



Tercera Conferencia de Mesa Redonda en Mónaco del 19 de Junio del 2004: Transferencia del gen de la distrofina

Todavía hay un largo camino hasta que la distrofia muscular Duchenne pueda ser curada por transferencia génica.

La segunda conferencia de mesa redonda de Mónaco en el 2004 fue organizada por la *Association Monégasque Contre les Myopathies* y el *Duchenne Parent Project Francia*, ambos pertenecen al *international United Parent Projects Muscular Dystrophy*, UPPMD.

Veinte científicos de seis países se reunieron en Monte Carlo el 19 de junio del 2004 y discutieron sus trabajos sobre la transferencia de las versiones de extensión completa y acortada del gen de la distrofina en los músculos de chicos con DM Duchenne.

La conferencia fue abierta por el *Príncipe Alberto de Mónaco* que dio la bienvenida a los participantes y dijo que "Mónaco será siempre un lugar de reunión abierto a todos quiénes den esperanza a los niños de una mejor vida, sobre todo para aquellos con tal enfermedad incapacitante".

Este informe se concentrará en la primera prueba clínica de una técnica de transferencia génica con pacientes con DM Duchenne ahora en marcha en Francia y sobre otras planeadas en el futuro cercano. Esta información está basada principalmente en dos entrevistas las cuales fueron conducidas inmediatamente después de la conferencia. Ellas son precedidas por una introducción a las técnicas de transferencia implicadas. Una conclusión basada en comentarios del Profesor *George Karpati* cerrará el reporte.

Ya que las entrevistas principalmente tratan de contestar la pregunta siempre hecha por los padres "*¿Qué tanto tenemos que esperar, hasta que una terapia este lista para nuestros chicos?*", este reporte fue escrito principalmente para las familias y sus pediatras y no para científicos que desean ser informados sobre los detalles de la investigación de transferencia génica para la distrofia muscular.

Además de las presentaciones y discusiones sobre las pruebas clínicas con la técnica de transferencia génica, hubo varias otras que no pueden ser incluidas aquí. Ellas trataron principalmente de los detalles de las técnicas de transferencia génica como las ventajas y las desventajas de las diferentes construcciones de vector y los problemas de reacciones inmunes contra el vector y la distrofina recién sintetizada.

Un informe de investigación completo sobre el estado de la investigación de DM Duchenne desde agosto del 2003 puede ser visto en Internet en <http://www.duchenne-research.com>. Este informe será actualizado probablemente en el 2005 e incluirá entonces la información sobre todos los acercamientos hacia una cura de la distrofia muscular Duchenne incluso trabajo que no podía ser mencionado aquí.

Transferencia del gen de la distrofina

La distrofia muscular Duchenne es causada por mutaciones del gen de la distrofina en el cromosoma X. Este gen es el gen más grande encontrado en el genoma humano. Este es de aproximadamente 2,5 millones de pares de bases ("letras" genéticas) las cuales están agrupadas a lo largo de 79 exones con un total de sólo 11 000 pares de bases, sus regiones activas, que contienen la información para la producción de distrofina. Esta proteína estabiliza las membranas de las células de musculares. Si una mutación del gen cambia la información genética de tal modo que no pueda ser creada distrofina en las células musculares, es que la distrofia muscular Duchenne se desarrolla. Sin embargo, algunas mutaciones no interrumpen la producción de distrofina, si no que sólo causan la formación de distrofina mas corta de lo normal. Esto conduce a los síntomas moderados de la distrofia muscular Becker.

En la segunda conferencia de mesa redonda en Enero del 2004, la omisión de exon fue discutida como una posible técnica para cambiar "una mutación Duchenne" en

"una mutación Becker" instruyendo al mecanismo de síntesis de proteína a no usar cierto exones con el objetivo de producir una distrofina mas corta de lo normal en vez de la parada completa de su producción. Con las técnicas discutidas en esta segunda conferencia, uno trata de transportar un combinado de exones, el ADNc, de distrofina normal a todas las células musculares por medio de virus o plásmidos como transportadores, llamados vectores.

Los virus más eficaces para esta tarea son los virus adenoasociados, AAV. Pero estos pequeños virus pueden transportar sólo material genético que no es más largo de aproximadamente 5 000 pares de bases, aproximadamente un tercio de todos los exones con la información de la distrofina.

Su ventaja consiste en que ellos transfieren el gen con más eficacia que otros virus como los adenovirus normales. La desventaja es que el ADNc de la distrofina a ser transferido tiene que ser acortado bastante para caber en este pequeño vector junto con una secuencia promotora

para activar el gen en células musculares. Los pacientes con distrofia muscular Becker tienen una distrofina acortada similar en sus músculos. Por lo tanto, una transferencia de uno de estos minigenes Becker no podría curar completamente la distrofia muscular Duchenne, pero sólo transformarla en la benigna forma Becker. Las formas más cortas del gen de la distrofina son llamadas mini o microgenes de la distrofina, dependiendo de su estructura la cual puede ser tan corta como un tercio o menos de su extensión natural.

