión de exón: Masafumi Matsuo (Kobe) reporto sus experimentos en los cuales principalmente se realizaron para corregir la delección del exón 20 en un paciente con DM Duchenne. El marco de lectura perturbado después de esta delección puede ser corregido al omitir el exón 19. Los investigadores experimentaron con una serie de *oligonucleótidos en antisentido*, cuya secuencia les permitía unirse por sí mismos para bloquear así la secuencia del reforzador para la inclusión normal de este exón en el ARNm. Estos oligonucleótidos están constituidos por cadenas cortas de estructura de ADN. Ellos fueron estabilizados sustituyendo un átomo de azufre por uno de oxígeno en sus grupos de fosfato. Uno de estos oligodesoxiribonucleótidos en antisentido, GCCTGAGCTGATCTGCTGGCATCTTGCAGTT, de 31 nucleótidos de largo, fue especialmente efectivo de la omisión del exón 19 en cultivos de células musculares del paciente con DM Duchenne con delección del exón 20. Después de la omisión, nueva distrofina cerca de 3% más corta que la distrofina humana normal pudo ser detectada en más del 90% de las células. Otros oligonucleótidos fueron construidos, los cuales pudieron efectivamente omitir los exones 41, 44, 45, 46, 51, 53, y 55, reparando las mutaciones Duchenne mas frecuentes en una de las zona de delección mas comunes del gen de la distrofina.

Experimentos de laboratorio adicionales para la preparación de pruebas clínicas con chicos con DM Duchenne: Gert-Jan van Ommen (Leiden) delinee los experimentos a ser realizados antes que oligonucleótidos puedan ser inyectados en niños.

Ratones transgénicos fueron creados por medio de técnicas genéticas los cuales tenían, en adición a su gen normal de distrofina de ratón, el gen entero de distrofina humana en todas sus células musculares. La presencia de este gen humano en estos ratones no distróficos conducía a la producción de distrofina humana normal, la cual se localizo junto a levemente diferente distrofina de ratón normal bajo la membrana celular de los músculos de ratón, anclada correctamente con las proteínas del complejo distrófico. Cuando estos ratones fueron cruzados con ratones mdx distróficos sin distrofina, los animales obtenidos solamente tenían distrofina humana en sus músculos. ¡Y estos *ratones mdx humanizados* no eran mas distróficos!

Oligonucleótidos en antisentido contra la secuencia dentro de los exones 44 y 49 fueron inyectados en los ratones normales con distrofina humana, con el resultado de que solo la distrofina humana tenía aminoácidos faltantes especificados por estos dos exones, mientras que la levemente diferente distrofina de ratón se mantuvo sin cambios. Estos experimentos mostraron que la omisión de exón con esta técnica es muy específica, eliminando solo los exones seleccionados del ARNm de la distrofina, y probablemente no interfiere con los otros cerca de 30 000 genes humanos.

Con nuevos experimentos, los investigadores holandeses trataran de introducir las delecciones encontradas en pacientes con DM Duchenne en el gen humano dentro de los ratones mdx humanizados. Esto les permitirá determinar que tanto los oligonucleótidos preparados para los chicos con DM Duchenne realmente omiten exones en un organismo vivo.

Si estos experimentos preparatorios muestran los resultados esperados, la primera prueba clínica con chicos con DM Duchenne sería seguida, probablemente en la segunda mitad del 2004. Esta tendría que ser aprobada por una agencia reguladora y un comité ético de la universidad. Los oligonucleótidos en antisentido serían manufacturados en pura calidad clínica por la compañía *ProSensa* en Leiden bajo la supervisión de *Gerard Platenburg*. Ellos serían probados químicamente y en ratones. ProSensa organizaría y manejaría la prueba y también sería responsable de todos los consecutivos requerimientos de seguridad. Las inyecciones y el seguimiento clínico de los niños sería realizado en los hospitales universitarios en Groningen, Amsterdam, y Louvain.

Para las pruebas clínicas, los oligonucleótidos tendrían que ser químicamente modificados como los usados en los experimentos en el laboratorio de *Terry Partridge*. Para que así ellos puedan cruzar la membrana más fácilmente y no sean destruidos prematuramente por las enzimas protectoras de la célula.

Cuando el protocolo este completado, será enviado y aceptado por las autoridades reguladoras, unos pocos chicos con DM Duchenne entre 12 y 16 años participarían en esta primera prueba. En la fase I de la prueba, los oligonucleótidos serán inyectados en el músculo tibialis interior. Este pequeño músculo, el cual levanta el pie, y no está muy afectado en chicos con DM Duchenne a esta edad.

La omisión de exón con oligonucleótidos en antisentido podría ser un tipo completamente nuevo de medicación. Estas sustancias no son una droga convencional, aunque estas pueden interferir con la actividad y regulación de un gen humano. En adición a los efectos predichos, estas podrían tener imprevisibles y posibles consecuencias negativas. Las autoridades legales y regulatorias no han sido todavía confrontadas con tales nuevos acercamientos terapéuticos y sus reacciones son impredecibles.

Los exones pueden ser omitidos al alterar la secuencia del gen mismo: En el laboratorio de *Thomas Rando* un enfoque de *corrección génica* fue usado para eliminar el exón 23 del ARNm para restaurar el marco de lectura perturbado. Esta técnica podría cambiar la secuencia del gen mismo, conduciendo así a una alteración permanente lo que podría evitar la necesidad de aplicaciones repetidas de oligonucleótidos.

Para este acercamiento, se intento hacer cambios en un solo par de bases en las secuencias del sitio de empalme del exón 23, usando oligonucleótidos formados de una banda de ARN y otra de ADN, teniendo así una estructura *quimérica*. Sus secuencias no eran exactamente complementarias a la región del sitio de empalme porque contenían un error, un nucleótido que no empareja. Todas las células tienen un grupo de enzimas que reparan los errores de secuencia, los cuales aparecen aunque infrecuentemente cuando el material genético es duplicado durante la división celular. Este mecanismo de reparación podría usar la incorrecta instrucción del oligonucleótido quimérico para introducir el cambio en un par de bases en el sitio de empalme. La introducción deliberada de este "error" podría destruir la normal reacción de empalme en este sitio, con el resultado que este exón en particular sea omitido, no incluyéndose más en el ARNm.

En experimentos de laboratorio con cultivos de células

musculares de ratones mdx, oligonucleótidos quiméricos dirigidos a los sitios de empalme del exón 23 fueron agregados en el medio de cultivo. A pesar que de 2 a 5 % de las células contenían distrofina, la nueva distrofina no era homogénea porque consistía de más de 5 versiones acortadas. Esto significa que esta técnica no solo causaba la remoción del exón 23 del ARNm, si no también la omisión descontrolada de varios exones diferentes alrededor del exón 23.

Estos experimentos probaron que pueden realizarse cambios permanentes de un solo par de bases en el gen de la distrofina. No obstante, este es un campo de investigación en desarrollo, y hay todavía varios problemas a resolver antes que esta técnica quimérica pueda contribuir a la terapia de DM Duchenne.

Los exones pueden ser omitidos con oligonucleótidos producidos en el interior de células musculares de ratón:

Daniel Schümperli (Berna) discutió un nuevo método de omisión de exones, en el cual oligonucleótidos en antisentido no tenían que ser inyectados porque eran sintetizados en el núcleo celular después de transferir sus genes.

Las secuencias de los intrones son cortadas del ARNpre-m en el núcleo celular por los spliceosomas. Estos son estructuras complejas que consisten de varias proteínas y pequeños ARN's, los ARNsn (sn siglas en inglés de pequeño nuclear), los cuales reconocen los bordes exon-intrón y entonces conectan los exones empalmándolos después en forma precisa y sin cambiar el marco de lectura. Algunos de estos muy cortos ARN's son los ARNsn-U7's. Ellos regulan normalmente las reacciones de partición envueltas en el desarrollo de los ARNm's de las histonas, las cuales son proteínas necesarias para el empaquetamiento del ADN en los cromosomas.

