

Acercamientos de Investigación para una Terapia de Distrofia Muscular Duchenne.

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

Primera actualización, publicada el 3 de octubre de 2009.

Esta es mi primera actualización de mi informe sobre *omisión de exón*, originalmente publicado el 30 de abril de 2009. La omisión de exón es la más avanzada técnica genética para una terapia efectiva de la distrofia muscular Duchenne, y este es uno de mis varios informes, que yo, *Günter Scheuerbrandt*, un bioquímico de Alemania, escribo para usted, los niños y hombres jóvenes con Duchenne, sus familias y cuidadores, que desean saber de qué manera el trabajo de investigación de muchos científicos y médicos está progresando. Todos mis informes y éste también, no son publicaciones científicas con muchas palabras difíciles, porque he tratado de escribirlos de una manera que le permita entender lo que está sucediendo para usted en los laboratorios, incluso si no ha estudiado bioquímica y genética moderna.

Este texto sobre omisión de exón es la primera parte del informe completo sobre todos los métodos de investigación para una terapia de la distrofia muscular Duchenne. Las partes restantes serán publicadas durante los próximos meses. Ellas contendrán cada una de las últimas noticias sobre otros acercamientos terapéuticos, como la transferencia del gen de la distrofina en las células musculares, la utilización de células madre, aumento de la utrofina, y un número de métodos farmacológicos.

Cada uno de los nuevos informes será individualmente actualizado de vez en cuando con los nuevos resultados publicados y las noticias presentadas en reuniones científicas. Como no soy médico, mis informes sólo contienen información sobre la investigación terapéutica, pero no del tratamiento médico y el manejo de pacientes con distrofia Duchenne.

Comparado con la primera versión, este texto actualizado contiene resúmenes de los resultados de las pruebas clínicas locales Británicas y sistémicas Holandesas para omitir el exón 51, los resultados muy positivos del uso de oligos en antisentido con péptidos conjugados, la omisión de exón genética con el factor de empalme U1, los oligos en antisentido del tipo octa-guanidina, y algunas correcciones y adiciones en todo el texto.

He escrito este texto, como todos mis anteriores informes primero en Inglés y estoy traduciendo al alemán después. Esta versión en Español ha sido preparada por *Ricardo Rojas* en México que tiene distrofia Becker.

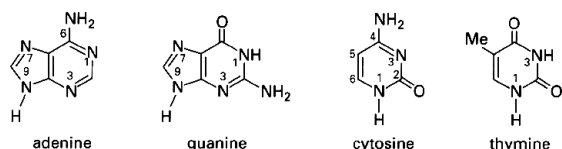
En los resúmenes, sólo menciono los nombres de los jefes de los laboratorios, aunque tienen colegas y estudiantes trabajando en equipo en los proyectos que presentamos, pero es imposible mencionarlos a todos. He escrito los nombres de los científicos sin sus títulos académicos, pero la mayoría de ellos son profesores y todos son médicos o tienen un doctorado.

Las referencias a algunas de las publicaciones más importantes se dan al final de este informe. Que se indican con números entre paréntesis, por ejemplo, (12), en los lugares en el texto al que pertenecen.

Si tiene alguna pregunta sobre la omisión de exón y otras investigaciones de Duchenne, por favor envíe un e-mail a mi dirección en Alemania gscheuerbrandt@t-online.de en inglés, francés, alemán o español. Voy a intentar responder a todas ellas, pero sólo en inglés o alemán.

Cómo los genes hacen proteínas

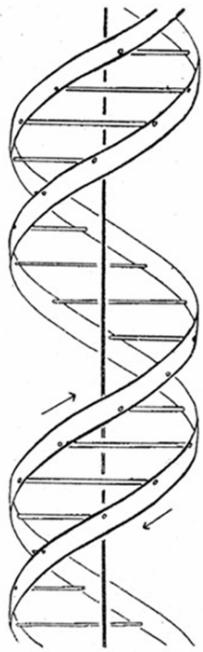
Los **genes** son unidades funcionales de material genético de **ácido desoxirribonucleico, ADN**. Su estructura parece una escalera de mano entrelazada, la *doble hélice*, que fue descrita en 1953 por *James Watson* y *Frances Crick* (vea siguiente página). Cada nivel de esta escalera de mano contiene dos de las cuatro diferentes pequeñas moléculas, las **bases**: *adenina*, *guanina*, *timina*, y *citosa* (A, G, T, C).



Podemos llamarlas las **letras genéticas**. Cada nivel sólo puede contener la combinación de dos bases, los **pares de bases** A-T y G-C. Esta es la estructura de las cuatro bases. Si, por ejemplo, GGCTTAATCGT es la secuencia de estas *bases* de una cadena del ADN, la secuencia en la cadena opuesta debe ser *complementaria* a esta. A es contraria a T y G contraria a C, porque entonces ellas sólo caben entre las cadenas:

—GGCTTAATCGT—
| | | | |
—CCGAATTAGCA—

Esta secuencia de bases, o de "letras genéticas", es la

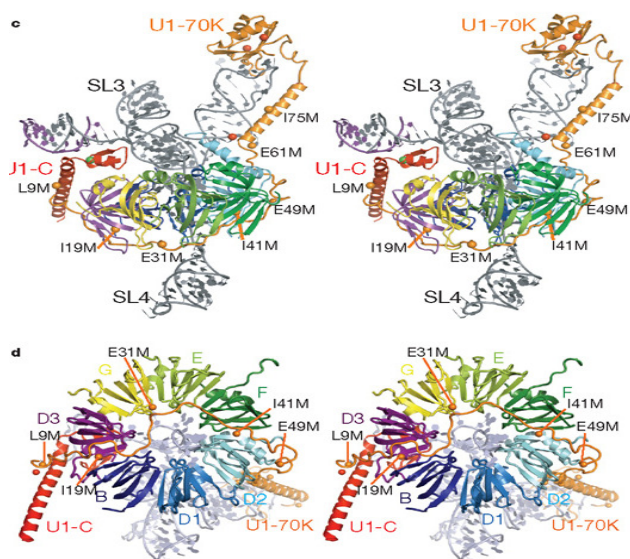


información genética para el desarrollo y mantenimiento de un organismo vivo, y se transmite de una generación a la siguiente. La mayoría de los genes llevan las instrucciones para la construcción de **proteínas**. En el núcleo de la célula, la instrucción genética de genes activos es **expresada**, es copiada, y **transcrita**, a otra sustancia genética, el **ácido ribonucleico mensajero prematuro** o ARNpre-m, algo también llamado la **transcripción**. La mayoría de los genes constan de regiones activas o codificantes, los **exones**, que contienen la información para la creación de las proteínas, y los a menudo más largos **intrones**, los cuales no contienen solo "basura genética", como una vez se pensó, si no importante información para el control de las actividades del gen. Los ácidos ribonucleicos, **ARNs**, usan la base U, uracilo, en lugar de la similar base T del ADN.

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

Este ARNm sale del núcleo y se traslada a los **ribosomas**, las estructuras sintetizadoras de proteínas, en el citoplasma fuera del núcleo. Los **Sitios de empalme** son secuencias específicas dentro de los exones y en los bordes de los exones e intrones que son esenciales para el retiro correcto de las secuencias sin codificación del intrón del ARNpre-m. El empalme es realizado por los **spliceosomas**, un complejo de muchas proteínas y pequeños ARNs.

Este ARNm sale del núcleo y se traslada a los **ribosomas**, las estructuras sintetizadoras de proteínas, en el citoplasma fuera del núcleo. Los **Sitios de empalme** son secuencias específicas dentro de los exones y en los bordes de los exones e intrones que son esenciales para el retiro correcto de las secuencias sin codificación del intrón del ARNpre-m. El empalme es realizado por los **spliceosomas**, un complejo de muchas proteínas y pequeños ARNs.



Para mostrar hasta qué punto ha avanzado la investigación científica para comprender la función de las células vivas, adjunto aquí imágenes estereó de una de las 5 estructuras que forman los spliceosomas en el tejido humano. La estructura molecular de este complejo, llamado **U1 snRNP**, pequeña ribonucleoproteína nuclear, fue publicada en Marzo de 2009 en la revista *Nature* (1). Este solo complejo U1 consta de 10 proteínas y un ARN. Usted puede ver la estructura tridimensional centrado su ojo izquierdo en la imagen de la izquierda y el ojo derecho en la imagen derecha, sin ningún instrumento. Así, verá 3 imágenes, una en el medio bastante espectacular en tres dimensiones. La línea naranja U1C-70 K es la más importante de las proteínas que reconoce los bordes exón-intrón y orquesta la reacción de empalme.

Estas ilustraciones son muy abstractas. En realidad, no hay colores y todo parece una gelatina gris. Menciono estos nuevos resultados de investigación no sólo para darle un ejemplo de cómo la ciencia moderna se presenta, si no también porque un complejo similar, un modificado ARNs U7 ahora está siendo utilizado para omisión de exón con transferencia de genes (véase página 11).

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

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

La mayoría de los aminoácidos tienen más de una palabra clave de ARN. No hay espacios entre los codones. Por lo tanto, la primera palabra clave de la secuencia que codifica para una proteína - es siempre AUG - define un **marco de lectura**. Si este marco cambia por una o dos letras, el código de las palabras cambia su significado, que entonces especifica diferentes aminoácidos. *Esto es muy importante para comprender cómo funciona la omisión de exón.*

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

Usted puede ver una película que muestra un gen haciendo ARN y el ribosoma ensamblando una proteína utilizando la información del ARN tan rápido como ocurre en la naturaleza en:

www.youtube.com/watch?v=D3fOXt4MrOM&feature=related - haga clic en esta dirección mas tecla Strg y haga clic en el botón a la derecha en el botón HQ para ver la película a pantalla completa. Si tiene altavoces, enciéndalos.

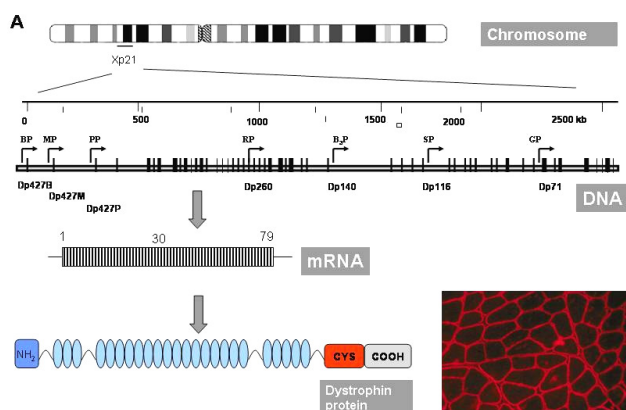
La velocidad de lectura de los ribosomas de la infor-

mación genética del ARNm y el ensamblaje de los aminoácidos en una cadena de proteína recientemente se ha medido (26). En promedio, se tarda 2.9 segundos para añadir uno más de los aminoácidos en la cadena en cre-

cimiento. Dado que la proteína distrofina consiste de 3,685 aminoácidos, toma alrededor de 3 horas para ensamblar toda la cadena de esta proteína muy larga.

El gen y la proteína distrofina.

La distrofia muscular Duchenne afecta sólo a los chicos – cerca de uno de cada 3,500 recién nacidos - porque las mujeres, cuando son portadoras genéticas, la heredan, en promedio, a la mitad de sus hijos. A veces, aparece espontáneamente en una nueva familia. *Esta aún incurable enfermedad hereditaria* es causada por mutaciones en el más grande de nuestros 20,488 genes, el **gen de la distrofina**. La siguiente ilustración muestra la ubicación del gen en el brazo corto del cromosoma X. Su ADN se compone de 2,220,223 letras genéticas, que se agrupan en **79 exones**, las secciones activas. También se indican los 7 promotores, las regiones que inician la producción de la versión de largo completo y 6 versiones más cortas de la proteína. Después del empalme, el ARNm contiene sólo 11,058 letras genéticas, sólo el 0,5% de aquellas del gen entero. En los ribosomas, la proteína **distrofina**, se arma de acuerdo con la información genética en el ARNm con 3685 aminoácidos que están siendo llevados al sitio de la síntesis por otro tipo de ARN, el de transferencia o ARNt.

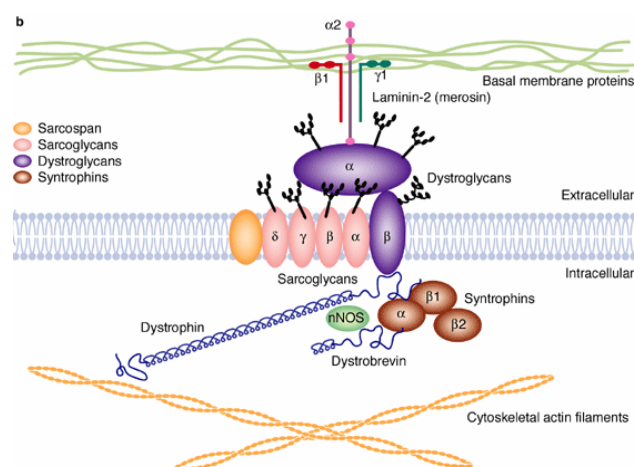


La proteína distrofina tiene una forma como de varilla con 24 secuencias de aminoácidos repetidas separadas por 4 regiones de bisagra. Sus dos extremos se llaman las regiones terminales N y C, y también existe una región con varias cisteínas, aminoácidos que contienen azufre. En la esquina derecha es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

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

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

El complejo distrofino-glicoproteico



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

Los chicos con Duchenne no tienen ninguna o muy poca distrofina en sus fibras musculares. Cuando sus efectos de protección y organización están faltantes, la contracción muscular provoca la ruptura de las membranas de los músculos, y esto permite relativamente que grandes cantidades de calcio fluyan hacia las fibras. El exceso de calcio activa enzimas como la *calpaina* y otras *proteasas* que descomponen las proteínas musculares e inicia programas

de muerte celular, apoptosis. Las consecuencias son una cadena de eventos como la inflamación y la activación de fibroblastos que conducen a la *fibrosis*, tejido cicatrizante que ralentiza la regeneración muscular y causa los típicos síntomas de los pacientes mayores de Duchenne.