Pruebas en Francia: Transferencia del gen de la distrofina con plásmidos

La primera fase de esta prueba fue completada a principios de 2003. La compañía *Transgène* y la asociación de distrofia muscular francesa *AFM* comenzó su programa de investigación y desarrollo en 1995. El permiso por las autoridades reguladoras fue dado en el noviembre de 1999, y las primeras inyecciones de los plásmidos vectores con el gen de distrofina fueron realizadas en Septiembre del 2000 en el *Hôpital de la Pitié Salpêtrière* en París.

Los 9 chicos participantes eran todos mayores de 15 años de modo que ellos pudieran dar su *consentimiento informado*. Ellos no ganaron ningún beneficio clínico de este tratamiento, *este no era todavía una terapia*. Su objetivo era mostrar que el procedimiento es seguro, esto es, que esto no conduce a una reacción inmune o una inflamación, y que alguna nueva y normal distrofina aparece debajo de la membrana de las fibras en el tejido muscular tratado.

Para esta técnica, un combinado de 79 exones sin los intrones, el ADNc, del gen normal de la distrofina y sus estructuras de control eran parte del material genético de los plásmidos. Los plásmidos son pequeñas estructuras circulares de ADN sin la proteína dentro de las bacterias las cuales mayormente confieren resistencia contra antibióticos. Como los plásmidos no contienen ninguna proteína, solo material genético, *ADN desnudo*, ninguna reacción inmune se desarrolla contra este vector y su carga.

En experimentos preliminares con cultivos de células musculares, ratones y perros distróficos, fue demostrado que esta construcción de vector conduce a la aparición de nueva distrofina en su lugar correcto debajo de la membrana de las células musculares de los animales, que restauró el complejo distrófico-glicoproteico y que prolongó la vida de las células. La cantidad de plásmidos inyectados en los animales fue proporcionalmente 500 veces mayor que lo usado para los pacientes con DM Duchenne en la prueba.

La primera entrevista fue conducida con el Dr. *Serge Braun*, Vicepresidente de Investigación de la compañía biotecnología *Transgène* en Estrasburgo (Francia), y con el Dr. *Jon Wolff* de la Universidad de Madison/Wisconsin y Presidente de la compañía *Mirus*. Encargados de la primera prueba clínica de transferencia génica con pacientes con DM Duchenne, en los cuales no fueron usados virus, si no plásmidos como vectores para transportar no una versión acortada del gen si no el combinado entero de exones, el ADNc de distrofina de extensión completa.

Una solución líquida con 0,2 mg. de plásmidos conteniendo 10 billones (10×10^{12}) de copias del gen de la distrofina fue inyectada en un músculo del antebrazo de los tres primeros pacientes. Los tres siguientes pacientes recibieron una dosis de 0,6 mg. y los últimos tres dos dosis de 0,6 mg. con dos semanas de diferencia. Cada paciente fue tratado sólo cuando había seguridad que el anterior tratado no mostró ningún signo de intolerancia inmune u otros problemas.

Tres semanas después de las inyecciones, el volumen de músculo tratado de aproximadamente 0,5 centímetros cúbicos fue extraído por biopsia y se comprobó la presencia de distrofina. En tres de los seis pacientes de los primeros dos grupos y en todos los tres pacientes del tercer grupo, nueva distrofina apareció entre menos del 1 % y más del 25 % de las fibras musculares alrededor de los sitios de la inyección. No había ningunos signos de una reacción inmune, ni contra el plásmido, ni contra la distrofina recién producida. Esto contestó la pregunta de una fase I de estudio: *La transferencia génica con ADN desnudo es un procedimiento seguro*.

Los científicos franceses trabajan ahora con el equipo de *Jon Wolff* en Madison/Wisconsin, que inyectó construcciones de plásmidos similares con genes de las proteínas marcadoras beta-galactosidasa y luciferasa en la corriente sanguínea de miembros de ratas, perros, y monos *bajo presión*. La presión fue producida por el bloqueo a corto plazo de la circulación sanguínea en un miembro con un aumento de la presión sanguínea. Después, hasta el 20 % de las fibras musculares contenían la proteína marcadora transferida después de una sola inyección y en más del 40% después de inyecciones repetidas.

Los investigadores franceses y norteamericanos han unido ahora sus fuerzas para tomar este procedimiento para pacientes con DM Duchenne y Becker. Los resultados alentadores han sido generados en perros perdigueros dorados con distrofia muscular.

Entrevista con los Drs. Serge Braun (B) y Jon Wolff (W) del 19 de Junio del 2004

Las preguntas de esta y la segunda entrevista fueron hechas por el autor de este informe, el Dr. Günter Scheuerbrandt, ellas son mostradas en letra cursiva.

En esta discusión, deberíamos tratar de encontrar una respuesta a la pregunta que los padres con un chico con DM Duchenne siempre preguntan: ¿Qué tanto tomará hasta que el método de transferencia génica este disponible para curar a nuestro hijo? En una entrevista en el último encuentro en Mónaco en Enero sobre la omisión de

exon, la respuesta era: diez años, más o menos.

B: Es completamente imposible contestar esta pregunta. Usualmente con cualquier nuevo fármaco, esto toma aproximadamente 15 años para pasar a través de la fase I, fase II, y fase III de una prueba clínica. Con una enfermedad genética, podría ser diferente debido a que podríamos obtener posiblemente un estatus de fármaco huérfano y una aprobación rápida, sobre todo para una enfermedad como la DM Duchenne sin un tratamiento. Pero aun

entonces, esto será un camino largo. Con nuestro estudio de ADN plásmido, sólo completamos la fase I de prueba, lo que significa que dimos al menos un paso hacia adelante.

