

## Omisión de exón (Exon Skipping), una terapia para distrofia muscular Duchenne.

### Entrevista con el Dr. Gerard Platenburg, Presidente de Prosensa B.V. Leiden, Holanda.

Esta entrevista fue grabada en Filadelfia por mí, **Guenter Scheuerbrandt** PhD., el 19 de Julio de 2008, en la reunión anual del PPM, el Parent Project Muscular Dystrophy Norteamericano. El siguiente es un texto editado y versión abreviada de la entrevista hablada. Ha sido aprobado por el Dr. Platenburg para la información de los pacientes, sus familias y cuidadores. Mis preguntas están escritas en cursiva, las respuestas del Dr. Platenburg en letra normal. Los capítulos sobre la prueba clínica en Holanda, tal como aparecieron en mi último informe, "Enfoques de investigación para una terapia de distrofia muscular Duchenne" se muestran al final de este texto y deben leerse como una introducción a esta entrevista.

*En esta entrevista, no debemos repetir lo que ya he explicado acerca de la omisión de exón en mi último informe de investigación de Duchenne, sino más bien hablar sobre el futuro, un mayor desarrollo de esta técnica, que parece sera el más lejano de todos los enfoques de investigación.*

**La prueba sistémica de omisión de exón.** *Ahora, ustedes han terminado la primera prueba clínica local, y están empezando la prueba sistémica.*

Sí, hemos iniciado la prueba sistémica en mayo de este año. Los chicos reciben el oligonucleótido en antisentido, AON, para omitir el exón 51 con inyecciones subcutáneas, bajo la piel. Esta prueba es un estudio de dosis escalada donde probaremos diferentes niveles de dosis, de medio a diez miligramos por kilogramo de peso corporal, se inyecta una vez por semana durante cinco semanas.

*He calculado que para un niño de 30 kg que reciba 10 mg/kg significará 300 mg cada semana.*

Sí, 300 mg a la dosis mas alta, esto no sería más sustancia de lo que un comprimido de aspirina tiene. Comenzamos con la dosis más baja, y si es segura para pasar a la siguiente dosis, lo haremos. Cada semana, otro de los 12 niños tendrá la primera de sus cinco inyecciones. Y tenemos el permiso para ampliar el estudio con otros tres chicos si queremos optimizar mejor el nivel de dosis. La inyección subcutánea se ha elegido, porque esa sería la manera más cómoda de aplicar el medicamento, y el médico de familia puede hacerlo.

*Y al final de la prueba, cuando se ha pasado a través de todos los niños, usted tiene que esperar a que distrofina acortada aparezca. ¿Eso significa que usted tendrá que hacer biopsias?*

Sí, vamos a hacer biopsias, sin embargo no en todos los chicos antes de la prueba, pero en cualquier caso después.

*Y ¿Los chicos son todos de alrededor de los centros de estudio en Suecia, Bélgica, y Leiden? Yo pregunto porque estoy a menudo recibiendo preguntas de las familias en Polonia, Pakistán, y otros lejanos países: "¿No podemos tomar parte también?"*

El protocolo tiene criterios de inclusión. Son los doctores quienes nos dicen que tanto un niño está incluido o no. Por lo tanto, es el investigador que toma la decisión. No tengo algo que decir sobre eso. Nuestra empresa es sólo el patrocinador. Si un niño se alistó en un hospital local cerca de un centro de estudio, entonces hay una buena oportunidad de que él sea incluido. Los chicos necesitan estar en una instalación del hospital. Usted no puede volar en ellos desde Afganistán.

*Y de todos modos, al menos en las pruebas locales, no se esperaba un beneficio clínico. Pero aquí después de la inyección sistémica, ¿Puede haber mejoría funcional?*

Sí, podría ser, eso espero.

*Según entiendo, ustedes intentan alcanzar alrededor del 20% al 30% de la cantidad normal de distrofina.*

Yo sería muy feliz, si obtenemos eso.