Para este nuevo método, los ARNn-U7's fueron genéticamente modificados para que no estén ligados más al ARNpre-m de la histona, si no a los sitios de empalme en la región del exón 23 del ARNpre-m de la distrofina de ratón. Para lograr esto, el gen que codifica el ARNsn-U7's modificado junto con un reforzador de creatina-kinasa fue empacado en plásmidos como vectores y entonces se transfirieron a mioblastos aislados de los ratones. Estas células se desarrollaron en el contenedor de cultivo en células musculares.

En el núcleo de los mioblastos tratados, el gen transferido produjo los ARNn-U7's modificados. Estos realizaron el nuevo reconocimiento de secuencias y se unieron ahora al inicio y final del exón 23 del ARNpre-m de la distrofina en los sitios importantes del proceso de empalme. Por lo que, estos sitios de empalme fueron bloqueados y el exón 23 fue removido junto a los intrones durante el empalmado del ARNpre-m (siendo una omisión de exon). Como la mutación puntual de los ratones-mdx se localiza en el exón 23, la remoción de este exón resulto en que las células musculares de los ratones-mdx, las cuales no podían crear ninguna distrofina, ahora producían una proteína distrofina levemente acortada la cual fue correctamente localizada bajo la membrana celular.

El objetivo de este fundamental experimento fuera de ratones vivos fue probar que las células musculares pueden por si mismas producir los oligonucleótidos de antisentido terapéuticos. Este método podría conducir a la

continua producción de un compuesto terapéutico, lo cual hace innecesaria su aplicación repetidamente. Para una aplicación humana, tendrían que ser usados ARNsn-U7 adaptados para la mutación individual del paciente, cuyo gen debe ser transportado por un vector génico terapéutico al núcleo celular de las fibras musculares. Una alternativa podría ser una transferencia ex-vivo transportando genes ARNsn-U7 a células satélite u otras células madre de músculo y después inyectar estas al flujo sanguíneo o directamente en el músculo. Como los genes de ARNsn-U7 son muy cortos, la transferencia sería probablemente más fácil que transferir la secuencia codificada del ADN de la distrofina entera o acortada, como se ha venido tratando con otros métodos. Por otra parte, ya que la distrofina no es creada fuera de las células musculares, este acercamiento no debe producir respuestas tóxicas adversas o inmunes.

Las células musculares humanas también pueden producir oligonucleótidos para omitir exones: Irene Bozzoni (Roma) extendió los experimentos descritos por Daniel Schümperli a células musculares de pacientes humanos. Para este fin, tres clases de los ARNsn's de los spliceosomas fueron modificados para inducir la omisión del exón 51 en cultivos de células musculares de un paciente con deleciones en los exones del 48 al 50.

En los componentes de los spliceosomas ARNsn-U1, ARNsn-U2, y en las dos preparaciones de los ARNsn-U7's, algunas secuencias de nucleótidos fueron cambiadas por secuencias artificiales especialmente diseñadas con las siguientes consecuencias: el *ARNsn-U1* modificado reconoce y bloquea los sitios de empalme en la región limitante entre el exón 51 y el siguiente intrón. El ARNsn-U2 modificado se une a la secuencia que contiene el punto de bifurcación en el intrón que los spliceosomas necesitan para empalmarlo al exón vecino. Y de esta forma no se une mas a los ARNsn-U6's los cuales podrían activar el empalmamiento en este sitio. En una preparación de *ARNsn-U7's* modificados, estos perdían su actividad normal en la síntesis de las proteínas histonas e interactuaban ahora con el sitio de empalme en el otro extremo del exón 51 bloqueando ahí el mecanismo de empalmado. La otra preparación el *ARNsn-U7*, el cual era una *construcción doble*, contenía dos secuencias en antisentido que van contra los sitios de empalme en ambos extremos del exón 51 y así podía plegar la secuencia del exón a ser omitido en una estrecha banda.

Todos estos ARNsn's modificados necesitan ser producidos continuamente en los núcleos de las células musculares, sus correspondientes genes modificados con sus propios promotores eran transportados hacia las células musculares humanas en cultivo por un retrovirus recombinante preparado como vector génico. Este procedimiento pudo mostrar que, después de la transferencia génica, las células musculares tratadas creaban los diferentes y modificados ARNsn's en niveles bastantes buenos. Pero solo uno de los tres ARNsn's se unió al único sitio de empalme, el ARNsn-U1 modificado, induciendo la omisión intencional del exón 51 y produjo el correcto ARNm de distrofina sin los exones del 48 al 51 en cerca del 10% del nivel normal.

Pero con la construcción doble U7, la cual reacciona con ambos extremos del exón 51 simultáneamente, se produjo *más de 60%* de nuevo ARNm sin los exones del 48 al

51. Y esto condujo a la producción de distrofina acortada, por la falta de 210 aminoácidos que eran codificados por la secuencia de bases de los exones del 48 al 50 delecionados y el exón 51 omitido. En experimentos similares, el exón 45 fue omitido en cultivos de células musculares de un paciente con una deleción en los exones del 46 al 51.

Los investigadores italianos están ahora planeando cooperar con el equipo de investigación de *Giulio Cossu* en Milán, el cual mostró que los *mesoangioblastos* de la pared celular de vasos sanguíneos fetales son células madre. Estos pueden crecer extensivamente en cultivos y, después al ser inyectados en la circulación sanguínea de ratones mdx vivos podían migrar hacia las células musculares distróficas a través de sus membranas celulares dañadas.

Esta ahora planeado modificar mesoangioblastos de ratones mdx para que así estos puedan producir los ARNsn's en antisentido contra los sitios de empalme de los exones. Estos serán entonces re-inyectados en los ratones mdx. Esta técnica podría evitar el uso de virus como vectores génicos, haciendo así a esta técnica un acercamiento terapéutico prometedor para cambiar la distrofia Duchenne de la mayoría de los pacientes en distrofia muscular Becker permanentemente.

Los virus pueden llevar los genes ARNsn hacia las células musculares: Luis Garcia (Paris) presento su trabajo con virus adenoasociados los cuales son usados como vectores para transportar los genes modificados de los ARNsn's modificados de los spliceosomas en el núcleo de las células musculares. Los investigadores musculares ahora tienen gran experiencia con estos pequeños virus debido a que son también ampliamente usados en experimentos de terapia génica con genes de distrofina acortados.

Los mejores pequeños genes de los ARNsn-U7's modificados preparados como lo hizo Irene Bozzoni y Daniel Schümperli para omitir el exón 23 en ratones y el exón 51 en células musculares humanas, serán empacados en estos pequeños virus, y después aplicados en cultivos de células musculares o inyectados en ratones vivos.

Para una terapia futura de DM Duchenne, los agentes terapéuticos tendrán que ser aplicados de forma sistémica vía el flujo sanguíneo. Por consiguiente, en un estudio preliminar, un milímetro de una solución que contiene 100 billones (10^{11}) de partículas virales que llevan el gen para la doble construcción U7, será inyectado durante un minuto en las arterias de ratones mientras las venas correspondientes serán temporalmente bloqueadas por sujetación. Esta inyección bajo presión aumenta el paso de los virus a través de las membranas celulares y conducir a la aparición de nueva distrofina en varios músculos diferentes. En algunas instancias, el 90% de las fibras eran positivas de distrofina. Con la inyección de estos virus recombinantes en el flujo sanguíneo, estos no solo entraran en los músculos, si no prácticamente en todos los otros órganos también. Pero no ocurrirá al parecer la omisión en otros genes, probablemente debido a que las secuencias seleccionadas del ARNsn-U7 solo están presentes en el ARNpre-m de la distrofina y en ninguna otra parte más.

La misma técnica también omitió el exón 51 en las fibras musculares humanas, pero no con la misma eficacia como la encontrada al aplicarse el ARNsn-U7 en dos sitios

donde unir. Los trabajos continúan para encontrar las condiciones óptimas para este procedimiento.

El exón 19 fue omitido en un paciente con DM Duchenne, la primera prueba clínica: En su segunda presentación, *Masafumi Matsuo* (Kobe) reporto la extensión de sus experimentos de laboratorio descritos anteriormente para el tratamiento de un paciente con DM Duchenne con la técnica de omisión de exón.