¿Cuánto duró al menos esta prueba?

B: Dos años y medio más 18 meses de discusiones con las autoridades reguladoras, que es cuatro años sólo para la fase I. Pero esto tomó tanto tiempo también porque esta era la primera prueba a base de genes para la distrofia Duchenne. De este modo, había más cuestiones para discutir, más preguntas y más preocupaciones surgieron en las autoridades reguladoras antes de que cualquier aprobación fuera dada para pruebas clínicas.

¿Son estas regulaciones en Francia diferentes a las de los Estados Unidos?

B: Yo pienso, que son similares y muy estrictas en ambos países. Las autoridades francesas son realmente muy cautelosas sobre organismos genéticamente modificados, OMGs, y el ADN plásmido es considerado como un OMG como virus modificados.

Ahora, la primera fase ha sido terminada para la distrofia Duchenne. ¿Están conformes las autoridades reguladoras, hizo que ellas aceptaran los resultados?

B: Hay todavía mucho trabajo para hacer una vez que la prueba ha terminado. Nosotros tenemos que juntar todos los datos y tenerlos preparados para las siguientes muy estrictas reglas, y escribir un informe para las autoridades reguladoras. Y de esa forma vayamos con ellas este otoño, probablemente en octubre.

¿Ahora, para la primera fase, actualmente usted usaría el método de presión que fue desarrollado en los EUA?

B: No, porque tenemos que proceder paso a paso, y el primer paso era la administración local de una dosis baja. Nada mal pasó. Pero esto no era realmente un tratamiento, y no trajo ningún beneficio a los pacientes. Para el desarrollo clínico de un nuevo fármaco, ese es el mejor modo de ir. La Fase I es comprobar la toxicidad, la seguridad, y la tolerancia. Si los resultados son aceptables, entonces usted puede moverse a un estudio en el cual usted quiere ver algún beneficio.

¿Sería entonces una fase II de la prueba clínica?

B: Sí, pero en nuestro caso, esta será una fase I/II, porque cambiamos el protocolo, cambiaremos de la administración local a la administración regional local por entrega intravascular. Y esto será hecho con el método de Jon Wolff.

Recuerdo cuando lo visité, Jon, en 1991 con un padre de un chico con DM Duchenne. Durante la discusión, usted salió de su oficina y volvió con sólo una jeringuilla y dijo que "es todo lo que necesitamos".

W: Era el punto de partida. Y aun ahora básicamente necesitamos sólo un torniquete, una aguja, y una bomba. Intentamos inyecciones en venas tempranas, pero con una vena grande teníamos un problema de válvula. Con nuestra técnica presente, regresando a 1995/96, la administración es hecha en pequeñas venas, esto fue desarrollado en mi compañía Mirus por Jim Hagstrom y Julie Hegge. En la fase I/II de prueba, usaremos este método.

Nueve niños participaron en la primera prueba quiénes tenían 15 años al menos debido a que ellos tuvieron que dar el consentimiento informado. ¿Cómo será esto en la siguiente fase, puede usted trabajar con pacientes más jóvenes?

B: Deseamos trabajar con pacientes más jóvenes, y

pediremos tanto a la agencia de fármacos estadounidense FDA como a la agencia de fármacos francesa nos permita enrolar a pacientes más jóvenes. Pero primero tenemos que acumular más datos y luego tener pre-reuniones con ellos para explorar esta posibilidad.

¿Que tanto tiempo necesitara para preparar la siguiente fase?

B: Es difícil de decir, porque toma varios meses para conseguir una respuesta de las autoridades reguladoras, por lo general aproximadamente tres meses. En nuestro caso con la primera fase, esto tomó 18 meses.

¿Hay una razón por la que esto toma tanto tiempo? Hay gente importante en estos comités. ¿No están interesados ellos? Esta es una enfermedad que es simplemente horrible, terrible. Y los niños desfilen, el tiempo de la familia esta corriendo. ¿Está ahí sólo el papeleo, la burocracia, que ellos no pueden trabajar más rápido?

W: Ellos están faltos de personal, al menos en la FDA. **B:** y en Francia no es diferente.

¿Pero en general, esta gente está interesada en que las pruebas estén siendo hechas?

B: Ellos simplemente no tienen la experiencia y ellos no están solos, porque este es un completamente nuevo campo de investigación. Ellos tienen que aprender, nosotros tenemos que aprender. Tenemos que hacer las pruebas de un modo muy seguro, y su rol es asegurar que lo hacemos de forma muy segura. Por eso ellos toman tanto tiempo y precauciones y tienen tantas preguntas. Y esto es para el bien de los pacientes.

En la reunión en Enero, Nick Catlin que representa al Parent Project Británico, dijo completamente emocionado lo que los padres realmente quieren: Aun si hay riesgo, los científicos deberían seguir adelante.

W: No es el modo correcto de hacer las cosas. **B:** Si algo pasa durante tal prueba, esto causaría mucho daño al campo entero, esto pararía todo. Entonces tenemos una enorme responsabilidad. Y eso era también lo que sentíamos en la fase I de prueba: Si algo negativo hubiera pasado, eso habría sido detrimental para todo el campo entero de la terapia génica. **W:** Las pruebas clínicas son muy costosas y consumen tiempo, así que si usted quiere hacer lo correcto, necesita toda la información que pueda pensar.

