

El salto de exón (omisión de exón, exon skipping) para el tratamiento de la distrofia muscular Duchenne.

Entrevista con la Dra. Annemieke Aartsma-Rus. Centro Médico de la Universidad de Leiden, Holanda.

El 1 de abril, en el 20º Congreso del Concilio Científico de la "Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke" (asociación alemana de pacientes con enfermedades musculares) en Ulm en Alemania, yo, Günter Scheuerbrandt, PhD, grabé la siguiente entrevista con la Dra. Annemieke Aartsma-Rus (profesora asociada del Centro Médico de la Universidad de Leiden) sobre el estado actual de la técnica de salto de exón para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, que actualmente está siendo probada en ensayos clínicos con pacientes, para comprobar si esta técnica es segura y efectiva. Esta técnica, en la que el equipo de la Dra. Aartsma-Rus es muy activo, es el más desarrollado de todos los enfoques de investigación y podrían dar lugar a un tratamiento efectivo para muchos pacientes con Duchenne en el futuro no muy lejano.

El siguiente texto es una versión editada de la entrevista oral. Ha sido aprobado por la Dra. Aartsma-Rus para su publicación y actualizada en diciembre 2011. Mis preguntas están en cursiva, las respuestas de la Dra. Aartsma-Rus en letra normal. El nombre científico de los fármacos potenciales de salto de exón es *oligoribonucleótido en antisentido*, que a menudo es abreviado como *oligo en antisentido* o *AO*, también en este texto.

Introducción.

Vamos a hablar del salto de exón en esta entrevista que principalmente será leída por las familias de chicos y hombres jóvenes con Duchenne. He explicado los detalles de esta técnica en mis informes de investigación que se pueden ver en Internet en www.duchenne-information.eu. Así que muchos de los lectores sabrán lo que es el salto de exón y no tengo que explicarlo aquí. Vamos a concentrarnos, por lo tanto, en las pruebas clínicas con chicos con Duchenne de esta muy prometedora técnica y sus resultados que darán lugar, esperemos que pronto, a una terapia eficaz para la que todos estamos esperando. Pero, por favor, Annemieke, comienza con la introducción de ti misma.

Desde el año 2000, he estado trabajando en el Centro Médico de la Universidad de Leiden en el Departamento de Genética Humana, en el que actualmente lidero el grupo de cerca de 10 personas que trabaja en el salto de exón. Nos centramos en el desarrollo del salto de exón para la distrofia muscular Duchenne.

Los ensayos clínicos para saltar el exón 51.

El Profesor Gertjan van Ommen, director del Departamento de Genética Humana, dijo en 2004 en una entrevista que grabé con él en Mónaco, que tomaría unos 10 años hasta que los primeros fármacos de salto de omisión de exón estuvieran listos para los chicos con Duchenne.

Creo que fue una buena estimación, porque estamos cerca de algo ahora. Pero sólo con el salto del exón-51 se puede hacer esta estimación. La fase-III de ensayo del exón 51 con 180 chicos con Duchenne está reclutando pacientes. Es controlado por placebo, y se espera demuestre que el salto de exón es efectivo y seguro. Para la aprobación de registro y la comercialización, los resultados tendrán que ser presentados a las agencias reguladoras, la EMA en Europa y la FDA en los EUA, que evaluará estos. Esta discusión se centrará en muchas cosas, pero principalmente en la eficacia y la seguridad. En general, en los ensayos, hay efectos secundarios. La pregunta es si están relacionados con los fármacos o no, y esto puede ser evaluado mediante la comparación de los efectos secundarios en el grupo de placebo y el grupo de tratamiento.

El análisis de los resultados y la solicitud de registro

llevará algún tiempo después de que la prueba se haya completado. Y entonces, posiblemente, se podrá comprar en la farmacia para aquellos que necesitan la omisión del exón 51.

Sólo estarán disponibles para los niños que necesitan el salto del exón-51.

Los ensayos clínicos para omitir los siguientes exones.