Los chicos con la *distrofia muscular Becker* de progresión más lenta tienen una cantidad menor de lo normal de distrofina que también es a menudo más corta de lo normal. Todavía puede cumplir su función, pero no puede funcionar tan eficazmente como la versión normal.

Pero no sólo los músculos esqueléticos sufren cuan-

do la distrofina falta, sino también los músculos lisos y del corazón. Daño en los músculos del corazón produce *cardiomiopatía*, y la debilidad de los músculos lisos tiene muchas consecuencias, entre ellas la disminución de la capacidad de los vasos sanguíneos a relajarse, cuando aumenta el flujo sanguíneo, dando lugar a problemas respiratorios y otros, también el tracto gastrointestinal se ve afectado cuando la motilidad del intestino se reduce. Por lo tanto, el daño de un solo gen puede afectar a grandes partes del cuerpo.

Omisión de exón

La tarea de la investigación. Un chico sano de 5 años de edad de un peso de 30 kg tiene cerca de 12 kg de músculos que contienen 1.5 cuatrillones (1.5×10^{15}) de moléculas de distrofina. Un chico de 5 años de edad con Duchenne sólo tiene 6 kg músculos que prácticamente no contienen ninguna distrofina, debido a que la información de los genes dañados no se puede leer correctamente durante la biosíntesis de la proteína. Con el fin de hacer que sus músculos funcionen de nuevo, al menos hasta cierto punto, alrededor del 30% de la cantidad normal de distrofina debe reaparecer y estar presente durante toda su vida (2), esto sería 200 billones (200×10^{12}) de moléculas en sus 6 kg de músculos. Las nuevas distrofinas no tienen que tener exactamente la misma longitud y forma de las normales en el músculo, pueden ser más cortas, pero deben ser capaces de funcionar correctamente.

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

Pruebas clínicas locales y sistémicas - en un solo músculo o en todos ellos - para omitir el exón 51 del ARNpre-m en niños con Duchenne han sido y se están realizando con la ayuda y la financiación parcial de la compañía holandesa *Prosenza* en Leuven, y Gotemburgo, y por la empresa norteamericana *AVI BioPharma* en Londres y New-castle bajo la dirección del Consorcio MDEX. Además de van Ommen, los equipos en torno a *Judith van Deutekom* y *Annemieke Aartsma-Rus* en Holanda y en torno a *Kate Bushby* y *Francesco Muntoni* en el Reino Unido deben mencionarse aquí también.

La omisión de exón significa "saltar a través de los exones". Los exones son las secciones activas de un gen. En el gen de la distrofina de la mayoría de los niños de Duchenne, uno o varios exones faltan, o están duplicados o tienen errores en la secuencia de sus letras. Esto interrumpe el proceso de lectura de la información genética para la

biosíntesis de la proteína distrofina de modo que no puede ser hecha. Estos errores se pueden corregir, es decir, *la síntesis de la proteína puede ser restaurada* de nuevo, si uno bloquea uno o más de los exones vecinos presentes en tal manera que el mecanismo que une los exones los omite o los salte y, por tanto, no los utilice nunca más (3).

Para este bloqueo, **oligonucleótidos en antisentido**, AOs, son necesarios. Son piezas cortas de material genético, alrededor de 20 a 30 letras genéticas de extensión en una secuencia especial, a fin de que puedan adherirse exactamente a las secuencias complementarias del exón a ser omitido. AOs ya se han realizado, principalmente por *Steve Wilton* en Perth en Australia para todos los 79 exones (4) y por *Annemieke Aartsma-Rus* en Leiden en Holanda, para 39 exones, cada uno con una estructura que bloquea sólo el exón objetivo pero ni un solo otro en los muchos miles de otros genes humanos.

Duchenne se convierte en distrofia Becker. Debido a la falta de exones - aquellos delecionados por la mutación y aquellos omitidos adicionalmente -, los bloques de construcción, los aminoácidos, determinados por esos exones faltantes también faltarán en la nueva distrofina creada. Así, la nueva distrofina será más corta de lo normal, pero a menudo todavía será capaz de proteger en cierta medida las membranas celulares del músculo. Por lo tanto, los síntomas de la enfermedad serán más leves, la degeneración muscular procederá más lentamente, y la expectativa de vida debería aumentar considerablemente a lo normal en algunos casos. La distrofia Duchenne entonces será cambiada a la variante leve de esta enfermedad, la **distrofia muscular Becker**.

Una terapia, pero todavía no una cura. Como los pacientes seguirán teniendo una discapacidad después del tratamiento, sin embargo mucho menor que antes, la omisión de exón *no es una cura* de la enfermedad, sólo *una terapia eficaz*. Con este método de tecnología genética, el gen en sí mismo dañado no será reemplazado ni reparado, sólo el mecanismo de lectura de su información será corregido.

Los experimentos con animales. La omisión de exón ha sido probada con éxito en ratones y perros distróficos, a nivel *local* por la inyección de los AOs en un solo músculo, o *sistémico* en la circulación sanguínea de modo que llegue a todos los músculos, también aquellos del corazón y la

función pulmonar. En la mayoría de los experimentos sistémicos, la función muscular puede ser mejorada significativamente. Uno de los más importantes de estos experimentos sistémicos pre-clínicos con inyecciones de AOs en la circulación sanguínea de ratones mdx distróficos se publicó por **Terence Partridge** y colegas en 2005 (5).

Las mutaciones del gen de la distrofina. Hay muchos informes en la literatura científica acerca de los porcentajes de los diferentes tipos de mutaciones de la distrofina entre todos los pacientes con Duchenne. La publicación por **Annemieke Aartsma-Rus** y colegas en 2006 (6) se basa en las más de 4700 mutaciones que figuran en la base de datos de distrofia muscular Duchenne de Leiden y, por tanto, parece ser la más fiable. Según esta publicación, las **deleciones** (falta) de uno o varios exones constituyen el **72%** de todas las mutaciones. Las **duplicaciones** de uno o varios exones se encuentran en el **7%** de todos los pacientes. **20%** tienen **mutaciones puntuales**, es decir, muy pequeñas deleciones o inserciones de una o varias letras genéticas, y en el **1%** restante, varias **mutaciones raras** como las que perturban los sitios de empalme o reordenan gran parte de la estructura del gen.

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

Aplicabilidad de la omisión de exón. Aunque todos los pacientes con Duchenne tienen más o menos similares síntomas clínicos, hay muchas diferentes causas de su enfermedad, porque las mutaciones del muy grande gen de la distrofina pueden ocurrir en muchos sitios diferentes. Por lo tanto, la omisión de exón **es específica de la mutación**. Esta será **una terapia personalizada**. Cada paciente tendrá un AO especializado, pero cada AO puede a menudo ser usado para un grupo de pacientes con diferentes mutaciones que necesitan omitírsele uno o más exones en particular.

Annemieke Aartsma-Rus y sus colegas han reportado la aplicabilidad para omitir uno o dos exones en pacientes con Duchenne con deleciones, mutaciones puntuales y duplicaciones en las páginas de Distrofia Muscular Duchenne de Leiden del 11 de marzo de 2008. Analizaron los datos genéticos y clínicos de 4,770 pacientes, y 120 grupos enlistados de pacientes necesitan la omisión de uno o dos exones particulares de acuerdo a su porcentaje relativo a pacientes con Duchenne con todo tipo de mutaciones. Aquí hay una lista de los porcentajes de los 8 grupos más importantes:

Posicion	Exon a ser omitido	% de todos los pacientes
1	51	13.0
2	45	8.1
3	53	7.7
4	44	6.2
5	46	4.3
6	52	4.1
7	50	4.0
8	43	3.8
1 – 8		51.2%

La lista completa ha sido publicada en Marzo de 2009 (7). Si a usted le gustaría tener esta publicación, favor de escribirme a mí.

Como se muestra en esta breve lista, el 13,0% de todos los pacientes necesita la omisión de su exón 51, por lo tanto el AO anti exón 51 es el fármaco potencial de omisión para el grupo más grande de todos los pacientes con Duchenne. Por esta razón, los científicos holandeses y británicos, tratan de omitir este exón en particular en sus primeros ensayos clínicos para ayudar a este grupo de pacientes lo antes posible. Y la compañía holandesa Prosensa está desarrollando la omisión de los exones en los grupos 2 - 8, siempre que las pruebas contra el exón-51 tengan éxito. Con los AOs en contra los exones de esta lista de prioridades, más de la mitad de todos los pacientes de Duchenne podría ser tratada.

Doble y multi omisión de exón. Muchas de las distrofias Duchenne causadas por deleciones, duplicaciones, y mutaciones puntuales necesitaran la omisión de dos o más exones para restaurar el marco de lectura.

Por consideraciones teóricas se prevé incluso que la omisión simultánea de los 11 exones del 45 a 55 produce una distrofia Becker con síntomas muy leves en un máximo de 63% de todos los niños con Duchenne (8).

Annemieke Aartsma-Rus y su equipo han tratado de remover en cultivo de células estos 11 exones en mioblastos obtenidos de una persona sana y de dos pacientes de Duchenne con deleciones de los exones 48-50 y 46-50. Cócteles de AOs 2'O-metilos humanos, en contra de la secuencia de cada uno de los 11 exones, fueron utilizados en diferentes combinaciones incluyendo una mezcla de todos los 11 AOs. Diferentes ARNm's intermedios parcialmente omitidos se obtuvieron en niveles bajos y ocasionalmente también ARNm con todos los exones objetivo eliminados. Procesos irregulares de empalme de bordes de exones más cortos con intrones muy largos puede haber sido la razón de las dificultades para saltar los 11 exones objetivos en una forma consecutiva.

Los autores concluyen que este acercamiento es teóricamente prometedor para la producción de una distrofia Becker muy leve, pero que el estado actual de esta técnica no es suficiente apoyar el desarrollo clínico de la omisión múltiple de los exones 45-55 (9).

Ya que los perros distróficos necesitan la omisión simultánea de dos exones, los experimentos con ellos abriría el camino para el desarrollo de múltiple omisión de exón para los chicos con Duchenne. Los resultados de la prime-

ra omisión exitosa de 3 exones en perros se han publicado en marzo de 2009 (10) y se resumen aquí. Ellos crearon un gran interés y atención por parte de padres y pacientes. Sin embargo, sólo significa que la omisión de 2 o 3 exones o un poco más será posible, pero omitir los 11 exones 45-55 no será posible por el momento, como se explicó antes.

Multi-omisión de exón en perros distróficos. *Eric Hoffman* y *Terence Partridge* del Centro Médico Nacional Infantil en Washington, *Shin'ichi Takeda* de la Facultad General de Investigación Animal en Tokio, y sus colegas desarrollaron un cóctel de oligos en antisentido (AO) morfolinos para multi-omisión de exón en perros beagles distróficos CXMD (10). En contraste con los ratones mdx con sus suaves síntomas distróficos, estos perros son discapacitados físicos y mucho más grandes que los ratones. Por lo tanto los experimentos con ellos darán resultados que puedan ser similares a los obtenidos en estudios clínicos con niños con Duchenne. Y experimentos de varios años de duración se pueden realizar con los perros, porque viven mucho más tiempo que los ratones.

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

Antes que los experimentos con perros vivos pudieran iniciarse, pruebas preliminares en cultivos de tejidos con mioblastos aislados de estos perros eran necesarias. Cuatro AOs con secuencia de 24 y 25 bases se construyeron contra las secuencias dentro de los exones 6 y 8 y en contra de los bordes del exón 6 e intrón 6 y del exón 8 e intrón 8. Tenían que ser AOs 2'O-metilos que están cargados eléctricamente y entran en las células de cultivo de tejidos en las pruebas de manera más eficiente que los morfolinos, eléctricamente neutros. Estos AOs se utilizan solos o como un cóctel de una mezcla de todos los cuatro.

Los resultados de los experimentos con el cóctel mostraron, que cuatro días después los mioblastos habían producido miotubos - otra etapa de desarrollo muscular -, la secuencia de ARNm unió el final del exón 5 directamente al inicio del exón 10. Esto significa que, además de suprimirse el exón 7 y se omitieron los exones 6 y 8, el exón 9 se omitió también aunque no se utilizó un AO en contra de este exón. Todavía no se entiende por qué sucede esto. Pero omitir el exón 9 por sí solo no cambia el marco de lectura, de modo que esta omisión adicional no afecta el resultado terapéutico de este tipo de multi-omisión de exón. La producción de distrofina en estos miotubos aislados también pudo ser confirmada. En los experimentos con AOs solos, se demostró que uno contra la frontera del exón 8 e intrón 9 no afectará la omisión esperada, por lo que en los experimentos con perros vivos, el cóctel contenía sólo tres AOs, designados como Ex6A, Ex6B, y EX8A.

El siguiente paso fue la inyección de 0.5 y 1.2 mg de los tres cócteles de AO, que contienen cantidades iguales de cada AO, a nivel local en un solo músculo tibialis anterior (espinilla) de perros vivos de 6 meses de edad y 5 años de edad. Esta vez, ambos tipos de AOs se utilizaron, 2'O-metilos y morfolinos. Dos semanas más tarde, tejido de alrededor de los lugares de la inyección se obtuvo por biop-

sia. Entre 61 y 83% del ARNm en las fibras musculares alrededor del sitio de la inyección tenía faltante la secuencia de los exones 6, 7, 8 y 9. Con la dosis de 1.2 mg de morfolinos, prácticamente un nivel normal de la proteína distrofina nueva fue visto, y los resultados con el cóctel 2'O-metilo fueron similares. La estructura de las células positivas de distrofina fue significativamente mejorada, y los resultados con los perros jóvenes fueron mejores que con los viejos.