Sabemos que usted ha gastado ya 25 millones de dólares para la primera prueba. ¿Esto ha sido pagado completamente por la AFM? Y su compañía, Transgène, debe haber proporcionado algo también.

B: Esta cantidad era necesaria para la prueba entera pero también para la investigación, y para los salarios de las personas que trabajan en este proyecto. La AFM pagó esto completamente y continua pagando para estas pruebas. Nuestra compañía Transgène proporciono el como hacerlo, mano de obra, equipo, experiencia, y desarrollo científico. Todo esto es de un alto valor. Tenemos contratos de tres años con la AFM, el presente contrato termina a fines de Junio de este año. Y como es usual, cada año, les proveemos reportes completos y tenemos encuentros con el comité científico. En una base regular, ellos verifican los costos. Transgène es una compañía publica. Así que en materia financiera esta abierta a todo mundo.

¿Si esto cuesta tanto dinero para el desarrollo, entonces cuánto va al tratamiento, sobre el coste de los padres? ¿Será costoso?

B: Probablemente. Pero hay un ejemplo: la enfermedad

de Gaucher. Esta es una enfermedad rara, y el tratamiento con la enzima ausente es muy muy caro, 300 000 dólar por año. Esto es cubierto por la asistencia de salud. No atendemos ahora que tanto el tratamiento de DM Duchenne costará, pero no debería ser así de alto.

¿De qué tamaño son sus compañías, y cuanta gente trabaja en este proyecto?

B: Transgène tiene 165 personas, y aproximadamente 30 de ellas trabajan en la terapia génica de DM Duchenne, algunos de ellos de media jornada. **W:** Y en Mirus y en la universidad en Madison hay aproximadamente 6 personas trabajando conmigo.

Volviendo a la siguiente fase de la prueba: ¿Cuándo será capaz usted de empezar y cuanto tomará esto?

B: Esto tomará aproximadamente un año para la preparación, y cuando la siguiente fase sea aprobada, necesitaremos probablemente tanto tiempo como en la fase I de prueba. Esta duró dos años y medio, tal vez podríamos hacerlo más rápido esta vez. Pero esto depende de las autoridades reguladoras. Si ellos piden otra vez enrolar a los pacientes en una base secuencial, entonces esto tomará dos años y medio. Pero otra vez, sería por razones de seguridad. Y no hay nada que podamos hacer al respecto.

¿Y cuántos pacientes participarán en la fase I/II de prueba?

B: Esto es todavía materia de discusión. Tal vez 15 pacientes.

Nuestras familias dirán: Ah, tomamos a nuestro niño y vamos a Estrasburgo como cuando los otros fueron a Memphis a ver a Peter Law.

B: Todos los pacientes serán probablemente chicos estadounidenses y franceses. Sin embargo, esto permanece todavía abierto. Pero no somos responsables de decidir a quien enrolamos en la prueba. Sólo los profesionales clínicos tienen el derecho de hacer esa clase de decisiones. El principal investigador clínico en Francia probablemente sea otra vez, en cuanto a la fase I de prueba, el *Profesor Michel Fardeau*. La nueva prueba también tomara lugar en los EUA., pero no sabemos todavía quién será el investigador principal ahí.

¿Comenzará usted en los dos países al mismo tiempo? ¿Usará usted el mismo método, tendrá simplemente más pacientes?

B: Probablemente. Preguntaremos a la FDA y la agencia de fármacos francesa y esperamos que la prueba sea realizada en ambos países con más pacientes que en solo Francia.

¿Entonces usted necesitará cuatro años más, incluyendo un año para prepararse, antes de comenzar con la fase III?

B: Si vemos algún beneficio clínico en la fase I/II, podríamos ser elegibles para una aprobación rápida, porque la DM Duchenne es "una enfermedad huérfana", y porque no hay en absoluto ningún tratamiento. Pero otra vez, es sólo "si". Para un proceso de fase III normal, esperamos necesitar a cien pacientes o más y necesitaremos otros cuatro años.

¿Entonces puede usted calcular cuánto tiempo esto tomará?

B: Bien, podemos contestar en términos de mejores y peores escenarios. El mejor escenario sería una aprobación rápida hacia el 2008.

Y el peor escenario significaría que si algo sale mal

con esta u otra prueba de otra enfermedad, esta sería una parada completa. ¿Es posible, también?

B: Es posible, también. Usted no puede excluirlo, no.

¿Si la distrofina transferida funciona, a qué edad deberían los niños ser tratados?

W: El más joven será el más fácil. Tal vez a los 5 años de edad, o de 3 a 5 años.

¿Será el fármaco el mismo para todos los chicos con DM Duchenne y no tendrá que ser individualmente diseñado como es esperado para la omisión de exon? ¿Y con qué frecuencia tendrá uno que repetir el tratamiento?

B: Sí, los plásmidos con el ADNc de la distrofina serán los mismos para todos los pacientes. **W:** Quizás necesitaremos un refuerzo cada 6 meses. Así podría haber una dosis de iniciación para ponerse un cierto nivel de distrofina y a partir de entonces sólo dosis de mantenimiento.