*En el estudio local, encontraron sólo alrededor del 3% al 12% de la cantidad normal en el resto de las fibras musculares.*

Sí, pero creo que es muy difícil de comparar. En el estudio local, sólo había una única inyección, es muy localizado. Cuando usted toma una biopsia después del tratamiento, se obtiene una gran cantidad de tejido muscular sin tratar del sitio de la inyección. Por lo tanto, estos resultados podrían ser una subestimación. Y podría haber un montón de otras cosas que podían haber interferido con el análisis. Este primer estudio mostró que la omisión de exón funciona en el músculo de un niño. No repetiremos el estudio, estamos contentos con los resultados, y ahora el desarrollo real comienza. Y esperamos un beneficio clínico con la prueba sistema.

**Los siguientes exones a ser omitidos.** *En todos los niños que tomen parte en esta prueba sistémica se necesita omitirse el exón 51. ¿Qué exones serán los próximos cuya omisión se desarrollará?*

Tenemos dos moléculas en antisentido en desarrollo para omitir los exones 51 y 44. Mientras financieramente podamos hacerlo, vamos a desarrollar hasta la etapa de concepto, que uno ve beneficio. Y luego también hemos

identificado AON's para omitir otros exones que necesitan ser desarrollados, además de los dos. En esta lista inicial son los exones 43, 45, 46, 50, 52 y 53. Ya han hecho los AON's para cada uno de ellos.

*¿Qué hay de los otros exones, especialmente los que están al comienzo del gen de la distrofina?*

No puedo excluir cualquier exón que no este en la lista inicial. Es necesario que usted tenga una lista inicial para mirar hacia el futuro. Tenemos un concepto, y que se ha presupuestado, y que tomara a tantos exones si podemos hacerlo, es una cuestión de finanzas y personas.

*Sin embargo, la propia prueba actualmente se está realizando en tres centros clínicos ¿Son las personas de allí pagadas por su empresa?*

No, ellos son empleados de los hospitales, pero contribuimos con los gastos de la prueba.

*¿Qué tanto la prueba sistémica costo a su empresa?*

Millones de euros.

**La siguiente prueba clínica.** *¿Qué hay de repetir inyecciones más tarde? ¿Verán esta cuestión también cuando se este realizando la presente prueba?*

Esa será la siguiente fase, una fase IIB de prueba. Pero no esta aún plenamente planificada. No tuvimos ninguna discusión con los reguladores a los cuales todavía tendremos que preguntar de nuevo para su aprobación. Esa nueva prueba será la prueba pivotal en la que vamos a tratar muchos más niños, alrededor de 100, por lo menos seis meses.

*¿Cuánto tiempo va a tomar la presente prueba y la nueva prueba IIB?*

La presente prueba tomará aproximadamente hasta finales de este año y la prueba IIB, creo tomara al menos nueve meses. Pero después de que se realicen las inyecciones de la presente prueba, los resultados han de ser analizados antes de que podamos comenzar con la gran prueba IIB.

**¿Cuándo los AON's estarán listos?** *¿Recuerda nuestra primera entrevista acerca de la omisión de exón en Mónaco en 2004, cuando el profesor Gertjan van Ommen dijo, que tomaría unos 10 años - que sería el 2014 - hasta que los primeros AON's estén listos para los pacientes? ¿Es más o menos realista?*

Creo que es realista. Pero creo que si tenemos el apoyo de los reguladores y los datos son lo suficientemente buenos para que podamos realmente mostrar un claro beneficio, entonces puede fácilmente ser un poco más rápido.

**Las autorizaciones necesarias.** *¿Basta con la aprobación de los reguladores holandeses, o también de otros?*

Para las pruebas, sí. Pero para llevar el producto al mercado, tenemos que ir a través de la EMEA y la FDA americana.