Entonces el siguiente salto a desarrollar será para el exón 44.

Sí, la omisión del exón 44 está ahora en una fase I/II de ensayo con un pequeño grupo de niños, pero los resultados no se tienen todavía. Por lo tanto, no sabemos todavía si el fármaco para omitir el exón-44, el oligo en antisentido o AO-44, conduce a la restauración de distrofina. Además, no sabemos si un ensayo de fase III se requerirá.

¿Esto significa que tal vez no sea necesario que los niños estén con placebo para el salto del exón-44?

Tal vez, porque si sabemos que el salto del exón-44 lleva a la restauración de la distrofina, y si sabemos que la restauración de distrofina conduce a mejora funcional basada en los resultados del salto del exón 51, se podría cuestionar si un ensayo controlado por placebo se necesita para saltar exón 44. Si los ensayos controlados con placebo no son necesarios, entonces el salto del exón-44 pueda estar disponible cuanto antes.

¿Este ensayo es también una cooperación entre Glaxo-SmithKline, GSK, y Prosensa?

Prosensa lo hace solo en el momento. Para el exón 51, GSK y Prosensa trabajan juntos. GSK tiene una opción para el exón 44. Actualidad (12/2011): Prosensa trabaja ahora con GSK para el desarrollo del exón 44.

¿Y los exones siguientes serán el resto de la lista de prioridades?

Prosensa prepara ensayos pre-clínicos para saltar los exones 45, 53, y también para los exones 52 y 55. Para los exones 45 y 53, ensayos clínicos están expectados a empezar en 2012.

Prueba de caminata de 6-minutos para medir la función muscular.

En cuanto a la prueba del exón 51: si nos fijamos en la publicación de los detalles del ensayo en las páginas de

Internet de los NIH, dicen la prueba de caminata de 6 minutos es la medida de resultado primario, no mencionan la determinación de la distrofina. ¿Cuál es la razón de esto? ¿Es demasiado difícil probar la fiabilidad de la distrofina?

Un medicamento no puede ser aprobado sólo porque restaure la distrofina. Un medicamento sólo puede ser aprobado si hay mejora funcional. La mejoría funcional puede decir que los chicos mejoran, o puede significar que la progresión de la enfermedad disminuye. Para la medición de resultados funcionales, sólo hay algunas técnicas que son validadas y autorizadas por los organismos reguladores. La prueba de caminata de 6 minutos es una prueba validada que están dispuestos a aceptar para el registro de un medicamento. Si desea utilizar otra prueba, entonces usted tiene que validarla, lo que puede llevar años. Por lo tanto, es más fácil y más rápido utilizar la prueba de caminata de 6 minutos.

Esta prueba se está desarrollando para la distrofia de Duchenne?

La prueba de caminata de 6 minutos fue desarrollada para pacientes con enfermedades del corazón, no para trastornos neuromusculares. La compañía Genzyme la uso para encontrar la medicina para la enfermedad de Pompe. Ellos fueron los primeros en demostrar que se puede utilizar como medida de resultado de un trastorno neuromuscular. Y entonces la Compañía de PTC en Nueva Jersey la validó con los chicos con Duchenne.

Después de que el estudio de PTC para su fármaco Ataluren que lee a través de los codones de parada pre-maturos, que en realidad no funcionan, ellos han publicado la prueba de caminata de 6 minutos realizada durante el ensayo, y uno podía realmente ver por la línea de descenso en una gráfica que la dosis más baja de Ataluren tuvo un efecto mejor que el más alto.

Lo que pudimos ver en la publicación del ensayo del Ataluren, es que los muchachos en el grupo de placebo empeoraron durante las 48 semanas del ensayo. Esa es la historia natural de la enfermedad, pero puede haber un efecto placebo y la historia natural real podría haber sido aún peor. Para los niños tratados en la presente fase III de prueba del exón 51, esperamos que la línea de la disminución sea menos pronunciada, o que algunos niños incluso mantengan su función, y en el mejor de los casos, incluso sean mejores.