Para las preparaciones ulteriores a la primera aplicación clínica de esta técnica, un oligonucleótido con una estructura de una sola tira de ADN fue usado para la omisión del exón 19. Esto pudo ser comprobado al ser adicionado a miocitos de una biopsia del paciente con una deleción del exón 20, pudiéndose omitir el exón 19 para que así, 10 días después, 3% de distrofina acortada pudiera ser detectada en cerca de 20% de estas células precursoras de músculo del paciente.

El siguiente paso fue mostrar que esta técnica era también efectiva en ratones mdx vivos. La ausencia de distrofina hacia a las membranas de las células musculares permeables a las drogas potenciales. La aplicación de 2 mg (miligramos) de oligonucleótidos por Kg. de peso corporal por vía de inyección en el abdomen condujo efectivamente a la omisión de exón deseada. Después de dos días, el ARN mensajero sin el exón 19, pero que conservaba la mutación puntual del ratón mdx en el exón 23, pudo ser detectado no solo en los músculos esqueléticos si no también en el músculo cardiaco y persistió ahí durante al menos 14 días después del tratamiento. Para checar la posibilidad de toxicidad, los ratones fueron inyectados con cien veces la dosis deseada para el paciente, p.e. 50 mg por kg de peso corporal. No pudieron ser detectados efectos tóxicos.

Después de estos experimentos en-vivo exitosos, el comité ético responsable dio el permiso para tratar a un chico de 10 años con DM Duchenne y que usa silla de ruedas con una deleción del exón 20, cuyas células habían sido usadas para los experimentos preparatorios. El recibió una

infusión intravenosa, en su circulación sanguínea, una vez a la semana durante cuatro semanas 0.5 mg por kg de peso corporal del oligodesoxiribonucleótido en antisentido disuelto en una solución salina sin ninguna sustancia portadora durante dos horas.

Un día después de cada infusión, fue analizado el ARNm de la distrofina en los linfocitos, una clase de glóbulos blancos sanguíneos. Después de la segunda infusión, nuevo ARNm pudo ser detectado y cuyas cantidades aumentaban después de cada infusión. Debido a que este ARNm no contenía mas los 88 nucleótidos del exón 19, este era 0.64% menor que el todavía presente ARN suprimido. Una semana después de la última infusión, una determinación de secuencia mostró que el extremo del exón 18 estaba unido al inicio del exón 21 en el ARNm. Por lo que, no solo el exón 20 estaba faltante, lo cual causaba distrofia Duchenne, si no también el exón 19 no estaba mas presente. Finalmente, en pruebas con anticuerpos, nueva distrofina pudo ser detectada en las células musculares después de otra biopsia. Un adicional y más detallado análisis de proteína podría ser realizado en un futuro cercano.

Un mejoramiento de la función muscular del chico no pudo ser todavía detectado. La actividad de la CK no cambio significativamente. El oligonucleótido fue aparentemente suficiente estable para ser detectado varias semanas después de su aplicación. El paciente es ahora supervisado cercanamente y clínicamente investigado. Se planea repetir el tratamiento con cuatro consecutivas infusiones después de un año. También pudiera ser decidido repetir infusiones únicas en cortos intervalos de tiempo como una o dos veces por mes.

Si este primer tratamiento sistémico de omisión de exón se volviera realmente exitoso como aparenta al presente, la omisión del exón 19 pudiera ser intentado en chicos con DM Duchenne con otras deleciones, como de los exones 8-18, 20-22, 20-23 y deleciones mas extensivas comenzando en el exón 20 y terminando en el exón 24 y todos los siguientes exones hasta la deleción 20-42.

Lectura a través de los codones de parada.

**Las bases moleculares de este tratamiento con gentamicina es explicado.
Las condiciones son examinadas y un mejor fármaco potencial es presentado.
Los resultados de las primeras pruebas clínicas son reportados.**

Ignorando un codón de parada prematuro con anti-bióticos: *Jean-Pierre Rousset* (Paris) describió en detalle como la biosíntesis de proteínas es finalizada por un normal codón de parada en el ARNm, de igual forma que pasa cuando un codón de parada prematuro es causado por una mutación puntual, y como un antibiótico como la *gentamicina* puede hacer que el mecanismo de síntesis ignore la señal prematura de parada *leyéndose a través* de ella.

Los varias clases de proteínas que una célula necesita para su función son sintetizadas en los ribosomas, largas estructuras complejas consistentes cuatro largos ARN's con actividad enzimática, las *ribozimas*, y cerca de 80 diferentes proteínas. La información genética para la construcción de proteínas es llevada a los ribosomas por los ARNm's. Dentro de lo ribosomas, la nueva proteína es ensamblada con sus bloques de construcción, los aminoácidos. Estos son entregados al sitio de ensamblaje por otra

clase de ARN's, los ARN's de transferencia o ARNt's, los cuales reconocen las tripletas de los codones del ARNm uno tras otro. Cuándo un normal codón de parada llega al sitio de la síntesis, significa que la proteína esta finalizada y lista, que no se necesita mas ARNt, el cual traía los aminoácidos, pero proteínas especiales llamadas, *factores de liberación*, entran al sitio de ensamblaje, deteniendo la síntesis y liberando la completa nueva proteína del ribosoma

Cerca del 5 al 10% de los chicos con DM Duchenne tienen una mutación puntual en su gen de la distrofina, conduciendo al cambio de una palabra que codifica un aminoácido en uno de los tres codones de parada que hay, TGA, TAG y TAA. En el ARNm, estos codones se vuelven UGA, UAG, y UAA y causan que la síntesis de proteína se detengan prematuramente, antes que la nueva proteína, en este caso distrofina, este terminada. Los ARNm's con tales codones de parada prematuros serán degradados vía el pro-

ceso de *descomposición mediada por contrasentido*, y la distrofina sin terminar será también degradada rápidamente.

La gentamicina es un antibiótico que causa que el mecanismo de traducción del ARN en el ribosoma ignore tal codón de parada prematuro, p.e. que *lea a través* de él. La eficiencia de la lectura a través es diferente para los tres diferentes codones de parada y esto también depende de la secuencia de ARNm antes y después de la señal de parada. Por otra parte hay tres clases diferentes de gentamicina con estructuras levemente diferentes, esto influencia también la extensión de la lectura a través. El detalle de estas complejas relaciones todavía no está completamente comprendido.

Si la técnica de leer a través, la cual ahora muestra una amplia variación de eficiencia con diferentes mutaciones de los pacientes, puede ser desarrollada para una terapia de DM Duchenne, solo una minoría de todos los pacientes, cerca del 5 a 10%, probablemente sería capaz de beneficiarlos. La nueva distrofina tendría prácticamente una normal estructura. Por lo que, en condición de crearse suficiente nueva distrofina, esta terapia curaría la enfermedad y no solo la cambiaría en una distrofia tipo Becker. Ya que leer a través no ocurre a nivel del gen si no durante la síntesis de proteína en los ribosomas, el tratamiento tendrá que ser repetido periódicamente. A los pacientes con una mutación puntual se les deberá determinar la secuencia alrededor del sitio de la mutación, para que así pueda ser predicha la eficiencia del tratamiento. La gentamicina tiene su ventaja al ser un fármaco bien conocido, cuya alternativa de usarse como una posible terapia para distrofia muscular Duchenne pudiera no requerir largos procedimientos de aprobación.

La gentamicina puede curar la distrofia muscular en ratones mdx: *Lee Sweeney* (Filadelfia) discutió el efecto de la gentamicina en ratones mdx. Estos ratones distróficos tenían una mutación puntual que cambia la base citosina (C) en la posición 3,185 del exón 23 por una timina (T). Esto convierte el codón CAA, el cual normalmente codifica el aminoácido ácido glutámico, en la tripleta TAA la cual es un codón de parada prematuro. Inyecciones de gentamicina en los ratones mdx conducía a la presencia de nueva distrofina en más del 20% de las fibras musculares. Y los ratones con estas cantidades de distrofina tenían síntomas distróficos clínicos aminorados. Pero la gentamicina retarda el crecimiento de los animales y en los humanos puede causar serios efectos adversos como daño en el oído interno y riñones.