¿El ADNc del gen, que es transportado, no es integrado en un cromosoma?

B: Esto no debería. La probabilidad es muy baja. Nunca ha sido demostrado pase usando plásmidos o virus en la entrega intramuscular. **W:** y deberíamos conseguir la expresión a largo plazo.

¿Cómo lucirá el tratamiento? ¿Cómo producirá usted la presión?

W: Con un empuje de presión sanguínea. Tendremos que ver que tan fácil es el procedimiento. Tal vez podría ser hecho en la oficina del doctor. Este parecerá a una infusión. La presión es producida con una bomba, de aproximadamente 500 mm de mercurio, menos de una atmósfera.

Entonces podemos tener algunas palabras finales, dirigidas a los padres.

B: Debido a que tenemos correos electrónicos de todas partes, preguntando la misma pregunta sobre el tiempo que necesitamos, siempre damos la misma respuesta: Sé que es frustrante para los padres que tome tanto tiempo para el desarrollo clínico de cualquier fármaco, pero especialmente para la distrofia Duchenne. Es también frustrante para nosotros, pero tratamos de hacerlo tan rápidamente como sea posible. Por otra parte, también tenemos que seguir reglas muy estrictas, esto se hace por la seguridad de los pacientes, para asegurarse que nada malo pase. Así que por eso es por lo que toma tanto tiempo.

W: Otra cosa que los padres deberían saber es que esta transferencia génica no será una cura. El objetivo en todas las tres fases de la prueba es conservar la función de la mano. Tratamos sólo un miembro, el antebrazo. Y este es un primer paso importante que mejorará la calidad de vida. Cuando veamos que este primer paso funciona, el siguiente paso será el tratamiento de las piernas y luego posiblemente los músculos respiratorios y el corazón. Pero ahora mismo la técnica no funciona bien con los músculos del corazón. Tal vez podemos hacerlo funcionar mejor de alguna manera en un tiempo posterior. Las inyecciones son regionales, no sistémicas. En estas primeras pruebas, inyectamos los plásmidos en una vena en la muñeca de modo que ellos entren en todos los músculos del puño debajo del final de la mano. Otra vez, esto no es una cura pero es algo para comenzar.

Era completamente importante decirlo. Así que este tratamiento no afectará la esperanza de vida de los niños. ¿Para conseguir esto, tomará 20 a 30 años más?

W: Ah no, será más pronto. **B:** Si usted muestra la ven-

taja clínica con el antebrazo, entonces usted puede moverse a otros músculos de los miembros e incluso a los músculos respiratorios. **W:** Y cuando más personas trabajen en la tecnología regional, se hará mejor y mejor. De este modo, por favor entienda, que éstos son avances importantes y que las cosas se mueven en la dirección correcta.

Transferencia del micro gen de la distrofina

En la segunda entrevista, fueron discutidas las pruebas clínicas planeadas que usan la transferencia de ADNc's muy acortados del gen de la distrofina. Como una introducción, esta técnica es resumida primero.

En el laboratorio del Profesor *Jeffrey Chamberlain* en Seattle (EUA), los científicos han realizado una ingeniería considerable en crear ADNc's acortados de la distrofina, el combinado de exones del gen. Ellos han identificado una cierta versión corta que es muy funcional y altamente eficaz en combatir la distrofia en el ratón-mdx distrófico.

Este nuevo micro gen de la distrofina carece de la mayor parte central de la proteína distrofina y el extremo final, el extremo terminal C de la proteína normal. Esto significa que los 17 últimos pares de bases del exon 17 y todos los siguientes exones e incluyendo el exon 59 fueron quitados y al extremo los exones 70 a 79, también. La proteína que resulta que normalmente tiene 3 685 aminoácidos era entonces 2 539 aminoácidos más corto, significando que sólo era el 31,1 % de extensión de la proteína normal.

Con experimentos publicados en la edición de Agosto del 2004 de la revista *Nature Medicine* (10, 828-834, 2004), los investigadores norteamericanos encontraron un nuevo método por el cual el tipo 6 de virus adeno-asociado (AAV6) con el micro gen de la distrofina fue inyectado *sistémicamente* en el flujo sanguíneo de ratones mdx adultos. Los vectores fueron inyectados junto con la proteína VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) la cual hace permeables los capilares sanguíneos durante un tiempo limitado. Podría ser entonces mostrado que esencialmente todos los músculos voluntarios del ratón producían ahora nueva distrofina en niveles muy cerca de los norma-

De parte de los organizadores de esta conferencia y seguramente también en nombre de las familias con chicos con DM Duchenne, les deseo todo el éxito necesario con su trabajo de investigación y gracias a ustedes y sus colegas por su dedicación y esfuerzos para encontrar un tratamiento eficaz para la distrofia muscular Duchenne.

les. Los músculos mostraron una mejora de su función, y la examinación del deterioro muscular midiendo los niveles del serum sanguíneo de creatina kinasa mostró una mejora de todo el cuerpo por la distrofia.

Este trabajo muestra por primera vez que es posible entregar nuevos genes de la distrofina a todos los músculos de un ratón adulto. El punto focal de la investigación ahora será determinar si el método es seguro y que tanto puede ser aumentado para animales más grandes y eventualmente aplicado de forma clínica.