Por lo tanto, la calidad del músculo influye en la cantidad de distrofina que se puede producir, una vez más es un indicio de que la omisión de exón, una vez que esté disponible, debe iniciarse tan pronto como sea posible. También señaló que, mientras que en el cultivo de tejidos un solo AO contra el exón 6 podría dar lugar a omisión eficaz de los exones 6-9, esto no sucedió cuando el mismo morfolino único fue inyectado en los músculos del perro, donde el cóctel completo es requerido. Esto significa que no se puede necesariamente confiar en los cultivos de tejidos como medio de la detección de la eficacia de un determinado AO para inducir la omisión.

Para un tratamiento sistémico, realizado en la Facultad de Investigación Animal de *Shin'ichi Takeda* en Tokio, tres perros de 2 meses de edad fueron tratados mediante la inyección del cóctel de tres AO morfolinos en sus venas de la pata. El primer perro recibió una dosis de 120 mg/kg una vez a la semana durante 5 semanas, el segundo la misma dosis cada dos semanas 11 veces por 5.5 meses y el tercero 200 mg/kg una vez a la semana por 7 semanas. Dos semanas después de la última inyección, muchos de los músculos fueron examinados.

En todos los músculos probados de cada perro tratado, nueva distrofina fue encontrada en hasta un 50% del nivel normal, pero en algunos músculos, especialmente en las fibras musculares del corazón, sólo había trazas de nueva distrofina. Los músculos de los perros que recibieron la mayor dosis del cóctel mostraron un nivel promedio de 26% de la cantidad normal de distrofina, que, sobre la base de las conclusiones anteriores, es suficiente para la función muscular normal. En la nueva distrofina faltaban los aminoácidos que están codificados por la secuencia del ARNm de los exones 6, 7, 8 y 9. Esto demuestra que, además de la falta del exón 7, los dos exones objetivos 6 y 8 fueron omitidos, y también, por razones desconocidas, el exón 9.

Sobre la base de varias pruebas de función muscular, el estado físico de los perros se estabilizó en el mismo nivel que antes de iniciado el tratamiento, mientras que los perros no tratados degeneraron considerablemente durante este tiempo. Por lo tanto, el tratamiento sistémico parecía *haber detenido su degeneración muscular*. Se realizaron pruebas de resonancia magnética nuclear (RMN) para analizar la estructura de los músculos. Esta técnica no invasiva ha demostrado ser tan informativa como pruebas en el tejido muscular de biopsias. Esto será importante para los ensayos clínicos con niños con Duchenne porque entonces mucho menos biopsias serían necesarias para seguir el cambio de la estructura muscular durante los tratamientos.

Por lo tanto, los AOs morfolinos trabajaron bien en mamíferos grandes con estructura corporal similar a la de los seres humanos. No son tóxicos, y no causan rechazo inmunológico. Sin embargo, tendrán que ser aplicados en varias ocasiones, porque su efecto no es permanente, pero

esto permitiría interrumpir el tratamiento si se producen problemas. Y que sólo son eficaces en los tejidos como el músculo, donde el gen de la distrofina es transcrito en ARNpre-m.

Usted puede ver uno de los perros en dos cortos antes y después del tratamiento en una de mis páginas de internet: <http://www.duchenne-information.eu/home-en.htm>. Si usted no entiende lo que la gente dice, que cuidan a los perros, entonces usted no habla japonés.

Omisión de exón para reparar duplicaciones. Duplicaciones de uno o varios exones causan un desplazamiento del marco de lectura y ocurren en alrededor del 7% de todos los pacientes con Duchenne. En principio, pueden ser reparadas por la omisión de exón, además, si fuera posible eliminar un conjunto adicional de exones duplicados sin tocar el primero, el original conjunto de exones. Tal tratamiento de omisión de exón no sólo será una terapia, sino una *verdadera cura*, porque, después de la eliminación de los exones adicional, el ARNm tendría su estructura normal con todos los exones presentes sólo una vez, y la nueva proteína distrofina tendría el tamaño normal.

Pero la situación no es sencilla, principalmente porque no es fácil dirigir un AO sólo a una de las dos secuencias idénticas de exón. **Annemieke Aartsma-Rus** y sus colegas han hecho experimentos de laboratorio en cultivos de células musculares de pacientes con Duchenne con duplicaciones (11).

Ellos fueron capaces de corregir una duplicación del exón-45 por la omisión de uno de los dos exones, y hasta el 80% de las fibras musculares contenían distrofina normal dos días después de este tratamiento in vitro. Por otro lado, fue imposible remover sólo uno de los dos exones 44 en fibras musculares aisladas de dos hermanos con Duchenne. Sin embargo, en este caso, al omitir los dos exones 44 y además del exón 43 se restablecería el marco de lectura. El intento de corregir la duplicación grande de los exones 52-62 no tuvo éxito.

A la petición de una familia cuyo hijo tenía los exones 8-11 duplicados, Annemieke responde para explicar las dificultades: "Nosotros necesitamos una combinación, un cóctel de AOs dirigidos a los cuatro exones 8-11. Pero estos AOs no pueden discriminar entre los originales y los exones duplicados. Por lo tanto, el resultado será omitir el exón 8 original, el exón 8 duplicado o ambos exones 8. O puede omitirse el exón 9 original, el exón 9 duplicado o ambos, o una combinación de los exones 8 y 9, y así sucesivamente. Por lo tanto, existen muchas posibilidades sólo una de las cuales – omitiendo los exones 8, 9, 10 y 11 duplicados, pero *no* los exones 8, 9, 10 y 11 originales – restaurando el marco de lectura. El efecto se diluye. Simplemente aumentando la cantidad de los AOs en el cóctel no va a cambiar la situación. Estamos tratando de encontrar soluciones para estos problemas, pero las cosas no son tan sencillas como con las deleciones. No sabemos si, y en caso afirmativo, cuándo la omisión de exón será aplicable para grandes duplicaciones".

Omisión de exón para reparar mutaciones puntuales.

Mutaciones puntuales son pequeños cambios de una o varias letras genéticas en el gen mismo. Si la mutación ha añadido o eliminado una sola letra, entonces el marco de

lectura se desplaza. O una letra ha sido intercambiada en contra de otra, entonces el marco de lectura no se desplaza, pero el código de palabras ahora puede significar otro aminoácido. Si este cambio no perturba la estructura de la distrofina, entonces no pasa nada. Pero si uno de los tres codones parada, TGA, TAG, o TAA, ha aparecido, entonces – a pesar que el marco de lectura no está desplazado – la síntesis de proteínas se detiene en tal **señal de parada prematura**, y el resultado es distrofia Duchenne. Puede ser posible en el futuro que tal mutación de parada se pueda superar con el fármaco *PTC124* que ya está en ensayos clínicos. O puede ser reparado por la omisión del exón que contiene el codón de parada si el exón tiene la correcta frontera de modo que su supresión no cambie el marco de lectura. O, si esto causa un cambio de marco, un exón vecino tendría que ser omitido además (12).

Omisión de exón para reparar mutaciones raras. Incluso los marcos de lectura alterados causado por mutaciones raras en las regiones fronterizas entre un exón y un intrón un vecino, los llamados sitios de empalme, podrían ser restaurados por la omisión de exón. A modo de ejemplo, cito una vez más a **Annemieke Aartsma-Rus** explicando cómo un cambio de la base A por T a principios del *intrón* 46 causa síntomas moderados de Duchenne en Tomas, un paciente de Argentina:

"Esta mutación probablemente da lugar a una parcial o completa omisión espontánea del exón 46 en el ARNm, que no puede ser vista a nivel del ADN por una prueba genética. Este sitio de empalme es normalmente bastante activo para este exón, pero debido a esta mutación, es muy grave la inactivación de este sitio. Me puedo imaginar que el exón 46, se omite en el ARNm de esta paciente. Esto, sin embargo, es una predicción y no podemos saber con seguridad que tanto y cuánto del exón 46 es omitido hasta que el ARNm del músculo se analice. En caso de que la omisión del exón 46 no es completa, Tomás tendrá bajos niveles de distrofina, y esto puede ser la razón de su leve forma de Duchenne. Si un análisis de ARNm muestra que el exón 46 está ausente, que significa un cambio del marco de lectura, entonces la omisión del exón 45 podría restaurarlo".

¿La omisión de exón será una terapia para mi hijo?

Muchas familias Duchenne de todo el mundo me están preguntando esta cuestión. Para responder a ella: debido a que la omisión de exón es una técnica específica a la mutación, primero tiene que saberse exactamente la mutación en el gen de la distrofina de su niño afectado, que puede ser determinada mejor en un moderno laboratorio de genética con el método MLPA (ligado múltiple dependiente de sonda de amplificación), que analiza todos los 79 exones en niños con Duchenne y sus madres y otras mujeres de la familia.

Con la mutación conocida - deleción, duplicación o mutación puntual - usted puede examinar la secuencia genética de las 13,990 bases o letras genéticas de la combinación de los 79 exones del ARNm de la distrofina. Usted puede ver y descargar esta secuencia de las Páginas de Distrofia Muscular de Leiden en Internet: www.dmd.nl/seqs/murefDMD.html. De esta secuencia se puede determinar si una mutación en particular cambia o

mantiene el marco de lectura después de la mutación, por lo tanto, si esta información genética predice una distrofia Duchenne o Becker para su hijo.

Al mirar en la frontera de las secuencias de los exones, también puede determinar que exón o exones deben ser omitidos para que el marco de lectura fuera del marco vuelva de nuevo al marco. En la última página de este informe, estoy mostrando los detalles moleculares de la omisión del exón 51 para restaurar el marco de lectura movido causado por la delección del exón 50. De manera similar, usted puede determinar que exón de su hijo necesita ser omitido.

Pero tiene que tener experiencia para ello, a fin de facilitar esta tarea, **Annemieke Aartsma-Rus** ha incluido en su tesis doctoral varias listas de las cuales se puede leer directamente que exón o exones deben ser omitidos cuando usted sabe los detalles de la mutación de su hijo. Estas listas pueden ser vistas en internet:

Deleciones: www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20deletions.pdf

Duplicaciones: www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20duplications.pdf

Mutaciones puntuales: www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/Table%20point%20mutations.pdf

Aquí está una selección de 10 entradas en la lista de deleciones:

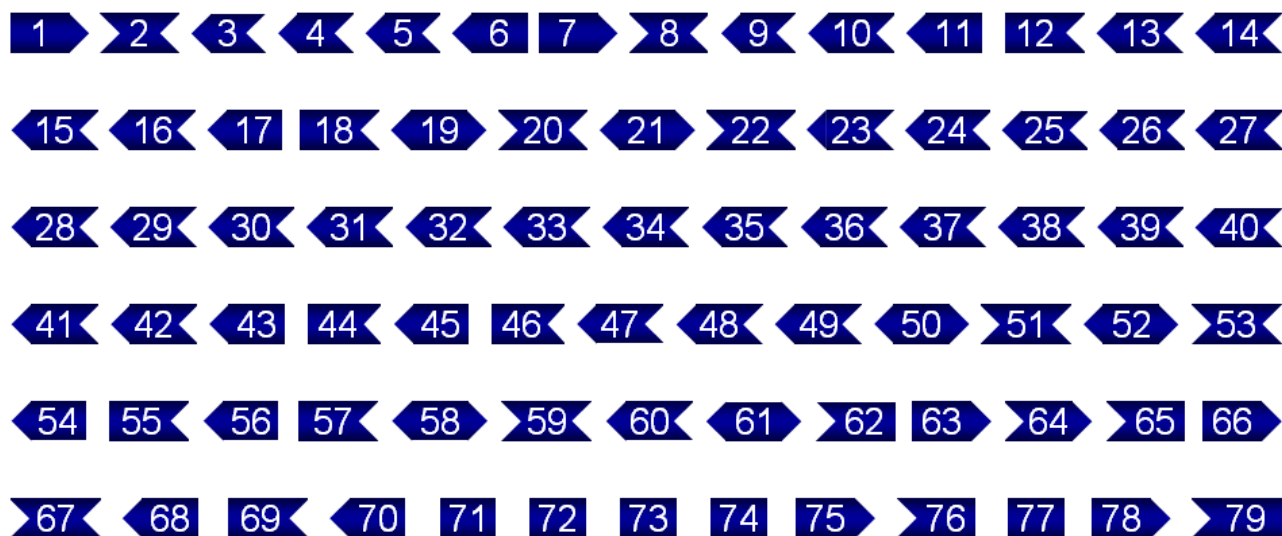
Exones delecionados	Exón(es) a omitir
40 – 43	44
43 – 45	46
43 – 50	51
43 – 52	53
44	43 or 45
44 – 50	43+51
46 – 47	45
46 – 52	45+53 or 53+54
48 – 50	51
51 – 53	50

Hay otra manera más fácil de encontrar el exón o exones a ser omitidos si se conoce la mutación del gen de la distrofina - delección, duplicación o de parada prematura. El arreglo de los 79 exones puede verse en la siguiente imagen que he copiado de una diapositiva de Annemieke que mostró en la reunión anual del 2009 del PPMD en Atlanta.

Si en esta representación la conexión entre dos exones apunta a la izquierda, la frontera de los dos exones está entre palabras codificadas enteras, si apunta a la derecha, la frontera está entre la primera y la segunda letra de una palabra codificada, y si es vertical, la frontera está entre la segunda y la tercera letra del codón.