Tenemos algunos datos más del ensayo fase I/II de Pro-sensa: todos los niños que participan ahora en el estudio de extensión donde reciben la dosis más alta del ensayo, 6 mg/kg una vez a la semana. Ellos han sido tratados durante más de 18 meses y este estudio va a continuar. Y sabemos que después de 3 a 6 meses, la mayoría de ellos lo hicieron mejor. Pero, por supuesto, en un ensayo de extensión, el efecto placebo puede ser grande, porque todos los niños saben que están siendo tratados y también saben que sólo se trataría si había la restauración de distrofina en el ensayo inicial. Aunque no podemos descartar este efecto placebo, los datos parecen muy alentadores. Nathalie Goemans del Hospital Universitario en Leuven, Bélgica, ha presentado recientemente los datos de la caminata de 6 minutos de los pacientes después de 96 semanas de tratamiento, y muestran que el efecto en la mejora de los resultados funcionales parece persistir.

¿Se harán biopsias durante el estudio de extensión?

Hubo una biopsia realizada a los 6 meses después del ensayo en sí. No sé si habrá otras biopsias. Una biopsia muscular es muy invasiva y dolorosa, por lo que no es algo que puede hacer cada mes, cada 6 meses o cada año. Después de todo, los chicos no tienen muchos músculos en el comienzo del estudio. Queremos limitar las biopsias tanto como sea posible.

Y una biopsia muscular sería necesaria si se quiere averiguar si el fármaco para saltar conduce a la producción de distrofina nueva y su ARN mensajero durante el tratamiento. Pero ambos, el ARN mensajero y la nueva distrofina, son difíciles de detectar. Hay muchas variaciones de los procedimientos de prueba, cada laboratorio tiene su propia variedad. Como ya he dicho, cada medida de resultado tiene que ser validado para el proceso de registro, y que tomaría muchos años para desarrollar métodos estandarizados para el ARN mensajero y análisis de distrofina. Los investigadores que trabajan en el salto de exón están tratando de estandarizar la evaluación de los niveles de la distrofina, pero esto va a ser difícil.

Así que, para solucionar este problema, ahora estamos trabajando en un proyecto para encontrar biomarcadores en el suero sanguíneo. Se trata de un proyecto de la UE con otros científicos en Europa. Se llama BIO-NMD y dirigido por Alessandra Ferlini en la Universidad de Ferrara, Italia, www.bio-nmd.eu. Si sabemos que los niveles de ciertas proteínas son más altos en el suero de pacientes con Duchenne y estos niveles bajan después que la distrofina se hace, estos niveles pueden actuar como un marcador indirecto. Es mucho más fácil tomar un poco de sangre cada seis meses, que hacer una biopsia muscular.

Ensayo clínico para saltar el exón 50.

Se que AVI Biopharma en los EUA se concentra en la omisión del exón 50.

Tengo que basar mi información en comunicados de prensa. Así que sé que para el salto del exón 50, se desarrolló un oligo morfolino en antisentido péptido-conjugado. Aurélie Goyenvalle en el laboratorio de Kay Davies en Oxford, utiliza un oligo morfolino modificado para saltar el exón 23 en un modelo de ratón de distrofia muy grave que no tiene ni distrofina ni utrofina. Funcionó muy bien en estos ratones que toleran el fármaco modificado muy bien. El problema es que no somos ratones. Cuando AVI fue probado en monos, hubo algunos problemas de toxicidad. Así que no sé si ahora están tratando de optimizar el fármaco cambiando el péptido y que sea menos tóxico. No sé si dejaron de trabajar en el desarrollo clínico de morfolinos péptido-conjugados totalmente o si sólo lo retrasaron.

AVI junto con los investigadores británicos en torno a Francesco Muntoni y Kate Bushby realizó hace un año, otro estudio fase-Ib/II sistémico para saltar el exón 51 con su oligo morfolino en antisentido que ahora se llama Eteplirsén. Los resultados preliminares se han reportado en la reunión de la Academia Americana de Neurología en Honolulu en abril 2011.