El Dr. *Olivier Danos* es el Director Científico del Généthon en Evry cerca de París (Francia). Él presentó datos sobre varios serotipos diferentes de virus adeno-asociados usados para estudios de terapia, virus con estructuras superficiales diferentes. Los serotipos 1 y 6 son mucho mejores que los tipos 2 y 5 para la transferencia génica en músculo esquelético en ratones. Los estudios preliminares mostraron que una inyección arterial de AAV que contiene microdistrofina en el miembro trasero de un perro GRMD con distrofia muscular condujo a la producción de niveles bajos de nueva distrofina en los músculos de la pierna. Su grupo estudia también diferentes elementos reguladores de genes para poner en los vectores AAV para controlar la producción de distrofina, y mostró datos muy alentadores usando a un promotor del gen desmin.

Con el apoyo de la AFM, el Généthon junta actualmente datos preclínicos sobre el uso de vectores AAV para la transferencia del micro gen de la distrofina en los músculos de pacientes con DM Duchenne. Este trabajo debería conducir a una prueba clínica dentro de los próximos tres años.

Entrevista con los Drs. Jeffrey Chamberlain (C) y Olivier Danos (D) el 20 de Junio del 2004

Al final de la primera entrevista fue dicho, que el objetivo del estudio en Francia es mejorar únicamente la función de la mano, esto no será una cura completa para la distrofia Duchenne. Y si esto funciona, uno podrá ampliar probablemente este método a otros miembros y a los pulmones. ¿Si usted usa microdistrofina para una terapia, usted conseguirá realmente que sea una enfermedad de tipo Becker, verdad?

C: Esperamos que, mínimamente, esto convirtiera las características de la enfermedad en una moderada forma Becker de distrofia muscular. Es posible que esto pueda funcionar mejor que eso. De los experimentos con animales es difícil predecir el efecto clínico en niños. Es una de las razones por las que esperamos conseguir la tecnología en la prueba clínica para averiguar que tan eficaz es.

D: Todavía no sabemos el mecanismo de corrección con micro distrofina. Podemos hacer sólo conjeturas

educadas basadas en nuestros muchos años de experimentos con ratones transgénicos. De este modo, tenemos datos que nos dicen que esto conducirá a alguna corrección. Sin embargo, si esto va a ser a algo como Becker, o si esto va a ser mejor, es imposible decir hasta que hayamos hecho la prueba con humanos. Esa es una razón de hacer inyecciones locales en la primera prueba, y entonces nosotros podremos ver la función muscular en un paciente humano y ser capaces de entender que tan bien esta micro distrofina funciona.

¿Pero si esto funciona, será un método sistémico?

D: Hoy no podemos decirle como el tratamiento va a ser hecho, con que vector y por cual método de entrega. Solamente comenzamos. Discutimos como nosotros podemos administrar el vector de forma sistémica y conseguir una corrección en la musculatura entera de un ratón. Esto es completamente diferente de la situación de hace un año. Pienso que este es un progreso, pero este es sólo el principio de algo nuevo, y no estamos allí aún. El

resultado de nuestros experimentos solamente está totalmente abierto y hay todavía mucho más trabajo que hacer.

C: Hay varias etapas para averiguar como podemos aplicar esta técnica a los pacientes. Primero se debe responder la pregunta de que tan bien las microdistrofinas trabajan en un músculo humano comparado a minidistrofinas y distrofina de extensión completa. Y esto comenzará probablemente con inyecciones en pequeños músculos.

¿Serán hechos estos estudios humanos en lo que usted llama la fase I?

C: Sí, así es. Y si es exitoso, podemos aumentarlo como está siendo hecho en otra prueba con ADN plásmido, para tratar de mejorar la función de la mano. Al mismo tiempo, tendremos que desarrollar métodos con animales para conseguir una distribución del gen en una región mucho más grande del cuerpo, quizás en una pierna entera, un brazo entero y luego, finalmente en el cuerpo entero. Pero esto va a tomar mucho trabajo para ver si será realmente posible hacerlo primero en animales y luego en pacientes.

D: Hay varias cosas que tienen que ser probadas en pruebas clínicas: la función de la micro distrofina después de que es recién creada, la mejor ruta de entrega, y también el vector mismo. Si los virus adeno-asociados son usados, debemos saber qué tipo particular sería el mejor. En pruebas clínicas de un fármaco normal, usted comprueba la toxicidad en la fase I, entonces usted aumenta la dosis, entonces usted hace esto en más pacientes, que es completamente un avance correcto hacia adelante. Aquí, planeamos inyecciones locales para ver la función de la microdistrofina y la seguridad, y luego podemos intentar otro modo de distribución. De este modo, las agencias reguladoras dirán: esta no es una fase I ni una fase II, esta es una fase I y otra fase I, porque las condiciones son diferentes. Esto sólo significa, vamos a un sistema complejo con nuestras pruebas clínicas.

¿Trabajarán ustedes juntos en el futuro en estas pruebas?

D: Esto no está decidido. Hasta ahora hemos estado trabajando en paralelo con la misma clase de ideas e instrumentos. Este taller, esta mesa redonda, es tan útil porque comenzamos a hablar y estamos convencidos que sería mucho mejor si trabajáramos juntos. Por otra parte, Jeffrey en Seattle y nosotros en Francia tendríamos pruebas clínicas completamente diferentes.