Para encontrar el exón a omitir, tache el exón o exones delecionados y vea si el exón antes o después de la delección debe ser retirado, que sea omitido, de modo que los exones restantes encajen entre sí en una de las tres formas "naturales". Por ejemplo, la delección de los 8 exones del 45 al 52 significa que los dos exones 44 y 53, flanqueando la delección, no caben juntos. Pero la omisión del exón 53 producirá un ajuste normal entre el final del exón 44 y del inicio del exón 54. También verá de inmediato que la delección de los exones del 44 al 50 pueda ser reparada si se omiten ambos exones 43 y 51, de forma que los exones 42 y 52 se ajusten entre sí. También se dará cuenta de que una delección, por ejemplo, del exón 44, que produce el no ajuste de las fronteras del exón, significa que un marco de lectura desplazado conduce Duchenne, mientras que una delección, por ejemplo, del exón 48 al 51, produce que los exones se ajusten y no cambie el marco de lectura, y que debe significar distrofia Becker. Este procedimiento funciona también para las duplicaciones y los codones de parada prematuros.

Annemieke ha explicado cómo la omisión de exón y el PTC124 funciona para mutaciones diferentes en su página web: www.humgen.nl/lab-aartsma-rus/index%20for%20parents.



Es muy interesante saber que el gen de la distrofina tiene *puntos calientes* de mutaciones: el 50% de todas las

mutaciones involucra deleciones de uno o más exones entre el 45 y 53 y 20% entre los exones 2 y 20.

Si con estas listas y explicaciones ha encontrado que exón o exones tienen que omitirse en el ARNm de la distrofina de un chico con Duchenne, es importante entender que esto *no garantiza* que los severos síntomas de Duchenne cambian a síntomas más leves de distrofia Becker, si él fuera tratado con su fármaco de omisión de exón "personal" como se muestra. Todo lo que puedo decir es que una determinada omisión cambiará el marco de lectura del mensaje genético en el ARNm de fuera del marco al marco de nuevo. No dice que los mensajes genéticos dentro del marco de lectura producirán una distrofina "Becker" en todos los casos, porque la regla de lectura del marco tiene muchas excepciones, como se ha explicado en las recientes publicaciones de **Terence Partridge (13)** y **Eric Hoffman (14)**.

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

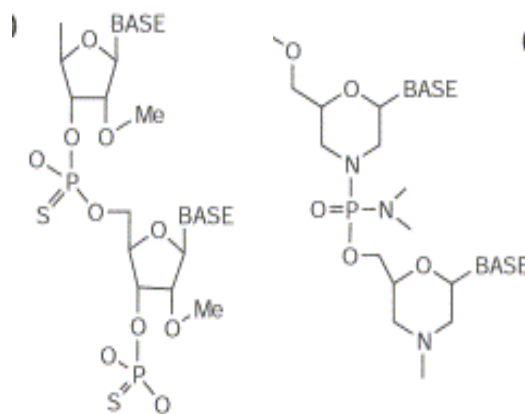
Por lo tanto, una terapia de omisión de exón en muchos casos produce una proteína que reduce los síntomas distróficos, pero *puede haber sorpresas* que sólo se manifiestan durante un tratamiento actual.

Diferentes tipos de fármacos potenciales de omisión de exón. Los AOs utilizados por los investigadores holandeses primero fueron abreviados como AONs, porque eran oligonucleótidos protegidos. Pero los morfolidos son similares, pero no eran realmente nucleótidos, por lo que la abreviatura de AO para *oligo en antisentido* ahora se utiliza en general para todos los compuestos en antisentido, también en este informe.

Para la experimentación con animales y los primeros ensayos clínicos, dos tipos de AOs protegidos químicamente se utilizan. Tienen que ser protegidos porque son lentamente destruidos en las células musculares por enzimas nucleicas destructoras.

Los científicos Holandeses están utilizando **2'O-metil-fosforo-tioatos**, también llamados *metil tioatos* o *2'O-metilos*. Ellos tienen un grupo metilo, un carbono con tres átomos de hidrógeno, en el oxígeno del segundo carbono de las unidades de ribosa y un átomo de azufre en lugar de uno de los átomos de oxígeno de los grupos de fosfato. Los **morfolidos** que los investigadores británicos han utilizando tienen uno de los oxígenos del fosfato reemplazado por un grupo dimetil amido, un nitrógeno con dos grupos metilo, y las unidades de ribosa enteras son reemplazadas por anillos morfolidos, anillos de seis miembros, cada uno compuesto de 4 átomos de carbono, 1 de oxígeno y 1 de

nitrógeno con átomos de hidrogeno unidos a los carbonos en las esquinas de las estructuras.



AO 2'O-metilo

AO morfolino

Estoy mostrando aquí la estructura química de estos dos tipos de AOs con sólo dos de sus letras genéticas indicadas. El AO 2'O-metilo utilizados en las pruebas Holandesas, llamado **PRO051**, tiene 20 letras genéticas con la secuencia:

UCUUUACGGUAGAAGGAACU

El AO morfolino utilizado en las pruebas británicas, llamado **AVI-4658**, tiene 30 letras, que incluyen las 20 letras del AO holandés (subrayadas).

GAUCUUUACGGUAGAAGGAACUACAACCUC

Ambos de estos AOs se unen ellos mismos a la secuencia potenciadora-empalmante-exonica, ESE en sus siglas en inglés, porque sus secuencias son complementarias a la secuencia ESE (y sus alrededores) en el exón 51. Esta secuencia es importante para el normal proceso de empalme, para la inclusión de este exón en el ARNm de la distrofina. Si ésta se encuentra bloqueada por el AO, el exón se omite, es *excluido* del ARNm.

Las moléculas de estos AOs tienen estructuras químicas bastante grandes y complicadas. El PRO051 2'O-metilo, por ejemplo, consta de 699 átomos y el AVI-4658 morfolido de más de mil. Esto muestra que estos fármacos potenciales para nuestros niños con Duchenne son muy diferentes de los fármacos "normales", también son difíciles de hacer y serán costosos.

Los investigadores holandeses recientemente han comparado los AOs 2'O-metilos con los morfolidos para omitir el exón 23 en ratones vivos **(15)**. Después de inyecciones locales y sistémicas de los AOs, encontraron que hay diferencias de eficacia, tal como describí anteriormente, cuando los ratones mdx fueron tratados. Sin embargo, estas diferencias fueron menos pronunciados o incluso inexistentes, cuando AOs contra *exones humanos* fueron inyectados en ratones hDMD que tenían genes de distrofina humana normal. Lo que uno puede aprender de estos estudios preliminares es, que posiblemente algunos exones se omitirán de manera más eficiente con morfolidos, otros con 2'O-metilos y para algunos ambos pueden ser igual-

mente eficaces. Sin embargo, estos estudios con animales son sólo una indicación de lo que puede suceder en los pacientes humanos.



Annemieke Aartsma-Rus PhD
Universidad de Leiden

muchos e-mails los unos a los otros, ella me ha ayudado cada vez que necesitaba ayuda, y siempre muy rápido en pocas horas. ¡Mi especial agradecimiento a ella!.

Tres nuevos tipos de AOs. Tres tipos más de AOs – uno con una cola de una cadena corta de aminoácidos, un péptido, el segundo con una proteína como espina dorsal, y el tercero con una estructura ramificada - se han desarrollado porque pueden ser más eficaces que los dos primeros que ahora están siendo probados en los pacientes de Duchenne:

Omisión de exón con péptido conjugado con ácidos nucleicos. Uno de los problemas de los AOs morfolinos es que tienen dificultades para ingresar en todos los tipos de músculos, especialmente el corazón. Para superar este problema, **Matthew Wood** y sus colegas de la Universidad de Oxford, en colaboración con **AVI BioPharma** en Portland/Oregon modifico el AO morfolino (PMO) para omitir el exón 23 en ratones mdx, uniendo cortas cadenas de aminoácido, péptidos, a la estructura en antisentido.

Después de experimentar con distintas combinaciones de péptidos, los investigadores desarrollaron un *péptido conjugado PMO* con dos péptidos adyacentes unidos al AO morfolino habitual de 25 unidades de bases contra el exón 23 del ratón. El ratón mdx tiene un codón de parada prematuro en su exón 23 que es la razón de la ausencia de distrofina en sus músculos. Omitiendo este exón se restaura la producción de distrofina.

El primer péptido unido es el *péptido-B*, previamente desarrollado por AVI Biopharma, que ayuda a los AOs a cruzar las membranas celulares. El segundo péptido es el *péptido específico de músculo MSP*, el cual fue diseñado para llevar al AO específicamente al tejido muscular. El péptido-B consta de 14 aminoácidos y el MSP de 7, y ellos se unen en una sola cadena de péptidos. Creo que estará interesado en ver el total de 47 componentes de la estructura de este fármaco de omisión de exón para los ratones

Usted debe conocer a algunos de los científicos que están trabajando para nuestros hijos. En este punto, creo, es el momento de mostrarle fotografías de algunos de nuestros científicos que, junto con sus compañeros de trabajo, están comprometidos en la búsqueda del tratamiento de omisión de exón, y cuya labor aquí estoy reportando. La fotografía de Annemieke es la primera, que ha visto cómo a menudo la he mencionado. Hemos escrito

distróficos, escrito en las abreviaturas utilizadas por los científicos.

RXRRBRRXRRBRXB - ASSLNIA-X -
GCCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT

Tres inyecciones semanales sistémica de 6 mg/kg de este AO optimizado en los ratones mdx restaura ampliamente un alto nivel de expresión de distrofina en musculo esquelético, así como cardíaco, la reaparición del complejo de proteínas asociado a la distrofina a en las membranas de las células musculares, la normalización de la actividad de CK, y una mejora significativa de la función muscular (16).

Justo antes de actualizar este informe, **Auréli Goyenvalle** me informó que ella y su equipo en el laboratorio de **Kay Davies** en Oxford han utilizado este tipo de AO morfolino péptido-conjugado para el tratamiento de ratones con distrofia muy severa, que no sólo tenían faltante la distrofina, sino también la similar proteína utrofina porque su gen de la utrofina había sido genéticamente destruido. En contraste con los ratones mdx "normales", estos ratones con doble inactivación tienen síntomas similares a Duchenne. El tratamiento con el AO péptido conjugado indujo un nivel cercano al normal de expresión de distrofina en todos los músculos esqueléticos examinados, resultando en una mejora considerable de su función y patología muscular distrófica. El promedio de vida de estos ratones muy distróficos suele ser alrededor de 8-9 semanas de edad. Los ratones tratados con los AOs morfolinos conjugados siguen vivos después de 7 meses y con un aspecto muy saludable. Después de un tratamiento inicial con 6 inyecciones semanales, fueron solo re-inyectados una vez al mes (26).

AVI Biopharma ha desarrollado este tipo de AO con péptido conjugado contra el exón 50 humano, llamado AVI-5038, en preparación de estudios clínicos en los Estados Unidos.

Omisión de exón con ácidos nucleicos péptidos. Otro grupo de AOs, los *ácidos nucleicos péptidos*, PNAs, también están siendo investigados por sus propiedades de omisión de exón. En lugar de la espina dorsal de azúcar-fosfato del ADN y ARN, péptidos forman la espina dorsal de los PNAs. Son solubles en agua, muy estables, pueden ser fácilmente modificados y diseñados para transportar las habituales bases de ADN y ARN en la correcta disposición espacial con cualquier secuencia deseada de manera que puedan actuar como otros AOs. Matthew Wood y sus colegas en Oxford mostró primero que un PNA orientado al exón 23 mostro una actividad significativa en inyección intramuscular en los ratones mdx (28). Más recientemente se demostró que un PNA 25-mer tiene una actividad muy buena cuando se inyecta sistémicamente en ratones mdx. (29).

Matthew Wood está ahora trabajando estrechamente con **Michael Gait** y sus colegas del Laboratorio de Biología Molecular del MRC en Cambridge, Reino Unido con péptidos conjugados, uniéndose, tanto al PNA y PMO contra el exón 23 de ratones mdx. El equipo ha desarrollado una serie de *péptidos PNA internalizados*, el candidato

inicial Pip2b, que se unió a un PNA contra el exón 23 de ratón de 20 unidades con la siguiente estructura abreviada:

RAhxRRAhxRRAhxRIHILFQNdRRMKWHKβAlaC

La inyección intramuscular de sólo 5 microgramos de este AO-Pip2b-PNA en ratones mdx de 8 semanas edad, mostró un gran número de fibras que contienen distrofina en un solo músculo inyectado de ratón (17). El desarrollo más emocionante es que una versión mejorada del péptido, conocido como Pip5e, en conjugación con un PMO 25-mer, ha demostrado la producción muy alta de distrofina en todos los tipos de músculos después de una única inyección intravenosa de 25 mg/kg en ratones mdx, y por primera vez incluye los músculos del corazón (manuscrito en preparación de Yin, Saleh, Gait, Wood.). Hasta la fecha ha sido muy difícil de encontrar péptidos como los PMO conjugados que tienen una alta actividad en el corazón, pero el Pip5e, que es un péptido abreviado y simplificado en comparación con el Pip2b, es un gran avance en este sentido y es probable que sea más evaluado preclínicamente.

Omisión de exón con morfolinos octa-guanidina. *Qi Long Lu* y sus colegas en el Centro Médico de las Carolinas en Charlotte, Carolina del Norte, han desarrollado otro AO modificado que puede atravesar las membranas de

las células musculares con una eficacia muy alta y producir distrofina en el corazón.

Al AO morfolino normal, se añadió una estructura compleja de cadena ramificada (un polímero), cuyos ocho brazos llevan a un grupo de guanidina (octa-guanidina) en sus extremos. Estos grupos forman parte del aminoácido arginina, los cuales son componentes de otros dos nuevos tipos de AO descritos aquí. Este polímero de octa-guanidina junto con el morfolino se llama *morfolino vivo*. A diferencia del morfolino vinculado con un péptido (PPMO), el polímero de octa-guanidina no es un péptido, por lo que es poco probable que el sistema inmunológico del cuerpo responda y destruya el compuesto.