Ya que los investigadores tuvieron dificultades cuando repitieron los experimentos, ellos analizaron los diferentes lotes comerciales del fármaco y descubrieron que la gentamicina existe en 5 variantes con estructuras levemente diferentes. Aunque estas tenían la misma actividad antibiótica, tenían una eficiencia para leer a través un poco distinta, así como también su toxicidad. El componente C2 tenía alta eficiencia para leer a través y una baja toxicidad. Esto significa que las preparaciones de gentamicina tienen que ser cuidadosamente seccionadas antes de ser usadas en pruebas clínicas.

La secuencia en la región alrededor del codón de parada influye la eficiencia de leer a través: *Kevin*

Flanigan (Salt Lake City) reportó el desarrollo de un sistema de prueba para determinar en que forma un codón de parada y los nucleótidos siguientes influyen en la eficiencia de la reacción de leer a través con antibióticos. Para este sistema, fueron usados oligonucleótidos de ADN de 21 unidades de largo. Cada una de estas cortas secuencias contenía uno de los tres codones de parada TGA, TAG, o TAA, y cada uno de ellos seguidos de los cuatro nucleótidos de ADN, A, G, C, o T. Cada uno de estas 12 secuencias de ADN fueron conectadas a los genes de dos enzimas productoras de luz y transportados con un virus a un cultivo de miotubos, células precursoras de músculo. Una de las enzimas producía luz solo cuando la construcción de oligonucleótido había entrado a los miotubos, y la otra producía luz solo cuando el codón de parada *no detenía* la producción del ARNm de la enzima. Así que, el sistema permitía determinar la eficiencia de leer a través de la gentamicina y otros antibióticos simplemente al medir la intensidad de la luz producida por las dos enzimas.

De esta manera, pudo ser demostrado que el codón de parada del ARN, UGA, permitía un alto nivel de lectura a través que en los otros dos codones, UAG y UAA, y que la base siguiente al codón era importante: C conducía una alta eficiencia de lectura a través, más que U; y A y G fueron todavía menos efectivos. La más activa combinación fue UGA-C, permitiendo una lectura a través en presencia de gentamicina del 8% en el sistema de prueba. El codón de parada UAA-A en los ratones mdx solo daba una eficiencia de 1% de lectura a través. Otro antibiótico aminoglicosido, geneticina, fue también probado en este sistema: la geneticina fue más efectiva que la gentamicina, pero más tóxica. La Amikacina, tobramicina, y paromomicina fueron menos efectivas.

En este sistema artificial de prueba, los 18 nucleótidos antes y después del codón de parada tenían una secuencia aleatoria, como por ejemplo TCG-ACG-TGC-GAT-TGA-CCG-TTC con el codón de parada y el siguiente nucleótido subrayado.

Ya que todavía no es posible predecir la eficiencia de la lectura a través, a partir de la secuencia alrededor del sitio de la mutación de un paciente individual, será prudente determinar la probable eficiencia de la lectura a través de la preparación de gentamicina en un experimento de laboratorio *antes de tratar* a un chico. La nueva prueba podría permitir saber si la secuencia del oligonucleótido en el sistema de prueba, es idéntica a la secuencia de la región del sitio de la mutación del paciente.

En el laboratorio de *Kevin Flanigan*, un nuevo método de análisis – SCAIP – fue desarrollado para la rápida secuenciación de todas las partes activas – los exones, promotores, y sitios de empalme – del gen entero de la distrofina. Este método es ahora usado para preparar un banco de datos el cual permitiría la predicción del curso clínico de una distrofia muscular Duchenne o Becker basándose en un preciso conocimiento de la mutación del paciente. Este nuevo método será también ideal para encontrar aquel 5 a 10% de pacientes a quienes posiblemente los beneficiara la terapia de lectura a través.

Un nuevo compuesto químico es mejor que la gentamicina: La compañía *PTC Therapeutics* en in South Plainfield, New Jersey, está desarrollando una pequeña molécula farmacológica que interfiere con estructuras de

ARN mutadas que son responsables de enfermedades hereditarias. Encontrar una terapia para distrofia muscular Duchenne, basada en la lectura a través del codón de parada es una de sus prioridades. *Lee Sweeney* (Filadelfia) es uno de sus asesores científicos. El aportara un sumario de resultados experimentales. (PCT son las siglas en ingles de "post transcriptional control")

Con un sistema de prueba similar al descrito por *Kevin Flanigan*, miles de compuestos químicos fueron probados automáticamente por su habilidad para causar la lectura a través de los codones de parada prematuros. El compuesto más prometedor identificado es el PTC124 cuya estructura química se mantiene confidencial. Es mas eficiente que la gentamicina en restaurar la síntesis de distrofina en los ratones mdx, y este puede ser dado *oralmente*, una ventaja muy importante para una futura terapia.

No se detecto la lectura a través de los codones de parada normales, ni una omisión de exón, ni un empalmamiento alternado. Solo apareció distrofina de extensión normal en cantidades casi normales en cultivos de células o en 20% de las fibras musculares de los ratones después de su administración oral. El PTC124 desaparece de los animales mucho más rápido que la gentamicina. Para una terapia de largo término en humanos probablemente se tendría que dar dos a tres veces por día. Los estudios de toxicidad en ratas y perros con 50 veces la probable concentración terapéutica en humanos no mostraron ningún efecto adverso.

La fase-1 de una prueba clínica podría ser iniciada, no con pacientes si no con voluntarios sanos, en la segunda mitad del 2004. La fase-2 de la prueba continuaría inmediatamente. La droga probablemente también sea activa para los codones de parada prematuros en el gen responsable de la fibrosis quística y otras enfermedades génicas.

Las primeras pruebas clínicas fueron decepcionantes:

Kenneth Fischbeck (Bethesda) reporto una prueba clínica con cuatro pacientes que fue realizada 3 años atrás en el National Institutes of Health en Bethesda cerca de Washington. Dos pacientes con DM Duchenne, de 13 y 16 años de edad con los codones de parada UAA y UAG, y 2 pacientes con DM Becker, de 6 y 18 años de edad, ambos con un codón de parada UGA, participaron en esta primera prueba clínica. Ellos recibieron 7,5 mg por kg vía intravenosa durante una hora por día por 14 días.

Después del tratamiento, *no* pudo ser detectada distrofina de extensión completa a pesar que uno de los pacientes con DM Becker tenia una C después del codón de parada UGA, una combinación la cual había mostrado una alta actividad de lectura a través en experimentos con ratones y sistemas artificiales de prueba. En la prueba no hubo evidencia de toxicidad y no hubo cambios en la fuerza muscu-

lar. Los niveles de creatina kinasa descendieron significativamente durante el tratamiento pero se incremento mas adelante.

La prueba fue realizada antes de que fuera conocido que las preparaciones de gentamicina eran mezclas de diferentes compuestos con variada eficiencia para leer a través. Así que se concluyo que futuras pruebas debían ser realizadas por largos periodos y solo con preparaciones de gentamicina que prueben tener alta eficiencia.

Una prueba similar con 12 pacientes fue realizada en Columbus/Ohio por *Jerry Mendell*. Los resultados fueron igualmente decepcionantes. Una prueba mas larga es ahora preparada.

Otra prueba clínica fue mas exitosa: *Luisa Politano* (Nápoles) presento el resultado de una prueba clínica similar en Nápoles con cuatro pacientes con DM Duchenne, uno de 4 años de edad con un codón de parada UGA-C en el exón 29, dos hermanos, de 8 y 10 años de edad con un codón UGA-C en el exón 7, y un paciente de 11 años de edad con un codón de parada UAA-A en el exón 6.

El principal constituyente de la preparación de gentamicina comercial fue el mas activo componente C2. El fármaco fue administrado vía intravenosa durante dos horas diarias por 6 días en una dosis de 6 mg/kg disueltos en solución salina. Después los pacientes no recibieron medicación por 7 semanas, y ya que no fueron observados efectos adversos, el tratamiento fue repetido por otros 6 días con dosis levemente mayores de 7,5 mg/kg.

Antes y después del tratamiento, fueron realizadas biopsias abiertas para la determinación de distrofina. En el paciente de 4 años de edad, aparentemente distrofina normal pudo ser encontrada después del tratamiento, no obstante, los resultados de las pruebas con anticuerpos dejan algunas preguntas abiertas. En dos de los otros pacientes, un número de distrofinas acortadas fue detectado. Como en las dos pruebas en los Estados Unidos, los niveles de CK disminuyeron durante el tratamiento y que aumentaron más adelante de nuevo.