Los diferentes tipos de oligos en antisentido.

Vamos a discutir ahora los dos tipos de oligos en antisentido utilizados principalmente en los ensayos clínicos actuales.

Ellos tienen diferentes composiciones químicas y las químicas tienen características diferentes. Sus nombres son: AOs 2'O-metil fosforotioatos, también llamados 2O-metilos que son utilizados por Prosenza/GSK, y AOs morfolinicos utilizados por AVI. Si se les inyecta por vía intravenosa o subcutánea, entran en el torrente sanguíneo y se eliminan por los riñones. Son moléculas pequeñas, tan pequeñas que son filtradas hacia afuera. Esto es cierto para todos los AOs. La ventaja de los 2O-metilos es que su columna vertebral de fosforotioato se une a las proteínas séricas. Entonces, las proteínas del suero sanguíneo actúan como un transportador. Los AOs no unidos se eliminan por los riñones, pero el AO unido al suero es protegido y por lo tanto la vida media sérica de los AOs 2'O-metilos es mucho mayor, varias semanas. Por el contrario, los morfolinicos son incapaces de unirse a las proteínas séricas y, por tanto se filtran hacia afuera mucho más rápido. La vida media sérica de los morfolinicos es sólo entre 2 y 4 horas. Esa es una gran diferencia entre los morfolinicos y los 2O-metilos.

Si se comparan los resultados del ensayo de los morfolinicos y el ensayo de los 2'O-metilos, verá que los morfolinicos actúan más localmente, mientras que los 2'O-metilos conducen a una restauración de la distrofina más homogénea. La razón probablemente es que los 2O-metilos tienen una mayor probabilidad de ir al músculo ya que están presentes ya en el suero. Los morfolinicos tienen una muy breve ventana de oportunidad, o bien van a los músculos y son muy efectivos, o son filtrados por el riñón antes de que tengan la oportunidad de hacer nada. No sabemos a ciencia cierta si esta es la razón principal de la diferencia.

Los morfolinicos son más costosos, ¿no?

Son más costosos para hacer que los 2O-metilos y dosis más altas son necesarias, por lo tanto son más costosos, pero están fuera de patente ahora, por lo que deberían ser menos costosos de lo que solían ser.

¿Qué tal el trabajo de Luis García de salto de exón con transferencia de genes?

Por supuesto, la ventaja de la transferencia de genes es que usted tiene que tratar una sola vez, y luego esta medicina genética está ahí para siempre. El problema en este momento es que no es muy eficiente. Aunque se puede tratar a todos los músculos en un ratón entero, un ratón pesa sólo 20 gramos. Por el momento es muy difícil de tratar toda una extremidad en un ser humano porque hay que inyectar los vectores de virus en una arteria bajo presión. Ese es el primer problema: no se puede tratar todo el cuerpo de un niño a la vez en este momento. Hay algunos riesgos con la terapia génica, ya que si es tóxico, no se puede detener. Con los fármacos de salto de exón puede detener el tratamiento, y los AOs se eliminan del cuerpo y se puede utilizar otro, quizá aún más optimizado. Sin embargo, si la terapia génica demuestra ser eficaz y segura, entonces por supuesto que sería más atractivo: un único tratamiento. Pero no estamos allí todavía.

Salto de exón para mutaciones diferentes.

Ahora, ¿podría decir algo acerca del salto de exón para mutaciones diferentes del gen de la distrofina?

Lo que ahora se está desarrollando es el salto de un solo exón. La mayoría de las deleciones del gen de la distrofina necesitan el salto de un solo exón. Pero también hay algu-

nas deleciones que necesitan doble salto de exón. Las mutaciones puntuales están más a menudo en exones fuera del marco de lectura, que en exones dentro del marco de lectura, porque hay más exones fuera del marco de lectura que dentro del marco en el gen de la distrofina. Si está en un exón dentro del marco de lectura, tendrá que saltarse sólo un exón. Pero más a menudo usted necesita saltar dos exones cuando la mutación se encuentra en un exón fuera del marco de lectura.