*Todavía hay una discusión sobre si todo el procedimiento de autorización será necesario para cada AON solo o no. ¿Hay alguna esperanza de que una aprobación general sea suficiente?*

El presente programa total será de dos productos. Si estos son seguros y eficaces, entonces vamos a tratar de convencer a los reguladores que debería haber una posibilidad para la vía rápida los demás, para acortar el procedi-

miento para los que vendrán después de los exones 51 y 44.

*Y, ¿que incluyen más de la lista inicial?*

En principio, sí.

**La producción de los AON's.** *¿Quien produce los AON's? Creo que, una vez usted me dijo que se están realizando por su empresa.*

Parte de la producción es realizada por grupos externos en los Estados Unidos. Y parte de ella se puede hacer en el futuro por nuestra empresa.

*Por lo tanto, este va a ser realmente su primer producto para la terapia de DM Duchenne.*

Creemos que la tecnología también puede aplicarse a otras enfermedades. Por lo tanto, estamos desarrollando moléculas y posibilidades de tratamiento para la distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, y la enfermedad de Huntington, que posiblemente pueden ser tratadas por la interferencia del empalme del ARN. Pero esas están más en una etapa temprana de investigación. Los AON's contra Duchenne serán nuestros primeros productos de entrar en la clínica.

**El precio de los AON's.** *¿Sabe usted algo sobre el costo? Usted necesitará kilogramos de los AON's en forma pura. Por ejemplo, ¿cuánto va el costo de una inyección, o un tratamiento para un mes o un año?*

El precio depende de muchos factores: en la forma en que usted introducirá los productos, cuánto dinero hemos invertido, y en muchas más cosas. Sería difícil para mí dar cifras. Pero no va a ser realmente barato el tratamiento. Hay que ser realista. Quiero decir, estamos invirtiendo mucho, pero si el beneficio esta allí, un alto precio valdrá la pena.

*Pero hasta donde yo entiendo, en nuestro sistema de seguro médico en Alemania, si un tratamiento es demostrado eficaz y ha sido aprobado, los seguros tienen que pagar, aunque sea muy, muy caro.*

Es lo mismo en muchos otros países, también en Holanda.

**La comercialización de los AON's.** *Una vez calcule que hay aproximadamente medio millón de chicos con Duchenne viviendo en el mundo. ¿Cuántos de ellos necesitan la omisión del exón 51?*

15% de todos los niños necesitan la omisión del exón 51. Eso sería 75,000, pero para ser realistas, yo diría que el mercado inicial será de unos 10,000.

*¿Tiene previsto vender los AON's ustedes mismos, o van a tener distribuidores?*

Esa es nuestra ambición, sí. Pero la posibilidad de asociarse con otras empresas aún está allí. Vamos a tratar de poner el producto en la medida de lo que podamos. Pero nunca se sabe cómo van estas cosas.

**La estructura de las nuevas distrofinas.** *Ahora la pregunta acerca de los diferentes tratamientos de omisión de exón para diferentes delecciones. Ustedes tendrán diferentes proteínas acortadas en los niños con diferentes delecciones. ¿Saben ustedes que distrofinas acortadas se producirán?*

Sabemos de algunas de ellas, especialmente las que se

produjeron en los niños tratados en la primera prueba. Pero no conocemos todas las que se producirán en otras omisiones, y si realmente todas ellas darán lugar a síntomas de la distrofia de Becker.

**Multi-omisión de exón.** *Muchos pacientes necesitarán que más de un exón sea omitido. ¿Están trabajando también en la multi-omisión de exón? Hay una propuesta teórica que omitir los 11 exones entre el 45 a 55 sería una terapia para el 63% de todos los pacientes con distrofia de Duchenne. Y el profesor Terry Partridge está trabajando con perros distróficos que necesitan multi-omisión de exón.*

Sí, pero un perro es un perro. Estamos trabajando en multi-omisión de exón también, pero es muy retardador. La omisión de 11 exones a la vez sería grande. Si tuviéramos una buena combinación para hacer eso, un cóctel de AON's, podríamos hacerlo. Hasta ahora, no tenemos nada disponible que funcione.