Con el morfolino vivo contra el exón 23 de ratones mdx, se realizaron experimentos en ratones vivos. El tratamiento sistémico bi-semanal durante 10 semanas con inyección intravenosa de sólo 6 mg/kg de AO produjo más de un 50% de nueva distrofina en todas las fibras de los músculos esqueléticos, en hasta un 10% de los músculos cardíacos, y también en el los músculos lisos de los vasos sanguíneos y los intestinos. Las funciones de los músculos se han mejorado de manera significativa y no hubo efectos secundarios y ningún rechazo inmune. Estos nuevos AOs ofrecen una perspectiva realista para una terapia eficaz de Duchenne (21).

Omisión de exón con transferencia génica.

Primer acercamiento: Los investigadores en el Institut de Myologie en París, *Luis García* y *Aurélie Goyenvalle* (ahora en la Universidad de Oxford) y sus colaboradores, están tratando de *combinar la omisión de exón con terapia génica* para instruir a las células musculares a producir ellas mismas los AOs, para que así no tengan que ser inyectados repetidamente. Esto puede lograrse al instruir genéticamente a los músculos para producir **ARNsn's-U7** modificados conteniendo la información genética para la construcción de los AOs. Los **ARNsn's-U7** son pequeños ARNs en el núcleo de la célula que tienen una estructura similar a los factores de empalme.

Los investigadores construyeron un gen modificado del ARNsn-U7 añadiendo secuencias complementarias de ADN de dos AOs que son necesarios para omitir el exón 23 de ratones mdx. Estos cortos ARNsn's son también "hechos" por genes. Este gen-U7 modificado, U7 SD23/BP22, junto con secuencias de control, se colocó en el ADN de un virus adeno-asociado tipo-2, AAV. Estos vectores de transporte a continuación se inyectaron primero a nivel *local* en los músculos solos de ratones mdx y luego *sistémicamente* en su circulación sanguínea. En las células musculares, las secuencias del ADN recibido se transcribieron en los correspondientes ARNs que entonces realizarán el usual proceso de omisión exón que restauró el marco de lectura y, por tanto, abrió el camino para la síntesis de distrofina sin los aminoácidos determinados por el exón 23. Esta nueva distrofina acortada apareció hasta en un 80% de las fibras de los músculos tratados en los que emigro a su normal posición debajo de las membranas celulares y se mantuvo estable durante más de un año sin causar ninguna reacción inmune.

Los procesos distróficos en los músculos mdx, es decir su acelerada degeneración y regeneración, se detuvieron completamente. Los ratones-mdx tratados sistémicamente, que fueron físicamente estresados corriendo en una banda rodante, no desarrollaron el daño muscular usual encontrado en ratones mdx no tratados (19).

Esta técnica de transferencia de genes-U7 fue entonces aplicada para el tratamiento del *perro GRMD* perdiguero dorado *clínicamente distrófico*. Estos perros tienen una mutación en el sitio de empalme del exón 7, que puede ser "reparado" omitiendo los exones 6 y 8. Mediante el uso de un vector U-7 modificado, específico de perro, conteniendo estructuras en antisentido en contra de los exones 6, 7 y 8, se obtuvo distrofina acortada casi en el nivel normal dos meses después de una sola inyección *local* en un músculo. Una inyección regional *sistémica* en una pata con circulación bloqueada resultó en grandes cantidades de nueva distrofina que estaba todavía presente seis meses después.

Segundo acercamiento. Más recientemente, *Aurélie Goyenvalle* desarrollo una nueva técnica más general, en el laboratorio de Kay Davies en Oxford. En este acercamiento, la omisión de exón está mediada por un nuevo y casi "universal" vector ARNsnU7 que es bifuncional, ya que lleva una secuencia complementaria de ADN del exón a ser omitido también una cola libre que se une a los sitios de las *ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas* A1/A2 (hnRNP). Estas proteínas pueden, cuando llegan cerca del spliceosoma en los extremos de un exón, inhibir el proceso de empalme del exón, de ese modo no está incluido en el ARNpre-m final.

Las secuencias complementarias de ADN del gen U7 bifuncional traídas por el virus, una vez que se transcriben en pequeños ARNs, se unirán al exón a ser omitido, y por que estas secuencias de ARN atraen los hnRNPs a los sitios de empalme. Ellos por lo tanto inducirán la omisión



Aurélie Goyenvalle, PhD
Universidad de Oxford

del exón seleccionado reprimiendo el proceso normal de empalmado. Por lo tanto, este tipo de omisión de exón no es provocada por los usuales AOs, si no por estas proteínas “universales” que son las mismas para inhibir el empalme de todos los exones.

La razón de este acercamiento es reducir considerablemente los largos procesos de optimización usualmente requeridos para

cada nuevo exón seleccionado. Al igual que con los acercamientos de ingeniería de omisión de exón normales, la mejor estructura AO posible para omitir un nuevo exón es un procedimiento largo que ahora se puede acortar por el uso de la “cola universal”.

Este método ya ha sido probado con éxito en el laboratorio para omitir el exón 51 en mioblastos aislados de un paciente de Duchenne con una delección de los exones 49 y 50. El más efectivo ARNsnU7 fue uno con una estructura de la cola llamada A1 (U7ex51-AON-A1). Este restauró la distrofina a nivel casi normal en estos mioblastos. Mediante la inyección de esta estructura bifuncional localmente en los músculos del ratón mdx humanizado desarrollado por investigadores de Holanda, que contiene la distrofina, una tasa de omisión de exón del 54% fue alcanzada.

Se espera que esta técnica también sea capaz de omitir otros exones e incluso los que son difíciles de omitir por la omisión de exón “normal”. Este acercamiento vectorizado también ofrece la posibilidad de realizar varias omisiones de exón con dos o más ARNsnU7.

Este uso del ARNsnU7 bifuncional ha sido publicado en la revista *Molecular Therapy*, su título es “Enhanced exon-skipping induced by U7snRNA carrying a splicing silencer sequence: promising tool for DMD therapy” (25).

Omisión de exón con U1 genético. Irene Bozzoni y sus colegas en la Universidad *La Sapienza* en Roma son pioneros de un método genético de omisión de exón en el que están utilizando el gen que codifica el ARNsn U1, un pequeño ARN nuclear implicado en el reconocimiento del sitio de empalme 5' y requerido para el primer paso de la reacción de empalme.

Se han sustituido los primeros 9 nucleótidos en la terminal 5' del ARNsn U1 con 54 nucleótidos complementarios de las regiones fronterizas del exón 23 del gen de la distrofina de ratón. La estructura entera fue insertada en virus adeno-asociados de tipo 2/1. Tres a 4 billones ($3-4 \times 10^{12}$) de estos virus vectores se inyectaron en la vena de la cola de ratones mdx de 6 semanas de edad. Doce semanas después, fue correctamente omitido el ARNm, y también la nueva distrofina en el 10-20% de la cantidad normal en varios músculos esqueléticos y también en los músculos del corazón y el diafragma. Los ratones también habían mejorado significativamente las funciones musculares.

En otro experimento, 18 meses después de la inyección de una sola vez de los virus, los músculos de dos ratones fueron examinados cuando tenían 80 semanas de edad.

Durante todo este tiempo, prácticamente hasta su muerte natural, los músculos esqueléticos, cardíaco y el diafragma de estos ratones viejos no sólo contenían la corrección del ARNm, en marco de lectura, sin el exón 23 y suficiente distrofina ligeramente acortada, que mantuvo el proceso de regeneración de genes normal, si no que las funciones musculares también mejoraron significativamente sin ningún problema inmunológico. Estos resultados muestran que esta técnica genética puede conducir a un tratamiento de larga duración de los pacientes con Duchenne.



Prof. Irene Bozzoni
Universidad de Roma

Recientemente, la tecnología de omisión de exón basada en U1 ha sido licenciada a la empresa Holandesa Amsterdam Molecular Therapeutics (AMT), que procede hacia estudios preclínicos y clínicos.

Terapias personalizadas y las agencias reguladoras.

La *Administración Federal de Fármacos*, la **FDA**., en los Estados Unidos, la *Agencia Europea de Medicinas*, **EMA**, y otras agencias reguladoras requieren que el “normal” desarrollo de un fármaco clásico pase por las siguientes etapas:

La **fase pre-clínica** involucra estudios de laboratorio y animales para valorar la seguridad, actividad biológica, y formulaciones;

La **fase I de prueba clínica** en 20 - 100 voluntarios sanos para determinar su seguridad en seres humanos;

La **fase II de prueba clínica** en 100 - 500 pacientes para evaluar la dosis óptima, seguridad, y eficacia; y la

fase III de investigación clínica en 1,000 - 5,000 pacien-

tes para confirmar la seguridad y la efectividad del uso a largo plazo del fármaco.

El costo de todas las tres pruebas clínicas de investigación puede superar los 500 millones de dólares para un fármaco y puede tomar hasta 15 años del primer concepto de un nuevo fármaco hasta su aprobación de mercado.

Las reglas reguladoras fueron hechas en un tiempo cuando los tipos de acercamientos específicos al paciente como la omisión de exón no estaban todavía disponibles. Para conseguir un fármaco para Duchenne personalizado a través de estas etapas, algunos desafíos son encontrados que son nuevos para los organismos y que tienen que ser superados antes de que puedan llegar a los pacientes.

Por ejemplo, los estudios de fase-I de seguridad con los AOs en voluntarios sanos puede cambiar el marco de lectura en un ARN normal de distrofina y, si son suficientemente eficaces, dar a los voluntarios sanos distrofia Duchenne, un efecto secundario indeseable que no tiene nada que ver con los efectos secundarios "normales". Otra preocupación mayor sería los así llamados *efectos fuera de blanco*, que significa que exones podrían ser omitidos en otros genes además del gen de la distrofina.

Otro problema, no encontrado en el desarrollo de un fármaco normal podría ser propio de distrofia Duchenne: debido a la ausencia de distrofina, las membranas celulares de los músculos con Duchenne tienen grietas y agujeros a través de los que los fármacos de omisión de exón pueden llegar al citoplasma de las células y también al núcleo donde son necesarios para su efecto terapéutico. Por lo tanto, los ciertos efectos adversos podrían aparecer solamente en pacientes pero no en las personas sin Duchenne. Esto hace que los estudios de seguridad estándar con voluntarios sanos sean problemáticos.

El equipo de **Eric Hoffman** en el Centro Médico Infantil en Washington, ha recibido recientemente 2.5 millones de dólares del Departamento de Defensa de EUA para estudiar estos asuntos de toxicidad en ratones y monos del AVI AO contra el exón - 51 usado en los ensayos clínicos británicos.

Otro desafío para la aprobación de fármacos de omisión de exón sería el gasto de varios cientos de millones de dólares, y el tiempo necesario para pasar todas las cuatro etapas cada una de las muchas secuencias diferentes de AO requeridas para tratar a pacientes con mutaciones diferentes. La mayoría de estas secuencias individuales serán aplicables solamente a una pequeña cantidad de pacientes, por lo tanto, en muchos casos, simplemente no habrá una cantidad suficiente de pacientes disponible para los estudios clínicos estándar.

Si las primeras pruebas de omisión de exón en curso continúan indicando ningunos efectos adversos relacionados con el fármaco, como parece será probable, las agencias reguladoras pueden esperanzadamente ser convencidas de que consideren grupos enteros de AOs de cierto tipo químico como un solo fármaco y por lo tanto, acortar el proceso de aprobación considerablemente.

Lo primero debe venir primero sin embargo. Aunque el progreso en la omisión de exón parece prometedor, el camino al eventual acceso de los pacientes a un tratamiento seguro y eficaz es aún muy largo. Una vez que el primer fármaco destinado al exón 51, se haya desarrollado con éxito y haya sido aprobado por las autoridades reguladoras, la cuestión de cómo otros agentes de omisión de exón pueden desarrollarse de manera más eficiente, se vuelve importante. Al mismo tiempo, todos los esfuerzos deberían centrarse en ayudar a tantos pacientes globalmente como sea posible y lo más rápidamente posible, sin poner en juego la seguridad de los niños y sin tomar atajos indebidos.

En un primer simposio, organizado por TREAT-NMD, para abordar este tema, un gran grupo de 98 expertos de Duchenne, incluidos los científicos que participan en las actuales pruebas clínicas de omisión de exón, se reunieron el 25 de septiembre de 2009 en las oficinas londinenses de la EMEA, la Agencia Europea de Medicamentos, para iniciar un diálogo sobre las cuestiones de la reglamentación alrededor del nivel sin precedente de personalización de los tratamientos para enfermedades genéticas como la DMD. La reunión con la EMEA trato de tomar medidas para identificar una vía que permita el progreso seguro y eficaz de estos medicamentos a través del proceso de aprobación dentro de un período de tiempo aceptable.

Parte de este resumen está basado en una nueva publicación de **Eric Hoffman** del Centro Médico Infantil en Washington, DC (13) y anuncio de prensa de TREAT-NMD.

Pruebas clínicas

Cuatro pruebas clínicas para omitir el exón 51 en chicos con Duchenne son descritos en esta sección más importante de este informe. Dos de ellas son *locales*, en las que solamente un músculo no importante es tratado. Estos tratamientos en un solo músculo no pueden mejorar la función de todos los músculos, no pueden proveer un beneficio clínico a los chicos con Duchenne participantes. Las otras dos pruebas son *sistémicas*, en las que los fármacos potenciales, los AOs, son inyectados en la circulación sanguínea. Y ya pueden mostrar una mejora pequeña de la función muscular.

Pero la pregunta principal a la que estas cuatro pruebas son diseñadas a responder es: *¿Son seguros los nuevos fármacos potenciales?* Después de todo, pueden tener que ser dados por toda la esperanzadamente vida prolongada de los niños con Duchenne.