Sabemos por experimentos en cultivos celulares y modelos animales que saltarse dos exones es posible. Pero no sabemos todavía cómo hacer ensayos clínicos de dos exones porque los organismos reguladores podrían pedir más estudios de toxicidad o tal vez nos permitirá hacer cócteles de fármacos antisentido que ya están registrados. O, tal vez, podríamos hacer inyecciones separadas de dos AOs. Eso sería más fácil conseguir a través del proceso de aprobación que utilizar cócteles.

Pero no sabemos todavía lo que las agencias reguladoras dirían de un muchacho que tiene una deleción de, por ejemplo, los exones 46 al 50 y por lo tanto se necesita saltar los exones 51 y 45, que es bastante común. Por lo tanto, el salto del exón 51 está en desarrollo, y el salto del exón 45 está alto en la lista de prioridades. Cuando ambos estén disponibles, ambos pueden ser recetados y tomados. No sabemos todavía cómo lidiar con el doble salto de exón desde una perspectiva regulatoria.

¿Y cómo reparar las duplicaciones?

Las duplicaciones son muy difíciles. El problema es que los AOs reconocen ambos exones que son exactamente iguales. Así que si desea saltar uno de los dos, saltará a ambos. Para duplicaciones de un solo exón, puede haber una salida, porque puede saltarse un tercer exón antes o después de los duplicados, y restablecer así el marco de lectura. Pero para las grandes duplicaciones, se vuelve muy complejo y muy difícil por lo tanto, pero estamos trabajando en ello. Así que el salto de exón simple y doble de deleciones y mutaciones puntuales pudiera estar disponible en 10 años, o tal vez en 15 años, pero para las duplicaciones se llevará con toda probabilidad, mucho más tiempo o pudiera no ser posible hacer el salto de exón en duplicaciones.

Salto de exón de mutaciones raras.

Pero, ¿es esta estimación de tiempo también para saltar un solo exón en los niños con mutaciones raras?

Sí, pero este es otro problema, porque hay muy pocos pacientes en el mundo para cada uno de los más de 100 grupos de niños con mutaciones raras. Entonces es muy difícil desarrollar algo, incluso si usted quiere hacer ensayos clínicos, porque son tan pocos los pacientes se vuelve estadísticamente muy problemático.

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

Teóricamente puede haber más de mil pacientes en algunos grupos de niños con una mutación rara, pero no los conozco.

Estoy tratando de interesar a la organización de Rotary a la que pertenezco, que me ayude a conseguir información de los pediatras de todo el mundo. Y a través de ellos, podríamos entrar en contacto con estas "familias Duchenne" desconocidas en los países en desarrollo.

Creo que es una buena iniciativa, y también es sorprendente que en muchos países donde uno no lo espera, hay uno o dos laboratorios que hacen muy buen diagnóstico de ADN. Yo estaba en Rumanía hace dos semanas, y vi que hay un laboratorio de genética que hace análisis de la mutación con la moderna tecnología de MLPA. En la India también hay laboratorios donde pruebas de MLPA se están haciendo. Como Duchenne es una enfermedad rara, por lo general el diagnóstico de Duchenne se hace solamente en un solo lugar para todo el país como en Holanda o para una región.

¿Existe una lista con estos laboratorios en los diferentes países? Estoy recibiendo muchos e-mails con preguntas en las que estos laboratorios estén.

Hay una lista en Internet con los lugares donde podría haber diagnóstico por ADN que se hace no sólo para Duchenne, sino para otras enfermedades también, para Europa la dirección es www.eurogentest.org.

Otros enfoques de investigación.

Ahora vamos a hablar de los otros métodos que también se están desarrollando y que podría ayudar a los pacientes en los que el salto de exón no puede ser una terapia.