**Los dos tipos de AON.** *Ustedes están trabajando con los 2'O-metilios. ¿Cuál es la razón para usarlos cuando los británicos y Steve Wilton piensan que los morfolinios son más eficaces? Pero no entran en el corazón, sólo, quizás, cuando se irradia el corazón con ultrasonido.*

La razón para nosotros es que tuvimos que tomar una decisión sobre la base de datos que teníamos en el momento en que comenzó, y los datos fueron que los 2'O-metilios trabajaron muy bien en nuestras manos. Combinado con el hecho de que pueden producirse fácilmente y bastante barato, tomando la decisión de avanzar con ellos, porque el proceso de desarrollo de productos es muy complejo y muy largo y costoso. Usted no cambia su estrategia todos los días. Lo que hacen otros, es la optimización. Si hay realmente una mejor manera de hacerlo, entonces yo estaría abierto a ello. Pero entonces sería como cuando empezamos hace tres años. Por lo tanto, estamos comprometidos a avanzar con los 2'O-metilios que, por cierto, estamos

optimizando, también.

**La empresa Prosensa.** *¿Puede decirnos algo acerca de su empresa Prosensa? ¿Es independiente? ¿Cómo se financian, se pueden comprar acciones? y, en caso afirmativo, ¿a qué precio?*

Somos una empresa privada independiente, por lo que no puede comprar ninguna acción, todavía no. En cuanto a la financiación, tenemos muchas organizaciones de padres ayudándonos, y sin la ayuda de estas organizaciones, no estaríamos aquí. Tenemos también algunas empresas de capital de riesgo, que nos están apoyando. En este momento, estamos bien financiados para la actual prueba, y estoy tratando de recaudar más dinero para la próxima, la prueba pivota.

*¿Cuántas personas están trabajando en su empresa?*

Tenemos ahora unas 30, por lo que son muy jóvenes aún, pero vamos a estar creciendo rápidamente, si esto va bien.

**Algunas palabras finales.** *Al final de esta entrevista, ¿podría por favor decir algunas palabras finales, no a mí, sino a los pacientes y sus familias?*

Sí, me siento muy positivo. Los datos de la primera prueba clínica muestran que llevamos los AON's al tejido muscular y que la omisión de exón funciona en los chicos. Serán tiempos muy emocionantes ahora, en los próximos meses, para ver si la inversión de años de intenso trabajo y de capital sustancial ha dado sus frutos. Creo que hemos sido capaces de avanzar con éxito, paso a paso, y me siento optimista. En aproximadamente la mitad de un año sabremos más, mucho más. Y de nuevo, estoy muy contento con el apoyo de las organizaciones de padres, porque sin esta ayuda de las familias, yo no estaría aquí.

*Muchas gracias, en nombre también de las familias y sus hijos y todos los que leerán esta entrevista.*

Como una introducción a la entrevista, los capítulos sobre la omisión de exón en general y sobre los estudios clínicos en Holanda son reproducidos. Son parte de mi último informe, "Acercamientos de Investigación para una Terapia de Distrofia Muscular Duchenne", publicado en mayo de 2008. El informe entero en Inglés, Alemán, y Español, junto con los dos anteriores pueden verse en Internet en [www.duchenne-information.eu](http://www.duchenne-information.eu). Los que deseen recibir mis futuros informes y entrevistas tan pronto como estén listos deben enviarme su dirección de correo electrónico a [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de).

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

Si una mutación, una delección, duplicación o mutación puntual, altera el marco de lectura del ARN mensajero, ARNm, y causa por lo tanto distrofia Duchenne, el marco puede ser restaurado retirando artificialmente del ARNm uno o mas exones con *oligorribonucleótidos en antisentido*, AONs. Son pequeños trozos de ARN cuyas secuencias son diseñadas en tal manera de que se unen por si mismos precisamente a la secuencia complementaria del

ARNpre-m dentro del exón a ser retirado o en sus regiones fronterizas, y *en ningún otro lugar*. Estos AONs por lo tanto interfieren en la maquinaria de empalmado con el propósito de que el exón o exones seleccionados no sean más incluidos en el ARNm, son *omitidos*.