Estos pasos indispensables para el completo desarrollo de una terapia son sólo experimentos humanos que también pueden ir mal. La participación de un número suficiente de niños que necesitan omisión del exon-51 es importante, pero no es útil que la familia emprenda viajes

costosos a los centros de prueba. **Kate Bushby** explicó en su entrevista que grabé con ella en Marzo de 2009.

"No creo que sea práctico para los niños venir de muy lejos para participar en ensayos clínicos, porque tienen que estar en los centros clínicos cada semana para sus inyecciones. Tienen que tener un montón de muestras de sangre tomadas. Las familias tienen que vivir cerca de los centros. Las familias tienen que poner su vida entera en espera, incluso si viven cerca. Las familias deben darse cuenta de que los ensayos son sólo ensayos. En posteriores ensayos de eficacia, su hijo podría incluso ser tratado con placebo. No se les puede ayudar y puede haber efectos secundarios imprevistos. Los ensayos son trabajo muy duro.

Yo diría incluso que los niños en los ensayos están más en desventaja. Debido a que tienen que pasar por una molestia para llegar a algo de lo que todo el mundo se beneficiara posteriormente, siempre que se haya demostrado que funciona. Estamos realmente muy agradecidos con las familias y niños que toman todo el tiempo y esfuerzo para participar en estos estudios, que realmente esperamos que las cosas avancen para todos".

Usted puede ver la entrevista completa con Kate Bushby y también con Hans Schikan y Judith van Deutekom en mis páginas de internet: www.duchenne-information.eu.



Judith van Deutekom, PhD.
Jefa de Investigación
Prosensa Therapeutics BV, Leiden



Hans Schikan, PharmD.
Presidente

Prueba local de omisión de exón en Holanda. La primera prueba en humanos con la técnica de omisión de exón fue realizada bajo la dirección de **Judith van Deutekom**, **Jan Verschuuren**, y otros de la compañía **Prosensa Therapeutics BV** y el **Centro Médico de la Universidad de Leiden** en Holanda entre enero de 2006 y marzo de 2007. Fue diseñada para proveer solamente una *prueba de principio* y no se espera resulte en una función benéfica terapéutica en los niños tratados. Fue un *estudio local* sobre un área pequeña de un solo músculo, el músculo *tibialis anterior* de la espinilla, que fue tratado con el AO 2'O-metil contra el exón 51 llamado *PRO051*.

Con este tipo de AO químicamente modificado, los investigadores holandeses han trabajado en experimentos pre-clínicos por años y fueron capaces de omitir exones de la distrofina con éxito en fibras musculares no sólo en cultivos de células obtenidas de pacientes con Duchenne con diferentes mutaciones, sino también en modelos de ratón, mdx y hDMD, después de inyecciones locales y subcutáneas o sistémicas intravenosas.

Cuatro niños holandeses participaron en este estudio abierto. Tenían entre 10 y 13 años de edad y habían demostrado delecciones de los exones 50, 52, 48-50, o 49-50 de la distrofina. Fueron tratados secuencialmente, significando que solamente después de que los resultados para un niño eran positivos y no indicaban ningunos efectos secundarios serios, el próximo niño fue tratado. Cada niño recibió una dosis única de 0.8 mg de PRO051 disuelto en solución salina, 0.9 %, bajo anestesia local en una región pequeña de aproximadamente 1.5 centímetros de largo de su músculo de la espinilla.

Después de 4 semanas, tejido muscular fue obtenido por una biopsia del sitio de la inyección y se probó para buscar el ARNm omitido esperado y nueva distrofina acortada. Casi todas las fibras musculares en el tejido de la biopsia, hasta 94%, indicaban expresión de nueva distrofina en las membranas de la fibra muscular en niveles de

33%, 35%, 17%, y 25% comparado con tejido muscular sano. El volumen de tejido muscular fue demasiado pequeño para proveer cualquier beneficio clínico a los niños participantes. Esto fue esperado y los niños y sus familias sabían esto.

Estos resultados mostraban por primera vez, que la omisión de exón no solo trabaja en ratones y perros, si no también en musculo humano, en niños con Duchenne, y también significa que un tratamiento de omisión de exón, cuando esté disponible, debe ser empezado cuando la mayoría de los músculos todavía están intactos, es decir, inmediatamente después del diagnóstico y la determinación exacta de la mutación en el gen de la distrofina.

Los resultados de esta primera aplicación de la técnica de omisión de exón en niños con Duchenne han sido publicados el 27 de diciembre de 2007 en la revista *New England Journal of Medicine* con un comentario de Eric Hoffman (18).

Prueba clínica sistémica en Holanda con PRO051 para omitir el exón 51 en chicos con Duchenne. Los resultados de un estudio clínico local intramuscular con PRO051 que se publicó en la revista *New England Journal of Medicine* en 2007 había demostrado que la técnica de omisión de exón con este agente no sólo funciona en animales de laboratorio, si no también es capaz de producir nueva distrofina, sin efectos secundarios en niños con Duchenne. Con el próximo paso hacia el pleno desarrollo de esta técnica, los científicos tuvieron que demostrar que el PRO051 también pueden ser aplicado de forma *sistémica* a través de una inyección subcutánea (es decir, bajo la piel) para que el fármaco pueda alcanzar y tratar todas las células musculares. El primer estudio sistémico alguna vez realizado con PRO051.

Entre Julio de 2008 y Enero de 2009, Prosensa Therapeutics BV hizo un estudio *sistémico* con doce chicos con Duchenne entre 5 a 15 años de edad con PRO051 inyectado por vía subcutánea. Las inyecciones subcutáneas tienen la ventaja de que no se requiere frecuentes visitas a consultorios médicos y hospitales en caso de tratamientos repetidos que más tarde serán necesarios. Las inyecciones y el control médico fueron realizadas por los equipos de **Nathalie M. Goemans** en el Departamento de Neurología Pediátrica de la Universidad de Leuven en Bélgica y de **Mar Tulinius** en el Hospital Infantil Reina Silvia en Gotemburgo en Suecia.

Los resultados del estudio fueron presentados por Natalie Goemans el 12 de Septiembre de 2009 en el Congreso Internacional de la Sociedad Mundial del Músculo en Ginebra.

Cada niño recibió una inyección por semana durante cinco semanas consecutivas. En este estudio de dosis-escalada, los primeros tres niños recibieron el PRO051 a una dosis de 0.5 mg/kg en cada una de las cinco inyecciones, el próximo grupo de 2 mg/kg, el tercer grupo de 4 mg/kg, y los últimos 3 niños de 6 mg/kg.

Se tomaron biopsias musculares antes y dos semanas después del tratamiento para los dos primeros pacientes, y en dos y siete semanas después de la última inyección para todos los otros niños. La estructura del ARNm y la presencia de la nueva proteína distrofina se determinaron en todas las muestras de biopsia.

Estos análisis mostraron por primera vez que la administración subcutánea de PRO051 dio lugar a la omisión específica del exón 51 e indujo la producción de nueva distrofina en forma relacionada a la dosis, lo que significa que a dosis más alta del fármaco se creaba mayor cantidad de nueva distrofina.

Esta primera prueba sistémica con un agente de omisión de exón en Duchenne fue diseñada para responder a la pregunta más importante: ¿es este tratamiento genético seguro? La respuesta fue positiva: no hubo rechazo inmunológico de la nueva proteína y ningún otro problema clínicamente significativo, por lo que este primer tratamiento de cuerpo entero con un fármaco de omisión de exón fue bien tolerado por todos los 12 pacientes con Duchenne en el estudio. Esto también queda ilustrado por el hecho de que los 12 niños han entrado en la extensión abierta del estudio y a finales de Septiembre todos los niños han entrado en su décima semana de tratamiento.

El resultado positivo de esta prueba alentó a todos los científicos participantes y los médicos para comenzar la preparación del próximo gran ensayo fase III con el PRO051 que se espera comience a principios de 2010 con más de 150 chicos con Duchenne que necesitan omitir el exón 51.

Usando el registro mundial TREAT-NMD para la distrofia Duchenne, Prosensa ya ha identificado alrededor de 300 pacientes en 21 países que cumplen con los criterios de inclusión para esta prueba. Estos pacientes son repartidos a 50 centros clínicos potenciales. Los pacientes seleccionados y centros clínicos serán contactados para participar en este gran ensayo internacional.

La cuestión clave de este estudio será determinar si la aparición de nueva distrofina también conduce a un mejoramiento de la función muscular, por lo que muchas pruebas bioquímicas y clínicas se realizarán. Se espera que entre estas pruebas sea la prueba estandarizada de 6 minutos caminando la que determinará la distancia en metros que todavía un niño ambulatorio puede caminar en 6 minutos.

Primera prueba clínica local en el Reino Unido. Otra prueba clínica de omisión de exón se realizó en el Reino Unido entre el otoño de 2007 y finales de 2008 por el *Consortio MDEX* bajo la dirección de **Francesco Muntoni** del Colegio Imperial de Londres, y **Kate Bushby** de la Universidad de Newcastle upon Tyne. El consorcio MDEX, financiado por el departamento de Salud, agrupa a nueve investigadores, así como las agrupaciones Muscular Dystrophy Campaign, ActionDuchenne, y Duchenne Parents Support Group.

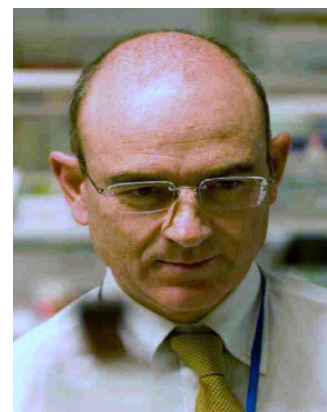
Ocho diferentes AOs morfolino fueron probados en cultivos de músculos humanos normales y Duchenne y en ratones no distróficos vivos que contenían distrofina humana en sus músculos por los equipos de investigación Holandeses y Británicos. Los mejores resultados se obtuvieron con el AO morfolino H51A desarrollado por **Steve Wilton** en Perth (Australia) y el mostrado por **Dominic Wells** en Londres, por ser lo suficiente estable para un tratamiento clínico a largo plazo. Este AO morfolino es sintetizado por la empresa AVI BioPharma Inc. en Portland, Oregon, y se llama AVI-4658 (20).

Este ensayo fue un estudio local para evaluar la seguridad y eficacia bioquímica de este fármaco morfolino que omite el exón 51 después de inyecciones de una sola vez en un músculo pequeño y sin importancia, el músculo *extensor digitorum brevis* (EDB) en el exterior del pie. Siete niños con Duchenne de 11-16 años de edad, algunos de ellos en silla de ruedas, participaron. Ellos tenían mutaciones que necesitan la omisión del exón 51 para restaurar el marco de lectura, dos niños con delecciones en los exones 48-50, dos con delecciones en los exones 45-50, uno con delecciones en los exones 49-50, uno con una delección del exón 50, y uno con una pequeña delección en el *intrón* 49 causando la delección del exón 50. Antes de iniciar el tratamiento, células de una biopsia de piel fueron probadas en cultivos para confirmar que efectivamente el AVI-4658 elimina el exón 51 del ARNm de la distrofina de cada niño, y produce el esperado ARNm acortado de la distrofina y la proteína en estos experimentos de laboratorio.



Prof. Kate Bushby

Universidad Newcastle u.T.



Prof. Francesco Muntoni

Colegio Imperial de Londres

Cada uno de los pacientes seleccionados tenía menos de 5% de fibras revertantes en sus músculos, determinado por una biopsia en el momento de su diagnóstico. Diferentes bajas cantidades de estas fibras musculares positivas de distrofina están presentes en muchos chicos con Duchenne. Son causadas por una omisión de exón espontánea. La cantidad esta distrofina revertante encontradas en el control de placebo tenía que ser deducida de la cantidad de distrofina detectada después del tratamiento.

Muchas otras investigaciones clínicas también se hacen para asegurar que los resultados son científicamente válidos y causados solo por el tratamiento. Por ejemplo, los investigadores que analizaron las muestras de músculo no sabían si los tejidos provenían del músculo tratado con el AO o del músculo de control del otro pie, lo que significa que la prueba fue con método "simple ciego".

Este fue un estudio de dosis-escalada, los primeros dos niños recibieron una dosis baja de 0.09 mg del AO morfolino en 0.9 ml de solución salina, entregada con nueve inyecciones en paralelo de 0.01 ml cada una directamente en el músculo EDB. El músculo del otro pie recibió inyecciones similares de solución salina solamente para el control de los antecedentes de distrofina. Los cinco otros niños recibieron una dosis 10-veces mayor de 0.90 mg de AO en un esquema de inyecciones similares. La mayoría de los

músculos EDB tratados fueron retirados en biopsias entre tres y cuatro semanas después de la inyección.

La mayor dosis de AO resultó en la producción aumentada de distrofina en todos los músculos tratados. En el tejido muscular alrededor de la vía de la aguja través de la cual se le dio el fármaco, 44 a 79% de las fibras musculares habían aumentado las cantidades de distrofina. La intensidad media de la distrofina en varias secciones del material biópticos varió de 22% a 32% de la intensidad media en los músculos de las personas sanas, y es 11-21% mayor que el antecedente de distrofina vertante en el musculo de control del otro pie. En algunas fibras positiva de distrofina solas, la cantidad de distrofina que se encontró era de hasta 42% de lo que en el músculo sano. Pruebas adicionales demostraron que la nueva distrofina había reducido el peso molecular como se esperaba de la distrofina tipo-Becker acortada.

El objetivo de este estudio era demostrar la seguridad local y eficacia bioquímica de las inyecciones en un solo músculo de un AO morfolino. Como con todos los tratamientos locales de este tipo, ningún beneficio terapéutico para los niños participantes era esperado por el tratamiento del solo músculo pequeño EDB en un pie, y no hubo ningún intento para determinar la función del músculo antes y después del tratamiento. Los niños y sus familias son conscientes de esta limitación.