Sí, por ejemplo el Idebnone, que puede cuidar de la calidad del corazón y los músculos respiratorios, y quizás también de los músculos esqueléticos. BioMarin estaba desarrollando un fármaco para aumentar la utrofina, pero se detuvo el desarrollo ya que en voluntarios sanos, los niveles en sangre del fármaco eran demasiado bajos. Los problemas del aumento de utrofina muestra de nuevo que si hay algo que parece muy prometedor en los ratones, entonces, la realidad es a menudo diferentes en los seres humanos. Es muy fácil de conseguir concentraciones suficientemente altas en ratones, pero en los seres humanos será diferente. ¿Por qué? Nosotros no somos ratones. Esto significa que si las cosas se ven muy prometedoras en ratones, hay que ser conscientes de que somos mucho más grandes que los ratones y también diferentes, y que la mayoría de las técnicas que funcionan en ratones no funcionan en los seres humanos.

Para el salto de exón, GSK está en una fase III de ensayo y estudios revelaran si esta técnica funciona. Para los otros enfoques, que están en fases más tempranas, es muy

Annemieke Aartsma-Rus, PhD.
a.m.rus@lumc.nl
www.dmd.nl/gt

Traducción al español por:
Ricardo Rojas Caballero
distrofiamuscular@yahoo.com.mx
<http://www.distrofia-mexico.org>

difícil hacer cualquier predicción de si funcionará o no. Porque de nuevo, si hay algo que parece muy prometedor en ratones u otros animales, podría no funcionar en humanos. Estamos trabajando en el salto de exón desde hace más de diez años, y todavía no estamos ahí. Así que demuestra que se necesita mucho tiempo, hasta que se encuentra algo que funciona, así que es muy difícil hacer cualquier predicción sobre cuándo una determinada técnica se convierte en un medicamento seguro y eficaz contra la distrofia muscular Duchenne.

Vivir con Duchenne.

Para terminar nuestra entrevista, tengo una pregunta difícil: ¿Realmente vale la pena prolongar la vida de los pacientes con Duchenne mayores y muy discapacitados con todos los métodos modernos de manejo médico?

Creo que es buena pregunta. Y sólo hay una persona a quien se le puede preguntar: el propio paciente. El paciente tiene que decidir si quiere o no tratamiento y atención. Desde nuestra perspectiva, sólo es capaz de mover el dedo o levantar el dedo y mover los ojos, puede parecer una situación horrible. Pero sé que los pacientes que están en esa situación, y dicen: "mi vida es muy valiosa para mí, me gusta mi vida, y tengo una computadora, puedo ir al teatro, puedo ir al cine, puedo ir a los partidos de fútbol, y estoy feliz".

Creo que si un paciente es feliz y quiere vivir, entonces es su decisión. Pero si él dice: "Yo no quiero vivir, no quiero este tipo de vida", entonces también es su decisión. Y una vez que es un adulto, que puede tomar esta decisión, por no continuar con la atención. La actitud positiva de los pacientes con Duchenne te hace muy avergonzado por la queja que nos hacemos, mientras que somos capaces de caminar y de hacer todo, y este paciente sólo tiene tan poco, y pesar de esto, él está muy contento y feliz.

Y si uno mira hacia atrás hace 20, 30 años, los pacientes con Duchenne no tenían ventilación asistida entonces. Ahora que la tienen y la calidad de vida mejora mucho, porque tener suficiente aire es muy agradable. No sólo la duración de su vida mejoró, sino también su calidad, y eso es lo que cuenta más. Por lo tanto, si quieres una respuesta honesta y convincente a su pregunta, por favor pregúntele al niño o joven con distrofia de Duchenne mismo.

Con tan comprensiva respuesta a mi última y no fácil pregunta, concluimos nuestra discusión sobre el salto de exón, la investigación más avanzada en Duchenne, y también en nombre de todas las familias y los pacientes, que leerán lo que dijo a ellos aquí - Le estoy dando las gracias por sus explicaciones y todo lo que usted y sus colegas están haciendo para encontrar una terapia para "nuestros muchachos".

Günter Scheuerbrandt, PhD.
gscheuerbrandt@t-online.de
www.duchenne-information.eu