C: Es importante tener los diferentes grupos comunicándose los unos a los otros y reunirse en una base regular y ver donde podemos ayudarnos el uno al otro. Pero al mismo tiempo, uno no quiere combinar completamente todos los esfuerzos de investigación en el mundo y tener un solo programa porque esto tiende a sofocar la innovación y la creatividad. Si usted no tiene la independencia y la competencia, entonces usted no puede pasar al siguiente paso.

D: En tal nuevo y complejo programa, siempre es difícil hacer decisiones. ¿Deberíamos trabajar con esta o esa microdistrofina? ¿Deberíamos usar este o aquel serotipo de AAV? Ahora tenemos varios centros que van en la misma dirección. Cada uno va a tomar opciones diferentes y eso es bueno porque usted puede nunca saber que resultados serán antes de que usted haga el experimento. Si usted tiene sólo un programa grande que va en una dirección, las

posibilidades que algo vaya mal son mucho más altas.

Y entonces usted tiene que comenzar desde el principio otra vez.

D: Sí, y no creo que esto salvaría el dinero en el largo camino. Un programa grande podría ser mucho menos motivante para la gente que hace el trabajo. La nueva manera es trabajar en paralelo, intercambiar la información y tratar de no duplicar esfuerzos. Eventualmente esto reducirá los gastos de una prueba clínica.

Para llegar a la importante pregunta que los padres siempre preguntan por ejemplo: ¿Va a mi hijo, quien tiene 10 años de edad, todavía sacar beneficio de esto, cuando él tenga 15 o 20 años? ¿Llegará esto suficientemente rápido para salvar a mi hijo? Por lo tanto la pregunta es: ¿Cuándo serán capaces ustedes de comenzar una prueba, cuanto tiempo tomará cada fase?

D: Hay otras pruebas, pero no veo que ninguna de esas pruebas vayan a salvar pacientes. Ellas probablemente nos darán información importante, pero ellas no salvarán pacientes. Por supuesto, cualquier cosa puede pasar, algo que no sabemos hoy puede ser encontrado y tener un impacto positivo. Estamos haciendo lo mejor que podemos con la información que tenemos actualmente. Esto es un largo proceso, el desarrollo de una terapia génica está lleno de barreras y problemas. Solucionamos un problema, entonces vamos al siguiente. Estaríamos felices que fuera posible acelerar el proceso, pero esto simplemente es humanamente imposible.

C: La investigación tiene que ir por fases, de un área a otra. Hemos trabajado durante mucho tiempo mayormente con el modelo de ratón para distrofia muscular, tratando de entender que tanto será posible tener un impacto sobre esta enfermedad. Y tomar esto del ratón a los pacientes es un proceso muy lento y difícil. Junto con varios grupos durante los próximos dos o tres años, comenzaremos probablemente estudios con las microdistrofinas para ver si ellas van a ser seguras y los métodos de la entrega serán también seguros. Entonces veremos la seguridad de más experimentos a gran escala.

Pero estos experimentos con microdistrofinas son sólo un tipo del acercamiento para curar la enfermedad. Hay también avances hechos en otras áreas de la investigación. Los fármacos conocidos están siendo estudiados, mejores hormonas esteroideas están siendo vistas, y cosas como esta. Y esperanzadoramente, ellos tendrán también un impacto muy positivo sobre la enfermedad. Todo esto ayudará a los pacientes a vivir mejor y más. Y con esperanza, una mejora de la enfermedad vendrá un poco más rápido. Sin embargo, es completamente difícil saber cuanto esto va a tomar para tenerse realmente un tratamiento eficaz.

D: Siempre es un problema dar fechas. Cualquier cosa puede pasar. Decidimos en el Génethon diseñar un camino óptimo. Esto es simplemente poner en papel, las líneas de tiempo, cuanto tomará cada paso. Y si hacemos eso, podemos decir, esta bien., terminaremos los estudios animales en ese tiempo, luego nos moveremos a la toxicología, y luego a la prueba clínica. Si todo va perfectamente bien, y si no surgen absolutamente ningunos problemas científicos - pero esto no va a ser realista - comenzaríamos una prueba en dos años, en Octubre del 2006. Esto es sobre el tiempo que tomara para comenzar un estudio clínico inicial con microdistrofina. Podemos decir eso, pero sabemos que

tendremos que revisar estas predicciones todo el tiempo. De tal manera, esto no significa dar una fecha, y no diremos que tenemos que encontrar una fecha límite. Es todo lo que puedo decir sobre los tiempos y que tanto esto tomara.

Fue dicho en la reunión que el desarrollo de un fármaco normal toma 15 y más años.

D: Sí, y estamos todavía en la primera etapa de los 15 años. Estamos realmente al principio. Obviamente, podríamos decir: de aquí en adelante esto tomará 15 años. Pero, por otra parte, no queremos perder la esperanza de que algo más pasara que no sea terapia génica. Podría haber un nuevo fármaco que cambiará totalmente todo, y tenemos que estar listos para eso.