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

Para las primeras pruebas de omisión de exón, dos clases de AONs químicamente protegidos son usadas. Tienen

que ser protegidos porque son destruidos lentamente en las células musculares por enzimas destructoras del ácido nucleico. Los dos tipos de AONs son los 2'O-metil-fosforotioatos, también llamados 2O-metilos y los morfolinós.

**Prueba de omisión de exón en Holanda.** La primera prueba en humanos con la técnica de omisión de exón fue realizada en Holanda entre enero del 2006 y marzo del 2007. Fue diseñada para proveer solamente una prueba de principio y no un beneficio terapéutico a los niños tratados. Fue un estudio local sobre un área pequeña de un solo músculo, el músculo de la espinilla *tibialis anterior*, que fue tratado con un oligorribonucleótido en antisentido 2'O-metilo, AON, contra el exón 51 llamado PRO051. Con este tipo de AON químicamente protegido, los investigadores holandeses habían trabajado en experimentos preclínicos por varios años y fueron capaces de omitir los exones de la distrofina con éxito en fibras musculares no sólo en cultivos de células, sino también en ratones y perros vivos después de inyecciones locales y sistémicas (en la circulación sanguínea).

Antes del inicio de esta primera prueba clínica de omisión de exón, pruebas clínicas y genéticas moleculares fueron llevadas a cabo en cada niño para asegurarse de que el procedimiento de omisión de exón en los niños produjera distrofina acortada tipo Becker de la estructura esperada. Cuatro chicos, que ya usan silla de ruedas, participaron en este estudio de método abierto. Tienen entre 10 y 13 años de edad y habían demostrado delecciones de los exones de la distrofina 50, 52, 48-50, y 49-50. Fueron tratados en secuencia, esto significa que solo después de que los resultados en un chico eran positivos y no mostraban ningún efecto secundario serio, el próximo chico era tratado. Cada chico recibió cuatro inyecciones de 0.2 mg de PRO051 disuelto en 0.2 ml de solución salina (0.9% NaCl) bajo anestesia local, en una región pequeña de 1.5 cm de extensión del músculo *tibialis anterior*.

Después de cuatro semanas, tejido muscular fue obtenido por una biopsia del sitio de la inyección y se probó para buscar el ARNm omitido y distrofina acortada esperada. Estas pruebas mostraron que el 64%, 85%, 97%, y 73% de las fibras musculares todavía presentes en el músculo distrófico, contenían nueva distrofina en sus membranas después de este tratamiento de 4 semanas. En comparación con la laminina  $\alpha 2$ , una proteína no afectada por el proceso distrófico, el contenido de distrofina fue de 33%, 35%, 17%, y 25%. Esta comparación tiene en cuenta la extensión de la degeneración muscular. Sin este ajuste el chico de 13 años con mucho tejido conectivo y grasa en sus músculos tenía solamente 3% de la cantidad normal de distrofina, mientras que el chico con los músculos menos afectados tenía 12%. Los métodos moleculares de secuenciación probaron que la nueva distrofina tenía exactamente la estructura esperada con un marco de lectura restaurado. Fue imposible determinar si la cantidad de nueva distrofina habría sido capaz disminuir la velocidad de progresión de

la enfermedad en el músculo entero, porque el volumen de tejido muscular tratado era demasiado pequeño.

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

Los investigadores holandeses ahora han empezado una fase-I/II de estudio clínico para explorar el efecto, seguridad, tolerancia y posibles efectos secundarios de inyecciones sistémicas del AON PRO051 en la circulación sanguínea, para que así pueda alcanzar todos músculos, incluyendo aquellos del pulmón y corazón. Esta prueba es realizada en colaboración con la Universidad de Leuven en Bélgica, el Centro Médico de la Universidad de Leiden y el Hospital Infantil Reina Silvia en Suecia. Los pacientes son ahora enrolados.