El tratamiento del paciente de 4 años de edad fue continuado con 12 ciclos más de 6 días de aplicación de gentamicina sin ningún efecto adverso. El ahora tiene 7 años de edad y no tiene más síntomas de DM Duchenne.

En la discusión se argumenta que cualquiera de la nueva distrofina de extensión completa y las versiones acortadas se debieron a la lectura a través del codón de parada o posiblemente a reacciones de empalme alternado o aun una omisión de exón no especifica. Y ya que la mutación en el exón 29 pudiera haber creado un codón de parada con una estructura especial, así que este resultado positivo puede un caso excepcional que no puede generalizarse.

De la discusión general, se concluyen los siguientes puntos:

Sobre la omisión de exón: Apuntar los oligonucleótidos a las secuencias enteramente del exón a ser omitido al parecer debe ser mas especifico que al seleccionar los sitios de empalme en los extremos del exón. --- La clase de modificación química de los oligonucleótidos también al parecer influye la omisión. --- Experimentos en cultivos de células y en animales o humanos pudieran dar resultados diferentes. --- En pacientes quienes tienen la misma mutación, los resultados de la omisión de exón pudiera ser diferentes.

Uno debe encontrar el óptimo oligonucleótido para cada paciente. --- Nadie sabe si como realmente funciona la omisión de exón.

Antes de que una prueba clínica con pacientes sea iniciada, será importante probar los oligonucleótidos en voluntarios sanos. No obstante, una omisión de exón no intencional, p.e. del exón 51 que cambie el marco de lectura, pudiera provocar distrofia muscular a una persona sana (temporalmente). --- Aun si no hay respuesta inmune

en ratones mdx, esto podría ser diferente en los niños. Antes de una prueba clínica, debe ser chequeado que tanto una reacción inmune contra la nueva distrofina es probable.

No es posible predecir de forma fidedigna que tanto la nueva distrofina acortada por la omisión de exón realmente causa una distrofia Becker. El efecto de algunas distrofinas deletionadas es conocido, p.e., la delección de los exones del 45 al 47 crea una distrofia Becker muy moderada. Pero para otras habría que probar en pacientes. A pesar que los experimentos pueden ser realizados en ratones "humanizados", los ratones no son un buen modelo clínico de las enfermedades humanas. Es muy dificultoso, caro y consume tiempo crear todos los ratones transgénicos específicos. --- La reacción de omisión pudiera también depender de factores de control todavía desconocidos. Análisis de micro ordenamiento antes y después del tratamiento podría revelar cambios inesperados en otras proteínas. Pero esto crearía grandes cantidades de información la cual no entenderían los comités de regulación y a menudo ni los científicos. --- No es todavía conocido que tanto la distrofina que aparece después de la omisión de exón tiene la misma estructura tridimensional como una distrofina Becker "normal" debida a una mutación. --- Tampoco es conocido que tanto la cantidad de distrofina producida después de la omisión es suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad. --- Los puntos de quiebre de una delección en el gen pueden encontrarse en algún lugar dentro de los intrones. Esto pudiera tener consecuencias para el curso clínico de la enfermedad. Pero no se han realizado intentos para identificar los puntos de quiebre de forma precisa en las a menudo muy largas secuencias del intrón.

Los efectos de toxicidad deben también ser buscados. La fase-I de una prueba clínica normalmente detecta efectos tóxicos. Estos pudieran deberse a la omisión de exón no intencional en otros genes.

Las primeras pruebas clínicas usaran inyecciones intramusculares locales de oligonucleótidos. Entonces, la toxicidad, problemas inmunes y otros efectos adversos podrán ser vistos mucho mejor que después de una inyección intravenosa sistémica. --- El siguiente paso hacia una aplicación sistémica es algo grande. Este debe solo ser realizado con la certeza de que el procedimiento funcionara, p.e., al inyectar un oligonucleótido localmente en uno de los músculos del paciente para quien fue creado. Esto podría tomar solo unas pocas semanas y podrá hacer el procedimiento seguro. Si algo sucediera, uno puede interrumpir el experimento. Si algo sucediera durante una inyección sistémica, la droga pudiera ir donde sea en el cuerpo y pudiera crear otra enfermedad como miositis por encima de la distrofia muscular. No sabemos como los pacientes podrían reaccionar al fármaco, ¡no deseamos ningún desastre!

Las fase-III de las pruebas clínicas busca determinar la dosis optima debiéndose realizar en un gran numero de pacientes. Ya que no habría suficientes pacientes con DM Duchenne para tal larga fase de prueba clínica, un método terapéutico se mantendría entonces como una terapia experimental después de la fase-II de prueba. Por fortuna, como fármaco efectivo seria aprobado como parte de una legislación de enfermedades huérfanas. --- Hay ejemplos de terapia génica para el cáncer donde las agencias reguladoras no insisten en que se sigan todas las reglas.

Varios pacientes con DM Becker tienen pocos síntomas leves, y se espera que haya varias personas con distrofinas

acortadas en sus músculos las cuales no conducen a síntomas significantes. Estos "pacientes subclínicos no están al tanto de que ellos tienen una distrofia muscular Becker. Se sabe que los pacientes están al parecer solamente en la punta del iceberg, y la incidencia aceptada de chicos con DM Becker al nacer es de 1:18 500 pudiendo ser mucho mas bajo.

Como cada laboratorio ha desarrollado sus propias técnicas, no es fácil comparar los resultados experimentales, por lo tanto, la estandarización de los métodos seria deseable. Pero esto podría ser una labor algo intensiva y dificultosa de acordar. --- También, uno debe ser capaz de intercambiar líneas de células y oligonucleótidos, pero para sintetizar esto es muy caro. --- Si un laboratorio tiene un nuevo sistema para chequear distrofina o de omisión, este deberá estar disponible para otros, el desarrollo es costoso y consume tiempo. --- Las agencias reguladoras podrían insistir en métodos estandarizados.

El principal objetivo de este encuentro fue crear la oportunidad de intercambiar información, estimular la cooperación, y de esa forma acelerar la investigación para una terapia. Esta planeado se repita esta conferencia de mesa redonda, quizás anualmente. Fue sugerido llevar a cabo un consorcio internacional para intercambiar información.

Para finalizar: La gran compañía *Glaxo* esta interesada en realizar pruebas clínicas en distrofia Duchenne. Ella tiene extensiva experiencia lidiando con asuntos regulatorios y podría aun ayudar a desarrollar fármacos potenciales.

Sobre la lectura a través del codón de parada: Es difícil predecir la respuesta individual de los pacientes a la terapia con gentamicina. La respuesta debe ser analizada con el sistema artificial que contenga la secuencia exacta de la mutación de tal paciente. Los investigadores en Salt Lake City y en Orsay cerca de Paris ofrecieron realizar esto para pacientes que entren a pruebas clínicas. --- La respuesta de un paciente a la gentamicina puede también ser analizada en cultivos de células musculares que pueden ser fácilmente hechos con fibroblastos, células del tejido conectivo de la piel, del paciente.

Antes de una prueba clínica, las preparaciones de gentamicina tendrán que ser chequeadas para dar certeza que son activas. Esto depende de la composición de sus diferentes componentes. --- La nueva distrofina debe ser analizada con anticuerpos en muestras de biopsia muscular después del tratamiento. No podrá ser distinguida de la distrofina normal por análisis de rutina, debido a que son del mismo tamaño. Solo un aminoácido en el lugar del codón de parada es diferente. --- En algunos experimentos con animales, ha ocurrido la omisión de exón; es entonces, que la nueva distrofina es mas corta. --- Otro estudio clínico deberá ser realizado durante un largo periodo de tiempo.