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



Maria Kinali, MD. Virginia Arechavala-Gomez, PhD.
University College London

En el tejido muscular de los pacientes que recibieron la dosis más bajas del medicamento, el ARNm con el exón omitido fue detectado, pero ningún aumento de la proteína distrofina sobre el nivel del antecedente puede ser probado, porque el método de prueba de la proteína "western blot" no era lo suficientemente sensible para detectar diferencias muy pequeñas en las proteínas.

Este estudio clínico tenía el mismo objetivo que el anterior estudio Holandés publicado en el New England Journal of Medicine en Diciembre de 2007, donde el OA tipo 2'O-metilo se utilizó. Ambos estudios fueron diseñados para proporcionar una prueba de principio de que la omisión de exón no solo funciona en animales de laboratorio como ratones distróficos y perros, sino también en pacientes humanos. Y ambos estudios han demostrado que este es el caso. La principal diferencia técnica entre los dos estudios fue que los científicos Holandeses sólo se les permitió realizar una única biopsia en el músculo tratado después del tratamiento, mientras que los británicos podían hacer biopsia en ambos, el músculo tratado y el músculo de control, después del tratamiento. Así, en el estudio Holandés el antecedente de la distrofina no pudo ser tomado en cuenta para la determinación del contenido de distrofina después del tratamiento. Hubo más diferencias entre los dos estudios, lo que significa que los resultados de los dos estudios no son directamente comparables en todos los detalles.

En la publicación de los resultados Británicos, publicados en línea el 26 de Agosto de 2009 por **Maria Kinali, Virginia Arechavala-Gomez, Francesco Muntoni** y 23 otros científicos (23), los autores dicen: "Ambos estudios informaron inequívocamente la expresión de la distrofina en concentraciones similares". **Annemieke Aartsma-Rus y Gertjan B. van Ommen (24)** declararon en su comentario publicado al mismo tiempo, que "el siguiente paso que ambos grupos están llevando a cabo, es entregar los oligonucleótidos en antisentido sistémicamente, por lo tanto, la comparación detallada de los resultados intramusculares, es decir, en los músculos individuales, son en gran medida irrelevantes. Sólo los ensayos sistémicos revelarán la verdadera promesa de este enfoque, y se necesitan ensayos adicionales para validar el beneficio funcional, o al menos la disminución de la progresión de la enfermedad".

Primera prueba clínica sistémica en el Reino Unido.

Uno de los más decisivos experimentos animales pre-clínicos para la preparación de esta prueba, fueron 7 inyecciones semanales de AO en la vena de la cola de ratones mdx que se tradujeron en más de 50% de distrofina acortada en la mayoría de sus músculos comparado con la cantidad normal. Esta nueva distrofina estuvo presente por lo menos 14 semanas (27).

Después de que la aprobación se obtuvo de los tres organismos de supervisión del Reino Unido MHRA, GTAC, y GOSH entre agosto y noviembre de 2008, los primeros dos chicos recibieron inyecciones intravenosas del AO AVI-4658 en la circulación sanguínea a principios de 2009. En total, 12 chicos con Duchenne todavía ambulantes en 4 grupos, quienes necesitaban la omisión del exón-51, recibieron las inyecciones semanalmente durante 12 semanas. Las inyecciones se realizaron secuencialmente de modo que un tratamiento posterior puede detenerse inmediatamente si ocurre algo en uno anterior.

Este ensayo de nuevo es un estudio de dosis escalada, donde los chicos reciben una primera muy baja dosis de 0.5 mg/kg de AO cada semana, que se eleva a 4.0 mg/kg para los chicos tratados en el cuarto grupo. Para un niño de 10-años de edad en el cuarto grupo, de 30 kg de peso, esto significa que recibió 1.44 gramos del fármaco AO durante

toda la prueba. En anteriores ensayos clínicos para otras enfermedades, dosis de AO de hasta 300 mg/kg/día fueron bien toleradas. Los objetivos de la prueba son probar la seguridad y tolerancia y también cambios de la función y la fuerza muscular. La aprobación fue obtenida de los organismos reguladores para agregar 2 grupos más de 4 niños, para recibir cada uno 10 y 20 mg/kg de AO. El tratamiento del quinto grupo está en curso.

Aunque varias biopsias musculares serían necesarias para probar que el fármaco AO inyectado en la sangre ha llegado a varios músculos y distrofina es producida allí, sólo una biopsia después de la prueba se ha permitido por las agencias reguladoras. Esta biopsia se tomaron del bíceps de los niños.

Este ensayo se realiza en el Hospital Great Ormond Street de Londres y el Royal Infirmary en Newcastle upon Tyne. **Stephen B. Shrewsbury**, Médico Jefe de AVI BioPharma, informó de estos resultados preliminares el 12 de septiembre en la reunión de la Sociedad Mundial del Musculo WMS en Ginebra. Mencionó que el AVI-4658 fue bien tolerado por los pacientes ya tratados y que no se detectaron efectos secundarios relacionados con el fármaco o con otros problemas. Concluyó que "los datos de seguridad alentadores son extremadamente importantes para el futuro uso de este fármaco en antisentido, ya que una toxicidad limitante de la dosis podría limitar seriamente la efi-

cacia de esta terapia de DM Duchenne en esta enfermedad crónica, donde el tratamiento debe comenzar en la infancia y, probablemente, continuará por toda la vida".

Tan pronto como los detalles y los resultados completos de este estudio sean publicados en pocos meses, serán incluidos en la siguiente actualización de este informe.

AVI BioPharma es el patrocinador de esta prueba, y a **Francesco Muntoni** se le han otorgado de 1.3 millones de dólares del Concilio de Investigación Médica del Reino Unido para compensar algunos de los costos de la prueba.

Cooperación internacional ICE. La Organización *Internacional de Esfuerzo de Colaboración para la DMD*, el ICE, es una asociación de 12 instituciones de Francia, Italia, Reino Unido y los EUA, que bajo la dirección de **Jean-Claude Kaplan** (Francia), **Terry Partridge** (EUA), **Adrian Thrasher** (Reino Unido), **Luis García** (Francia) y **Berch Griggs** (EUA) desarrollara los detalles de los métodos conjuntos genéticos de omisión de exón. El ICE fue fundado en 2008 y es financiado por el *Parent Project de Francia* y la *Association Monégasque contre les Myopathies* con 1.7 millones de euros. Catorce de los 105 científicos y médicos que pertenecen al ICE, se reunieron el 6 de Junio de 2009 en Mónaco para analizar los resultados obtenidos en el primer año de su colaboración.

Algunas palabras finales personales.

Queridos amigos de cualquier parte: Como dije al principio, he escrito este informe de investigación y los anteriores especialmente para usted, los chicos y hombres jóvenes con distrofia muscular Duchenne y sus familias, para que pueda entender mejor lo que se está haciendo para detener esta enfermedad. Espero que mis palabras no fueran demasiado complicadas para usted, los hombres jóvenes y los chicos con distrofia Duchenne y sus familias. Pero sé que, debido a que usted quiere saber lo que los investigadores están haciendo por usted, usted tendrá ya algunos conocimientos básicos acerca de los muchos hechos científicos mencionados en este informe. Si tiene problemas quizás tenga amigos que han estudiado medicina o biología u otras personas que pueden ayudarlo. O puede preguntarme por escrito en Inglés, Francés, Alemán, Español, Italiano, voy a responder todos los correos electrónicos o cartas, así como pueda, pero no siempre de inmediato y sólo en Inglés o Alemán, no puedo escribir en otros idiomas sin demasiados errores.

Investigación científica. Si usted ha leído el informe entero, usted se dará cuenta de que los muchos científicos y sus equipos mencionados, están haciendo todo lo que ellos pueden tan rápido como es posible para encontrar una terapia. En 1986/87, cuando el gen de la distrofina y su proteína fueron encontrados, todos pensábamos que la manera estaba finalmente abierta para una cura que podría muy pronto corregir la causa de la enfermedad. Pero ahora, más de 20 años después, todavía estamos esperando esa cura o al menos una terapia que disminuya la velocidad de destrucción de los músculos. Pero no solamente la pelea en contra de *esta* enfermedad mostró ser mucho más difícil de

lo que imaginamos primero, el progreso para otras enfermedades genéticas como la fibrosis quística o muchas formas de cáncer, es también muy lento. De hecho, "nuestra enfermedad", la distrofia muscular Duchenne, podría volverse la primera enfermedad hereditaria infrecuente que tendrá una terapia genética en el futuro no tan distante.

Cuando una vez hablando con **Annemieke Aartsma-Rus**, dijo "la distrofia Duchenne nos ayuda a sanarla a ella misma". Así que le dije que diseminaría sus palabras al resto de nuestra comunidad Duchenne. Ella dijo entonces que ella realmente se robó esta cita de **Gert-Jan van Ommen**, que originalmente decía: "Esta enfermedad quiere ser curada". La enfermedad es realmente así, porque las membranas celulares del musculo con Duchenne tienen grietas y agujeros que permiten a los AOs entrar fácilmente en las células para hacer su trabajo de sanación allí. Para llegar a los músculos normales es mucho más difícil.

Diagnóstico de la mutación. Como usted ha visto, la omisión de exón es una técnica específica a la mutación. Eso significa que la mutación exacta debe ser conocida por el paciente para luego beneficiarse de dicho tratamiento. El método MLPA es ahora una técnica ampliamente utilizada para la detección de deleciones y duplicaciones, no sólo en los pacientes con Duchenne, sino también en mujeres portadoras. Incluso si la mutación del paciente en una familia no se conoce o no puede determinarse más, el método MLPA encuentra las deleciones y duplicaciones de la distrofina en las madres u otras mujeres relacionadas con ellos. Esto es importante para el consejo genético que puede evitar el nacimiento de nuevos niños con Duchenne en la familia de un paciente. Pero si una mujer en riesgo pue-

de asegurarse de que ella *no* es portadora, esto puede alentar a tener niños sanos, sin temor a que se repita.

Registro. Todos los niños y hombres jóvenes con Duchenne deben tener sus datos médicos personales registrados en bancos de datos de Duchenne de su propio país, que deben ser parte de las redes de registro internacionales como ofrece TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu/registry) y DuchenneConnect (www.duchenneconnect.org). Esto permitiría encontrar a participantes para pruebas clínicas de terapias para las mutaciones más inusuales, y también garantizaría que los pacientes y sus familias tienen acceso a la información más actualizada sobre resultados de investigación y manejo médico.

Cuidado con fármacos y tratamientos milagrosos. Un tratamiento que es seguro y eficaz durante mucho tiempo solo pueden ser producidos después de un desarrollo con métodos estrictamente científicos. Si usted ve fármacos "milagrosos" en Internet o tiene propuestas de tratamientos milagrosos, que cuestan miles de dólares o de euros y usted considera adquirirlos o aplicarlos en su hijo, por favor pregunte a los proveedores de lo milagroso cuántos niños con Duchenne ya han curado, cómo fueron diagnosticados con qué resultados, cuánto nueva distrofina han encontrado en los músculos, y cuánto ha mejorado la función muscular, y en qué importante revista médica los resultados fueron publicados. Si eso que es ofrecido tiene realmente algún valor, pregúntese a usted mismo por qué no miles de familias van con sus niños enfermos ahí. Tenga cuidado, por lo demás usted perderá mucho dinero y posiblemente lastimará a su niño severamente.

Reconocimiento de mi informe escrito. El presidente de Alemania, **Horst Köhler**, me ha otorgado la "Bundesverdienstkreuz", la medalla al mérito de nuestro país por la escritura de mis informes, y en una impresionante ceremonia el 5 de febrero de 2009 me fue dada a mí por el secretario de Estado **Gundolf Fleischer** en nuestro pueblo Breinau en la Selva Negra donde vivo. He utilizado esta oportunidad para explicar a las cerca de 120 personas presentes la situación de las familias con niños con Duchenne en Alemania y entonces empezar a escribir a 12 políticos de alto nivel incluido nuestro Presidente Federal y su esposa, **Eva Luise Köhler**, que se ocupa de las enfermedades raras, y los Ministros Federales de Salud e Investigación.

Durante los próximos meses de invierno, después de que nuestro nuevo gobierno esté en su lugar y trabajando, voy a utilizar estos nuevos contactos con el objetivo de encontrar formas de aliviar al menos parcialmente, los grandes problemas financieros a los que la comunidad internacional de investigación de Duchenne se enfrenta en sus esfuerzos para desarrollar todos los fármacos de omisión de exón más allá del 51, para todos los cerca de 80% de los chicos con Duchenne que los necesitan.

Y el 21 de marzo, la Academia Gaetano-Conte de Nápoles en Italia me otorgó su *Premio 2009 de Investigación Social* en la reunión de la Sociedad Mediterránea de Miología en Nicosia en Chipre. En esa ocasión, presenté un documento sobre cómo explicar la omisión del exón-51 a los pacientes con Duchenne y sus familias. Si usted desea ver las 55 diapositivas PowerPoint de mi presentación, por

favor pidámelas por e-mail y se las enviare. Son muy detalladas y tienen muchas animaciones, por lo que las entenderá sin una explicación mía.

Como un agradecimiento por este premio, he escrito una publicación acerca de mi trabajo con el título "The Progress Reports on the Development of Therapies of Duchenne Muscular Dystrophy", que aparecerá con un editorial escrito por Reinhard Rüdel en el número de Octubre -2009 de la revista ActaMyologica.