Las inyecciones serán hechas subcutáneamente (bajo la piel) porque ha sido mostrado con ratones y monos que este tipo de aplicación causa omisión de exón sin efectos secundarios serios en todos los músculos probados, también en el corazón y el diafragma, y porque no requeriría visitas frecuentes a los consultorios médicos y hospitales si tratamientos repetidos son necesarios.

Esta técnica de omisión de exón con los AONs 2'O-metilos fue desarrollada en la Universidad de Leiden por el Prof. *Gerjan van Ommen*, la Profa. *Judith van Deutekom* y su equipo, pero para la organización y realización de las pruebas clínicas, la compañía Prosensa B.V. en Leiden con su presidente Dr. *Gerard Platenburg* es ahora responsable. La Profa. van Deutekom es ahora jefa de investigación de Prosensa.

El estudio sistémico será hecho en doce niños con Duchenne de 5-15 años y durará cinco semanas con una inyección subcutánea cada semana. Debido a que no ha sido probado que las dosis de AON usadas en los estudios animales serán seguras de usar en niños, uno empezará la prueba sistémica con una dosis muy baja que será incrementada lentamente para acercarse a un nivel óptimo, de inicialmente una inyección de 0.5 mg/kg, a un máximo de 10 mg/kg.

Prosensa ya ha producido grandes cantidades del AON contra el exón 51 en calidad grado clínico para la próxima prueba. También, AONs con estructuras optimizadas en contra de los exones 43, 44, 45, 46, 50, 52 y 53 han sido preparados. Estos AONs juntos, incluyendo el AON anti exón 51, permitirán el tratamiento de más del 65% de todos los pacientes con delecciones. Pero, por razones financieras, Prosensa está desarrollando actualmente solamente los AONs contra los exones 51 y 44 hacia la aplicación clínica completa y mercadeo.

La compañía necesita más capital de inversión para el desarrollo de otros AONs y aprecia la financiación cuantiosa recibida de las organizaciones de padres como los Parent Projects Holandés y Alemán, la asociación de distrofia muscular francesa AFM y otras.

Los detalles de la prueba clínica local fueron publicados por la Dra. Judith van Deutekom como la autor principal con un comentario del profesor Eric Hoffman, el 27 de Diciembre de 2007 en la publicación *New England Journal of Medicine*: Van 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.

Los que deseen obtener los archivos en pdf de estos, en mi opinión, las más importantes publicaciones de investigación terapéutica de Duchenne, deben enviarme sus direcciones de correo electrónico.

El apoyo financiero del TREAT-NMD Red Europea Neuromuscular y del Parent Project Muscular Dystrophy PPMD para la escritura y edición de esta entrevista, así como mis informes de investigación en Duchenne es muy agradecido.

**Gerard Platenburg, PhD.**

President of Prosensa B.V.  
Wassenaarseweg 72  
2333 AL Leiden, the Netherlands  
Phone: +31-71-5274202  
E-mail: g.platenburg@prosensa.nl  
Internet: www.prosensa.nl

**Guenter Scheuerbrandt, PhD.**

Im Talgrund 2  
79874 Breitnau, Alemania  
E-mail: gscheuerbrandt@t-online.de  
Internet: www.duchenne-information.eu

**Traducción al Español:**

**Ricardo Rojas C.**

Email: distrofiasmusculares@yahoo.com.mx  
Internet: www.distrofia-mexico.org

**TREAT-NMD Neuromuscular Network**

Institute of Human Genetics, Newcastle University  
Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK  
Email: info@treat-nmd.eu  
Internet: www.treat-nmd.eu

**Parent Project Muscular Dystrophy**

1012 North University Blvd.  
Middletown, Ohio 45042, USA  
Tel.: 001-513-424-0696,  
Internet: www.parentprojectmd.org