Los tipos codones de parada prematuros que ocurren después de una delección que causa un cambio del marco de lectura también serian afectados por la gentamicina, pero ya que no podrá corregir el marco de lectura no conducirá a distrofina funcional. --- Que tanto los codones de parada normales siempre serian respetados como antes no esta claro. --- Los efectos tóxicos de la gentamicina pudieran parcialmente deberse a la supresión ocasional de los codones de parada normales y la incorporación de un

aminoácido incorrecto en otras proteínas. --- El compuesto PTC124 al parecer actúa por un mecanismo que es diferente al que usa la gentamicina, y al parecer no induce la

lectura a través de los codones de parada normales. Por lo que, es mucho menos toxico.

La entrevista:

¿Que tanto tendremos que esperar hasta que la omisión de exón aminore la distrofia Duchenne en Becker?

En esta entrevista, conducida el 17 de enero, respondieron preguntas el Profesor *Gert-Jan van Ommen* y la Dra. *Judith van Deutekom*, de la Universidad de Leiden in Holanda, y al Dr. *Gerard Platenburg* de ProSensa, la compañía la cual desarrollara clínicamente el fármaco. Las preguntas fueron hechas por *Günter Scheuerbrandt*, el autor de este reporte. Para entender mejor la entrevista, debe ser leído primero el reporte. La abreviación “oligo” o las siglas en ingles “AON” significan *oligonucleótido en antisentido*.

A partir de esta entrevista, las familias de pacientes con DM Duchenne esperan una respuesta, si esta fuera posible, a la mas importante pregunta: ¿Que tanto tendremos que esperar hasta que una terapia efectiva este disponible para nuestros chicos?

Dar una correcta respuesta a esta pregunta es imposible, debido a que para alcanzar nuestra meta, una terapia efectiva y segura, tenemos que tomar *un paso tras otro*, y no sabemos que tanto tiempo necesitaremos para cada paso. Debemos ahora trabajar con nuestros ratones humanizados. Tales ratones tienen el gen de la distofina humana de tamaño completo en sus músculos, y el siguiente paso es tratar de tomar exones específicos, como los exones 45 o 52, así que usaremos esos ratones para demostrar que la omisión de exón funciona en el gen humano en organismos vivos. Esto no ha sido hecho todavía.

¿Y continuación, el segundo paso, cuando serian las reales pruebas clínicas con niños. Que tanto tomaría hasta que ustedes puedan empezarlas?

En la primera prueba clínica, tenemos que mostrar que el mecanismo funciona usando una inyección en el músculo. Este no sería todavía el método de una terapia final. La que probablemente sea una aplicación sistémica en el flujo sanguíneo. Estamos trabajando muy duro ahora para desarrollar un protocolo clínico, pero también tratamos de manufacturar los AON's mismos en una calidad que podríamos necesitar para realizar este tipo de trabajo.

¿Tendrían que modificar estos AON's para ser entregados a los músculos de forma sistémica?

Esto es un desarrollo completo y que actualmente tomaría unos pocos años más. Lo que debe quedar en claro, es que necesitamos demostrar que la omisión de exón, la cual funciona en ratones y cultivos de células, funciona también en los músculos de los niños. Pero, también tenemos que mostrar que no tendrá efectos adversos, y para eso tenemos que demostrar que los productos degradados no muestran efectos tóxicos en organismos vivos. Esta parte de los estudios ha sido realizada en animales. Si usted desea saber cual sería el tiempo razonable, para hacer los experimentos inyectando el AON para uno de los mas omitibles exones en el músculo de solo tres o cuatro pacientes con el objetivo de demostrar que como un “principio de demostración” en pacientes vivos, pensamos será de *dos a tres años*.

Podemos ir mas rápido que eso, pero podríamos tener problemas inesperados con las autoridades regulatorias, o podríamos tener otros problemas por algunas razones que no conocemos de antemano. Sabemos que somos usualmente optimistas al decir “en un año o un año y medio ten-

dremos la respuesta”, esto nunca ocurre de esa manera. Así que es mucho mas realista decir, necesitaremos dos a tres años para hacer este estudio en una forma que realmente nos de una buena y confiable respuesta, y tres a cuatro años para *completar* esta primera prueba clínica con niños a los que se les inyectara un músculo para demostrar que todo marcha como esperamos marchara.

En ese momento, el tiempo para iniciar el próximo paso será mucho mas incierto, debido a que tendremos que confiar en desarrollos en el campo que no podemos controlar nosotros mismos. Este paso sería entregar los oligos en el músculo de una forma aceptable, y todo mundo concuerda que será la sistémica, a través del flujo sanguíneo. Para entonces estamos hablando sobre muy diferentes marcos de tiempo.

¿Cuando este tercer paso, la primera prueba de tratamiento sistémico con niños, será completado?

Para ser honestos, este tomara al menos seis años desde que inicie la prueba hasta que este contemplada, si todo marchara bien. Las personas deben entender que hoy en día nadie realmente tiene un protocolo bien probado para realizar actualmente este paso. Así que hay una incertidumbre aun al principio de esta prueba clínica, y los detalles solamente ahora están comenzando a ser enumerados durante este encuentro y en varios estudios terapéuticos para otras enfermedades donde son usados oligonucleótidos.

¿Pero, si todo marchara muy bien, pueden ser abreviados algunos pasos que son prescritos por las agencias regulatorias?

Estamos desarrollando un nuevo tipo de fármaco cuyos efectos adversos no conocemos cuando es agregado a un organismo vivo. Este puede llegar a donde sea en el cuerpo. Y cada célula tiene una cantidad tras otra de cosas que son reguladas de forma precisa. Varias interactúan a través de moléculas cortas específicas de ARN, mecanismos de empalme por instancia, o cambiando las actividades génicas activándolas o desactivándolas. Así que hay varios tipos de ARN's muy cortos similares a nuestros AON's cuyos efectos solo ahora empezamos a entender. Y lo que usted nos pregunta es hacer una estimación de que tanto tomara cuando todo marche maravillosamente bien y todo mundo colabore. Esto pasaría si decimos un tiempo definitivo, un cierto día: todo mundo lo vería solo ese día.

Es muy importante lo que acaba de decir tan claramente debido a que los padres buscan desesperadamente ese día.

Ciertamente, es similar a la situación en el trabajo dia-

gnostico cuando se le dice a los padres que pudieran tener la diagnosis en una semana, pero esto pudiera también tomas seis meses, y después de una semana comienzan a telefonar. Y ciertamente, si les decimos que no pueden esperar una diagnosis antes de dos meses, y nosotros los llamamos a ellos después de solo un mes con la diagnosis en vez de dos, ellos incluso se vuelven temerosos debido a que ellos se preguntan si algo marcha mal porque marchó demasiado rápido. Así que es mucho mejor no dar esperanzas de forma indebida.

¿Entonces usted no puede dar una respuesta precisa a la pregunta sobre el tiempo a esperar?

Bill Gates ha dicho: "Las personas siempre sobrestiman lo que se puede lograr en dos años, y subestimar lo que se puede lograr en diez años". Se esta en un camino intermedio, y podremos estar decepcionados si todo el procedimiento toma mas de 10 años hasta que los primeros verdadero resultados alentadores con la administración sistémica sean obtenidos.

No obstante, las personas deben entender que 10 a 15 años es el tiempo promedio de desarrollo de una medicación normal, mientras que aquí estamos lidiando con varias interrogantes. Algunas cosas pueden marchar mucho mejor, y algunas otras cosas marchar mucho peor. Pero pensamos, 10 años podría ser un estimado razonable para ver la primera aplicación prometedor del trabajo con oligonucleótidos en antisentido para DM Duchenne. Por supuesto, esperamos que tomara menos tiempo, y hay una oportunidad de que esto tomara menos.

Así que uno puede decir que para aquellos niños, quienes ahora nacen con distrofia Duchenne, sus oportunidades de terapia son mayores que quienes ahora tienen 10 años de edad. ¿Pero la omisión de exón seria aplicable tarde para los pacientes quienes tienen 20 o mas años de edad?

Es posible que podamos aminorar el desarrollo de la enfermedad, pero aun entonces podríamos estar asombrados si realmente pudiéramos tener una cura completa para los pacientes entre 15 y 20 años de edad, debido a que sus músculos podrían ya estar remplazados por tejido conectivo y grasa. Pero la situación dependerá del curso de la enfermedad de cada paciente individualmente, y que pudiera ser algo diferente. Algunos pacientes ocurre muy rápidamente y después se vuelve mas lento el debilitamiento, y algunos otros pacientes se deterioran de forma constante. Simplemente no entendemos siempre todavía porque o como las cosas ocurren mal.