Este informe tiene ilustraciones, que le ayudará a entender mejor mis explicaciones. También contiene fotografías de algunos de los científicos que trabajan en la búsqueda de una omisión de exón para "nuestros" niños. Este toque personal, primero ofrecido en mi informe original de omisión de exón, ha sido bien recibido por las familias y otros

lectores también. Y hay una fotografía de una dama muy especial, junto con tres niños. Se trata de **Pat Furlong**, la presidenta del Parent Project Muscular Dystrophy Americano, PPMD, en una imagen tomada por mí en la reunión de 2008 del PPMD en Filadelfia. Muchos de ustedes la conocen personalmente, y la mayoría sabe lo que hizo y sigue haciendo para acelerar la investigación para una terapia de Duchenne a una velocidad cada vez mayor, hacia una terapia eficaz que este lista, esperanzadoramente, en pocos años más. ¡No podemos estar lo suficientemente agradecidos por lo que está haciendo!

Para concluir estas palabras finales, aquí están mis pensamientos sobre la cuestión más difícil que a menudo tengo que responder:

¿Por qué mi hijo tiene esta terrible enfermedad? Esta es una pregunta que a menudo escucho cuando recibo e-mails y llamadas telefónicas de casi todas partes del mundo, la mayoría de madres con niños con Duchenne. Aunque no he aprendido profesionalmente cómo hacer frente a esta pregunta, estoy tratando de responder de todos modos, en mis propias palabras como éstas:

Distrofia muscular Duchenne no es nueva, como el SIDA, porque se ha encontrado también en ratones, ratas, gatos, perros y caballos, y existe por lo tanto, probablemente en todos los animales con músculos. Así que empezó mucho antes de que nos volviéramos diferentes de nuestros antepasados animales. Se trata de un accidente de la evolución. Sin mutaciones, los cambios aleatorios de la información genética, no estaríamos aquí y el resto de la vida tampoco. Algunas de las mutaciones son "buenas", porque mejoran la vida, pero la mayoría son "malas" y peligrosas, porque causan la muerte y una enfermedad antes o después del nacimiento.

Las mutaciones que causan distrofia muscular Duchenne no lo castigan a usted, los niños enfermos, o sus madres, que pueden haber pasado el gen dañado a usted. Las mutaciones ocurren simplemente, probablemente la mayoría de las veces por errores cuando los genes se duplican durante la división celular.

Éste no es el lugar para discutir cuestiones religiosas que vienen a la mente fácilmente. Sólo quiero añadir una reflexión: La naturaleza parece actuar ciegamente sin importar a quién lastima, por otro lado, una larga serie de mutaciones buenas nos dio el cerebro humano, la más compleja estructura del universo, que es capaz de resolver muchos problemas, incluyendo la reparación de estos accidentes que causan distrofia Duchenne. Este informe muestra que esto es ¡exactamente lo que está sucediendo!

Estoy enviando a todos ustedes mis mejores deseos desde mi lugar de trabajo de verano en Cadaqués en el extremo norte de la Costa Brava en España.



Günter Scheuerbrandt, PhD.

Im Talgrund 2

79874 Breitnau, Germany

Tel.: *49-7652-1777,

E-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de

Internet: www.duchenne-information.eu

17 de Octubre de 2009

Referencias

Si desea leer una u otra de las publicaciones originales, vaya a www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez e introduzca los nombres de uno o dos autores en el espacio de "search" en letras minúsculas, como, por ejemplo: van deutekom jct. Usted obtendrá el resumen de forma gratuita y en muchos casos también a todo el artículo. Para descargar las más recientes, existe a menudo un cargo de unos 10 a 20 dólares. Usted pudiera también preguntarme, puedo enviarle algunos de los documentos en formato PDF.

(1) Pomeranz-Krummel DA, Oubridge C, Leung AKW, Li J, Nagai K. Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* 2009; 458; 475-480), Query CC. Spliceosome subunit revealed. *Nature* 2009; 458; 418-419.

(2) Neri M, Torelli S, Brown S, Ugo I, Sabatelli P, Merlini L, Spitali P, Rimessi P, Gualandi F, Sewry C, Ferlini A, Muntoni F. Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromusc. Disorders* 2007; 17: 913-8.

(3) van Ommen GJ, van Deutekom JT, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10; 140-149.

(4) Wilton SD, Fall AM, Harding PL, McClorey G, Coleman C, Fletcher S. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript. *Molecular Therapy* 2007; 15; 1288-96.

(5) Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, Yokota T, Yin H, Alter J, Jadoon A, Bou-Gharios G, Partridge T. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102; 198-203.

(6) Aartsma-Rus A, van Deutekom JCT, Fokkema IF, van Ommen G-JB, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that conform the reading-frame rule. *Muscle & Nerve* 2006; 135-144.

(7) Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen G-J, den Dunnen JT. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations; *Human Mutation* 2009; 30; 293-299.

(8) Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation* 2007; 28(2); 196-202.

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

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

(11) Aartsma-Rus A, Janson AAM, van Ommen G-JB, van Deutekom JCT. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Medical Genetics* 2007; 8; 43.

(12) Welch EM, Barton ER, Zhuo J. PTC124 targets genetic disorders by nonsense mutations. *Nature* 2007; 447; 87-91. Comment: Schmitz A, Famulok M. Ignore the nonsense. *Nature* 2007; 447, 42-43.

(13) Yakota T, Takeda S, Lu Q-L, Partridge TA, Nakamura A, Hoffman, EP. A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology, exon skipping brakes new ground. *Archives of Neurology*, 2009; 66; 32-38.

(14) Yokota T, Duffy W, Partridge T. Optimizing exon skipping therapies for DMD. *Acta Myologica* 2007; 26; 179-184.

- (15) Heemskerk HA, de Winter CL, de Kimpe SJ, van Kuik-Romeijn P, Heuvelmans N, Platenburg GJ, van Ommen G-JB, van Deutekom JCT, Aartsma-Rus, A. *In vivo* comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy skipping. *J. of Gene Medicine* 2009; 11; 257-266.
- (16) Yin H, Moulton HM, Scow Y, Boyd C, Boutilier J, Iverson P, Wood MJA. Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restores systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. *Human Molecular Genetics* 2008; 17; 3909-3918.
- (17) Ivanova GD, Arzumanov A, Abes R, Yin H, Wood MJA, Lebleu B, Gait MJ. Improved cell-penetrating peptide-PNA conjugates for splicing redirection in HeLa cells and exon skipping in mdx mouse muscle. *Nucleic Acid Research* 2008; 20; 6318-6428.
- (18) Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007; 357; 2677-86. Hoffman, EP. Skipping toward personalized molecular medicine. *N Engl J Med* 2007; 357; 2719-22.
- (19) Goyenvallé A, Vulin A, Fougère F, Leturcq F, Kaplan J-C, Garcia L, Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004; 306; 1796-99.
- (20) Arechavala-Gomeza V, Graham IR, Popplewell LJ, Adams AM, Aartsma-Rus A, Kinali M, van Deutekom JC, Wilton SD, Dickson G, and Muntoni F. Comparative Analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted exon skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. *Human Gene Therapy* 2007; 18; 798-810.
- (21) Wu B, Li Y, Morcos PA, Doran TJ, Lu P, Lu QL. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Molecular Therapy* 2009; 17; 864-71.
- (22) Denti MA, Rosa A, D'Antona G, et al. and Bozzoni I. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103; 3758-63. Denti MA, Incitti T, Sthandier O, et al, and Bozzoni I. Long-term benefit of adeno-associated virus/antisense-mediated exon skipping in dystrophic mice.
- (23) Kinali M, Arechavala-Gomeza V, Feng L, et al. and Muntoni F. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *The Lancet Neurology* 2009; 8; 918-928,
- (24) Aartsma-Rus A, van Ommen G-J B. Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *The Lancet Neurology*, published online 26 August 2009.
- (25) Goyenvallé A, Babbs A, van Ommen G-JB, Garcia L, Davies KE. Enhanced exon-skipping induced U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol. Ther.* 2009; 17; 1234-40.
- (26) Goyenvallé A, Babbs A, Powell D., Kole R., Fletcher S., Wilton SD., Davies KE. Prevention of Dystrophic Pathology in Severely affected Dystrophin/Utrophin deficient mice by Morpholino-Oligomer mediated exon skipping. *Mol. Ther.* 2009. (In press).
- (27) Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. and Lu QL. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nature Medicine* 2006; 12; 175-177.
- (28) Yin H, Lu Q, Wood M. Effective exon skipping and restoration of dystrophin expression by peptide nucleic acid antisense oligonucleotides in mdx mice. *Molecular Therapy* 2008; 16; 38-45.
- (29) Yin H, Betts C, Saleh AF, Ivanova GD, Lee H, Seow Y, Kim D, Gait MJ, Wood MJA. Optimisation of peptide nucleic acid antisense oligonucleotides for local and systemic dystrophin splice correction in the mdx mouse. *Molecular Therapy*, 2009, in press.

¡Gracias!

Estoy agradeciendo a todos aquellos quienes me han ayudado a escribir este informe, revisando entre mi resumen su trabajo y hacer cambios y adiciones donde fuera necesario: Annemieke Aartsma-Rus, Aurélie Goyenvalle, Judith van Deutekom, Kate Bushby, Terry Partridge, Francesco Muntoni, Irene Buzzoni, Qi Long Lu, Michael Gait, y Hans Schikan. Estoy agradeciendo también a TREAT-NMD y PPMMD por su apoyo financiero.

Este es **Ricardo Rojas** en Mazatlán en México, quien tradujo mi primer informe de investigación en 2000 en español y luego todos los otros 12, también. Usted puede



ver sus traducciones de mis últimos informes y entrevistas en mis páginas de internet. El también ha traducido este.

Él sabe de química, bioquímica, genética molecular y una gran cantidad de medicina que le permite cambiar todas mis palabras científicas en las correctas en español. Y sabe también lo que significa tener distrofia muscular, porque él mismo

tiene una: distrofia Becker. Estamos todos muy agradecidos por sus esfuerzos para que todas las familias que

hablan español conozcan los resultados de la investigación de Duchenne.

Pero muchos de mis informes han sido traducidos también a otros idiomas como el francés, italiano, eslovaco, holandés, polaco, checo, griego, turco, japonés, chino, y probablemente en otros los que no sé todavía.

Como uno de mis muchos traductores, le muestro a

Yumiko Yamauchi, que es una estudiante graduada en el Departamento de Pediatría de la Universidad de Kobe, en Japón. Su traducción de mi último informe de omisión de exón es muy bonito y me hace sentir como un analfabeto. ¡Gracias a todos ustedes!



Internet y listas de correo. Usted puede ver este informe actualizado en internet en www.duchenne-information.eu así como dos recientes entrevistas y otros informes. Si desea recibir todos mis futuros informes tan pronto como estén listos, por favor envíeme su dirección de correo electrónico para su inclusión en mis listas de correo en Inglés, Alemán, o Español que ya contienen más de mil direcciones.

Detalles moleculares de omisión de exón 51.

En la prueba clínica local en Holanda, se ha logrado omitir el exón 51. Aquí, los detalles moleculares de esta omisión de uno de los chicos son explicados, cuyo objetivo fue restaurar el marco de lectura que fue cambiado en el ARNm por la delección del exón 50 en el gen de la distrofina.

Parte de las secuencias de bases del exones 50 y 51 del ARNm del *gen normal de la distrofina* es mostrado así como el final del exón 49 y del inicio del exón 52. En el exón 50, 29 tripletas de bases no son mostradas y 52 en el exón 51. Debajo de cada tripleta, se muestra el nombre abreviado del aminoácido en la proteína distrofina que esta codificado por la tripleta. (La traducción hacia los aminoácidos ocurre en los ribosomas. Los aminoácidos no están unidos a los codones del ARN.) Las tripletas están seguidas una tras 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. Las tres bases que señalizan el codón de parada *oculto* UGA se muestra en rojo. El exón 50 finaliza después de la primera base de la última tripleta, que entonces es completada para formar la tripleta UCU con la primera y segunda base del exón 51, mostrada en azul.

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

codón de parada oculto

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

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

Cuando el exón 50 esta delecionado (eliminado) en el gen y también en el ARNm, el exón 49 es seguido directamente por el exón 51. Esto causa el cambio del marco de lectura en el exón 51 por un nucleótido a la derecha, con la consecuencia de que 8 aminoácidos incorrectos son incorporados en la distrofina, hasta que finalmente una señal de parada prematura UGA es alcanzada. La secuencia de bases cambiada y los aminoácidos erróneos son mostrados en rojo. La síntesis de distrofina es interrumpida prematuramente, queda incompleta, es destruida, y *distrofia muscular Duchenne* se desarrolla.

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

codon de parada activo oligorribonucleotido en antisentido

UC-UUU-ACG-GUA-GAA-GGA-ACU

-CUC-UGG-UGA-CAC AAG----	AAC-UAG-AAA-UGC-CAU-CUU-CCU-UGA-UGU-UGG--
leu trp Alto!	

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

El oligorribonucleótido en antisentido para omisión de exón, AON PRO051, usado por los investigadores holandeses, es mostrado en color azul unido por el emparejamiento de bases Watson-Crick a 20 bases en el exón 51. Este induce la omisión del exón 51 en el ARNm del *gen mutado* que, en este ejemplo, no contiene la secuencia del exón.

Si, en adición del exón 50 delecionado, es removido el exón 51 por omisión, entonces el exón 52 estara directamente conectado con el exón 49. El marco de lectura no es alterado más porque el exón 49 termina y el exón 52 empieza con un codón completo de tres bases.

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

Ninguna señal prematura de parada aparece en el exón 52 o posterior, pero 77 aminoácidos están faltantes en la proteína, aquellos cuya información genética fue portada por la secuencia de bases de los exones 50 y 51. Están faltantes en la parte central de la distrofina acortada, que, sin embargo, todavía será probablemente parcialmente funcional y por lo tanto da lugar a distrofia Becker moderada, en lugar de distrofia Duchenne severa.