Pero todo mundo simplemente espera una completa renovación de todo. No obstante, una vez que los pacientes con DM Duchenne son mayores a los 15 a 20 años, ellos tienen que haber ido a través de varias etapas de su vida. Y algunos podrían entender de que ellos nunca estarán mucho mejor que lo que ellos están, pero también que ellos podrían no estar mucho peor si la omisión de exón funcionara para ellos. Así que, para los pacientes con DM Duchenne mayores, después de otros 10 años podríamos probablemente ser capaces de hacer que el proceso vaya mucho mas lento o aun detenerlo, pero es poco probable que, de un día para otro, los sacara de su silla de ruedas y se les vera caminar.

¿Pueden los oligonucleótidos en antisentido ser hechos automáticamente y en suficientes grandes cantidades? Y ¿tendrían que hacer un fármaco individual para cada

paciente cuya estructura dependerá de su mutación en particular? ¿Así que tendrían que hacer de forma individualizada varios AON's diferentes?

Probablemente no necesitaríamos hacer de forma individualizada los AON's para cada paciente, algunos de ellos serian usados para un grupo entero de pacientes. Podemos hacerlos automáticamente en una muy pura calidad, y así ellos serian seguros.

¿Serán algo costosos cuando los AON's estén en las farmacias?

Es muy difícil hacer un comentario al respecto. Los AON's de alto grado clínico para los experimentos en pacientes son extremadamente caros. Es por lo que las pruebas clínicas cuestan así de mucho.

La medicación para otra enfermedad genética, la enfermedad de Gaucher, cuesta 200 000 dólares por año. Y hay muy pocos pacientes en los Estados Unidos quienes no pueden, de una manera u otra, conseguir el dinero para acceder al tratamiento. A través tanto de organizaciones de pacientes o de la riqueza de sus padres o los seguros de salud o de donde sea. Y no varias personas se quedan atrás. Así que, es difícil decir que tanto un tratamiento es caro o barato, debido a que depende de que es lo que el paciente recibe a cambio. Si el precio es de 50 000 euros por año por una expectativa de vida extra de 20 años con un mejoramiento de la calidad de vida, entonces los seguros o los padres o quien sea probablemente conseguirían el dinero.

La ultima pregunta: Los padres están desesperados, ellos tratan con todo, ellos están tratando con creatina, entonces tratan con co-enzima Q10 o te Abisinio, o ellos incluso van con aquellos doctores milagrosos en Kiev, quienes piden 60 000 euros simplemente en la primera visita. ¿Que tienen que decir sobre esto ustedes como científicos?

Es algo que las personas realmente tienen que decidir por si mismas. Podemos entender que ellas están desesperadas, podemos entender que ellas desean ir en cualquier dirección que pudiera ser esperanzadora, pero también pensamos que científicamente no hay una base para que el tratamiento propuesto en Kiev funcione. No tenemos nosotros mismos un niño con DM Duchenne, pero si tuviéramos uno, aseguraríamos nuestro dinero para otras cosas.

Tenemos tiempo para algunas palabras finales.

Para finalizar esta entrevista, permítanos recalcar que realmente necesitamos tomar *un paso a la vez*. Que es por lo que primero trabajamos en ratones, después hacemos el trabajo en-Vitro con células musculares humanas, después introducimos genes de distrofina humana en los ratones, y ahora les estamos produciendo mutaciones humanas, y finalmente, después de todas estas preparaciones, no antes, trabajaremos con chicos con DM Duchenne, primero con inyecciones locales, después con un acercamiento sistémico, el cual, esperamos, será el procedimiento terapéutico final.

Pero un chico no es un ratón grande, y un ratón no es un humano de 30 gramos de peso. Ellos son muy diferentes. Si un chico no tiene distrofina, el tiene DM Duchenne. Si un ratón no tiene distrofina, se ve muy levemente afectado. Así que uno debe entender que hay diferencias en ratones y niños. Es el porque de que lo que hacemos en ratones necesita ser repetido en humanos. Y es importante que hagamos el primer paso clínico para mostrar que al

inyectar los AON's en los músculos realmente obtenemos lo que esperábamos, aun si esto no vaya a ser la dirección final de la terapia. Esta es una razón por si misma para impulsar una esperanza, que siempre será un siguiente paso. Nosotros, como científicos quienes tienen que ir tras las pruebas, necesitamos aquellos pasos que muestran que hacemos progresos, pero un paso a la vez. Algunas veces es verdaderamente muy difícil ver por encima del horizon-

te, pero si tomamos un solo paso a la vez habrá un momento cuando podamos realmente ver nuestro objetivo en el horizonte y que esta mas y mas cerca.

Es muy importante para ustedes decir eso. Todas las familias con DM Duchenne están agradecidas con los esfuerzos de ustedes y sus colegas para llevar la omisión de exón a la vía clínica y que sus niños esperen sea mas rápido que diez años.

Un intento para dar una conclusión:

Yo, el escritor de este reporte, *Günter Scheuerbrandt*, no soy un doctor en medicina – soy un bioquímico -, y no estoy activamente involucrado en la investigación de una terapia para distrofia Duchenne. Pero conozco bien la situación, la esperanza y la desesperación de las familias con chicos con DM Duchenne. Mi larga experiencia de 30 años con el programa de detección temprana de esta enfermedad en Alemania me ha puesto en contacto con varias familias, así que se que pasa. Esto me permite hacer una conclusión después de los resultados de este remarcable encuentro de dos acercamientos terapéuticos, *la omisión de exón y la lectura a través de los codones de parada*.

Otros acercamientos de investigación para una terapia como la transferencia de células madre, la transferencia de la secuencia entera de la distrofina, su ADNc, o versiones acortadas de la misma con adenovirus y virus adeno-asociados, la activación de la utrofina y varios otros también prosiguen activamente – uno, en Francia, incluso esta siendo probado clínicamente – pero ellos probablemente no estén cerca de una terapia funcional y útil como parece ser la omisión de exón actualmente.

No obstante, la omisión de exón no será una terapia final la cual cure la enfermedad para un mejoramiento y haga los chicos caminen de nuevo. Esta solo disminuirá la implacable progresión y así dará a los chicos mas tiempo para esperar una cura completa. Pero cerca de 10% de los chicos serán dejados detrás cuando la omisión de exón mejore la calidad de vida de la mayoría, el 90% de ellos. La lectura a través de los codones de parada ayudaría solo a cerca de 10%, aquellos con la mutación apropiada en su gen de la distrofina. Un vez que funcione, probablemente no será 100% efectiva, la cantidad de nueva distrofina sería menor que la normal y podría también resultar en un clase de distrofia Becker.

Para ambos métodos, una sola aplicación no sería suficiente. Las aplicaciones repetidas, posiblemente por el resto de la vida de los chicos, serian necesarias para mantener los efectos terapéuticos. Esto no es lo que uno espera de una droga verdadera, una que cure una enfermedad normal como la tuberculosis o úlceras estomacales. Sin embargo, la distrofia muscular Duchenne no es una enfermedad normal. Por lo tanto, una cura parcial podría ya ser una extraordinaria victoria médica.

En la entrevista, los investigadores holandeses decían que pudiera tomar 10 años, más o menos, hasta que un fármaco personalizado de omisión de exón pueda ser ordenado en la farmacia para un chico con distrofia Duchenne. Lo que dará esperanza a aquellas familias cuyos hijos afectados todavía no tienen 5 años de edad. Pero para familias con chicos de 10 o 12 años de edad, esto significara que su enfermedad no será aminorada antes de que ellos tengan

cerca de 20, cuando la mayoría de sus músculos habrán desaparecido. Y probablemente no estaría listo otro método más rápido en menos de 10 años. Estas noticias de este encuentro son decepcionantes, lo cual pudiera no ser así de serio cuando resulte que el tiempo de espera tal vez fuera menor. Después de todo, las predicciones de esta clase pueden nunca ser precisas.

Así que, ¿será el gran paso hacia delante en Kobe en Japón la respuesta? O ¿la prueba en Nápoles? Tal vez, pero solo tal vez, debido a que un solo paciente será tratado en ambas partes. Así que podría ser un único resultado afortunado el cual no podrá ser generalizado. Si algo marchara mal, ¿si los chicos se ponen mas mal de lo que estaban antes del tratamiento? O ¿si ocurre algo más drástico? Entonces el campo de investigación entero, todos los esfuerzos por manipular el gen de esta manera, podrán ser afectados, con consecuencias tan serias como un paro general de todas las pruebas clínicas donde sea por las autoridades regulatorias. Por otro lado – ¡el chico japonés pudiera realmente tener una transformación de su enfermedad que amenazada la vida en una mucho más benigna! O el chico italiano mantenerse sin síntomas. Después de todo, los investigadores japoneses e italianos son científicos experimentados quienes saben lo que hacen. En un año o más, sabremos que tanto estos experimentos fueron exitosos, y pueden crear una completamente nueva situación.

Esta es mi opinión – y pudiera estar equivocado. Pero no estoy equivocado en decir que los científicos quienes presentaron su trabajo en el encuentro y todos sus colaboradores merecen nuestro sincero agradecimiento por sus esfuerzos y su dedicación a pesar de todas las dificultades que encuentran en su camino hacia una terapia que estamos tan desesperadamente esperando.

¿Y que dicen los padres? *Nick Catlin* del Parent Project Británico para la DM Duchenne (PPUK) y padre de un todavía joven niño con DM Duchenne, expresa sus sentimientos y ciertamente de aquellos varios otros padres al final del encuentro.

“Actualmente damos a nuestros niños químicos como los corticoesteroides que sabemos son tóxicos y pueden tener efectos adversos nocivos. Como padres lo hacemos debido a que no hay absolutamente nada más. Ciertamente yo no quiero dar a mi hijo nada toxico. No obstante, podemos ver de las presentaciones aquí en Mónaco que los oligonucleótidos al parecer no son tóxicos en animales, y los resultados tempranos del estudio japonés nos dice lo mismo. Lo que los padres queremos ver es que esta investigación se mueva rápido hacia delante con pruebas clínicas. Esto podrá ofrecer a las familias una real esperanza para el futuro. No debemos quedarnos parados en esta

etapa sobre toxicidad. El tiempo no esta de nuestro lado y queremos un mejoramiento en fármacos como los corticosteroides.

Los padres entendemos las dificultades que los investigadores tienen que superar, pero realmente necesitamos ver ocurran pruebas clínicas de terapia con oligonucleótidos en antisentido tan pronto como sea posible. El financiamiento ofrecido por *Elizabeth Vroom* al grupo holandés a través de los *United Parent Projects* será absolutamente fantástico. Podría ser una absoluta tragedia, no solo para la generación de mi hijo si no para la generación de jóvenes chicos que están naciendo cada día alrededor del mundo, si esta investigación se retrasara seis meses u otro año o dos, debido a que el dinero no esta disponible. ¡Tú puedes estar seguro que no vamos a dejar de tratar de proveer el dinero! Viendo que pasa con mi hijo cada día, perdiendo su fuerza muscular y teniendo dificultades para mantenerse a la par de otros niños, esta investigación me da esperanza realista. Ha sido excitante para mí venir a esta conferencia y regresar a Londres con mucha mas esperanza. En grandioso que padres de todo el mundo este determinados a financiar este

trabajo de investigación. Es un gran crédito para los representantes de padres quienes están aquí: *Pat Furlong* de los EUA, *Elizabeth Vroom* de Holanda, *Luc Pettavino* de Mónaco, *Christine Dattola* de Francia, *Sally Hofmeister* de Alemania, *Fillipo Buccella* de Italia, *Jenny Versnel* del RU, y *Helen Posselt* de Australia y todos los otros padres que aportaron dinero y mantienen la lucha por una cura para distrofia Duchenne. Por favor mantengamos hacia delante.”

Reconocimientos: La conferencia de mesa redonda fue organizada y financiada por el *Parent Project de Francia* y la *Asociación Monaguesca Contra las Miopatías*. Estos dos y varios grupos similares de padres en otros países son parte de los *United Parent Projects contra la Distrofia Muscular* (UPPMD) los cuales son soporte financiero de este y relacionados proyectos de investigación y, en adición, buscan financiamiento alternativo de otras fuentes como agencias gubernamentales de Estados Unidos y el Reino Unido.

Participantes de la conferencia de mesa redonda

Científicos:

Los científicos enlistados con sus direcciones abreviadas y sin ninguno de sus títulos. La mayor parte de ellos son profesores y todos tienen una especialidad médica o postgrado (MD o PhD). Aquellos quienes presentaron su trabajo tienen un * en el frente de sus nombres. Los otros eran personas que escucharon las sesiones y/o participaron en las discusiones.

- *Irene **Bozzoni**, University La Sapienza, Roma, Italia
- Kate **Bushby**, University of Newcastle, RU
- Oliver **Danos**, Genethon-CNRS, Evry Francia
- *George **Dickson**, Royal Holloway University, Londres, RU
- *Judith C. T. **van Deutekom**, Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda
- *Kenneth **Fischbeck**, National Institutes of Health, Bethesda MD, EUA
- *Kevin M. **Flanigan**, University of Utah, Salt Lake City UT, EUA
- *Luis **Garcia**, Genethon-CNRS, Evry, Francia
- *Jean-Claude **Kaplan**, Hôpital Cochin, Paris, Francia
- Hanns **Lochmüller**, University Munich, Alemania
- Qui Long **Lu**, Hammersmith Hospital, Londres, RU
- *Masafumi **Matsuo**, Kobe University, School of Medicine, Kobe, Japon
- Richard **Mulligan**, Harvard Medical School, Boston MA, EUA
- *Gertjan B. **van Ommen**, Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda
- *Terrence **Partridge**, Hammersmith Hospital, Londres, RU
- Gerard **Platenburg**, ProSensa Company, Leiden, Holanda
- *Luisa **Politano**, 2nd University of Naples, Napoles, Italia
- *Thomas **Rando**, Stanford University School of Medicine, Stanford CA, EUA
- *Jean-Pierre **Rousset**, University of Paris XI, Orsay, Francia
- *Daniel **Schümperli**, University of Berne, Berna, Suiza
- *Lee **Sweeney**, University of Pennsylvania, Filadelfia PA, EUA
- *Steve **Wilton**, University of Western Australia, Perth, Australia

Representantes de padres:

Fillipo **Buccella**, Duchenne Parent Project, Italia
Nick **Catlin**, Duchenne Parent Project, RU
Christine **Dattola**, Duchenne Parent Project, Francia
Patricia **Furlong**, Duchenne Parent Project, EUA
Sally **Hofmeister**, Aktion Benny & Co, Alemania
Rod **Howell**, Muscular Dystrophy Association, EUA
Peter **McPartland**, Duchenne Parent Project, RU
Luc **Pettavino**, Duchenne Parent Project, Mónaco

Helen **Posselt**, Duchenne Parent Project, Australia
Jacques **Salama**, Association Française contre les Myopathies, Francia
Elizabeth **Vroom**, Duchenne Parent Project, Holanda

Este reporte fue escrito por:

Guenter **Scheuerbrandt**
Im Talgrund 2,
D-79874 Breitnau, Germany.
e-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Un reporte de todos los acercamientos de investigación con resultados hasta Agosto del 2003 puede ser visto en en alemán, francés, inglés e italiano en <http://www.duchenne-research.com>. Aquellos que deseen recibir estas actualizaciones y la versión del 2004 de este informa deben enviar su dirección de correo electrónico a Guenter Scheuerbrandt

Traducción al español:

Ricardo Rojas Caballero
E-mail: distrofiamuscular@yahoo.com.mx
Internet: <http://www.distrofia-mexico.org>
Playa Rosarito 319
Fracc. Playa Sur
CP 82040
Mazatlan, Sinaloa, Mexico

Omisión de Exón, un Ejemplo

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

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

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

codón de parada oculto

oligoribonucleótido en antisentido

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

inicia exón 47
UUA-CUG-GUG-GAA-GAG-UUG---
leu leu val glu glu leu

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

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

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

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

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

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