¿Pero qué puede uno decir a los padres sobre el tiempo? ¿Que esto pudiera tomar 10 o 20 años? Sus hijos estarán muertos antes de ese tiempo. ¿Qué pueden ellos hacer? ¿Tratarlos tan bien como sea posible para mantenerlos en buenas condiciones si algo viene, para que ellos puedan beneficiarse de ello?

C: Es realmente lo mejor que ellos pueden hacer, aprovechar la asistencia médica lo mejor posible y el manejo de la enfermedad que actualmente tenemos disponible. Y hasta sin un fármaco milagroso o un avance de terapia génica, la calidad de cuidado para los pacientes ha mejorado tremendamente comparado a lo que era hace 10 años. Así que esta mejor calidad de vida de los pacientes también aumenta lentamente su expectativa de vida.

Uno debe simplemente aprovechar hasta las pequeñas mejoras del cuidado médico y de nuevos fármacos que vienen. Cosas similares pasan con el cáncer. No hay ninguna bala mágica que cure el cáncer, pero hay fármacos que hacen más lentos algunos tipos de cáncer. Y hay varios tipos diferentes de tratamiento que pueden venir juntos y tener un impacto muy grande en el mejoramiento de la vida de los pacientes. Mi conjetura es que veremos cosas así con la distrofia muscular.

La terapia génica puede no ser una cura completa, pero esto podría fortalecer los músculos lo suficiente de modo que los pacientes puedan beneficiarse de otros acercamientos los cuales les darán un aún mejor estado de la salud. Es difícil predecir como estas cosas podrían funcionar, y la mejor esperanza es mantener tantos acercamientos de investigación en curso como sea posible.

Otra área debe tratar de evitar el nacimiento de algunos niños con DM Duchenne con una mejor detección de portadoras y consejo genético, por instancia después de que un muchacho Duchenne fue encontrado por detección pronto después del nacimiento. Pero no sólo la familia inmediata debería ser aconsejada, sino también las familias que están relacionadas con la madre. Si la madre de un chico con DM Duchenne es portadora, su hermana puede ser portadora, también. De esta manera, uno puede evitar incluso los primeros casos en familias relacionadas. La detección de una portadora se hace cada vez más precisa, el último desarrollo es el nuevo método MLPA de la compañía MRC en Amsterdam.

D: Esto reducirá el número de pacientes, seguro, pero no eliminará la enfermedad.

Debido a que hay demasiadas nuevas mutaciones. Si hay una nueva mutación, esto puede comenzar una nueva serie de chicos con DM Duchenne en las generaciones siguientes de las familias.

C: La detección en el nacimiento y ser capaz de ofrecer orientación genética a tiempo es un acercamiento muy importante. Y estos nuevos ensayos de detección de portadoras son otro progreso que hemos visto en los pasados 10 a 15 años. Pero aun con la información disponible, parece ser difícil de sacar esta posibilidad de las familias y sus parientes y hacerles saber lo que esto significa.

Los médicos familiares que conocen las familias, deberían decir a la familia inmediata cual es su responsabilidad realmente: advertir a sus parientes.

C: Uno de los problemas de esta enfermedad es, que el gen que es defectuoso, es un gen grande y muy complejo. Durante mucho tiempo, ha sido difícil detectar con eficacia las mutaciones. Pero los avances de la tecnología de ADN han simplificado realmente esto enormemente. Esto va a ser importante para conseguir los avances fuera de sólo unos laboratorios de investigación y hacerlo más extensamente disponible en todo el mundo, de modo que podamos tener un efecto sobre la frecuencia de la enfermedad.

Una de las razones que la distrofia Duchenne es una enfermedad genética común, es que esta surge espontáneamente y a una tasa más alta que en cualquier otra enfermedad heredada conocida. Así que esta va siempre a estar con nosotros. Y por eso tenemos que seguir trabajando tan fuerte como podamos para desarrollar un tratamiento.

Ahora, otra pregunta: ¿Cuál es realmente la relación entre el Généthon y la asociación francesa AFM?

D: El Généthon es una creación de la AFM. Este es un instituto de investigación no lucrativo cuyo objetivo principal, hace 15 años, fue establecer el mapa físico del genoma e identificar genes asociados con enfermedades genéticas. En 1997, fui invitado a unirme al Généthon a fin de comenzar una actividad de investigación centrada alrededor de la terapia génica. Actualmente, la mayor parte del Généthon trabaja en la terapia génica para enfermedades genéticas. Y el 85 % del presupuesto del Généthon viene de la AFM. El resto viene de subvenciones del gobierno y otras fuentes.

En el Généthon, vivimos juntos, literalmente, en el mismo edificio, con la AFM. Cada día, nos reunimos, hablamos y almorzamos con padres y pacientes. Esta es una motivación muy importante y constante para nosotros.

La AFM es muy exitosa en la adquisición de dinero para la investigación, lo que es increíble. ¿Cuánta gente trabaja realmente en este proyecto de transferencia génica en el Généthon?

D: Tenemos un equipo de aproximadamente diez personas que son responsables de mover este proyecto hacia adelante usando los recursos comunes del Généthon. *Luis Garcia* y *Jean Davoust* que participaron en esta conferencia son participantes importantes en este proyecto. Todos juntos, más de 50 científicos y técnicos trabajan en proyectos relacionados con distrofias musculares en el Généthon.

¿Y cuántos trabajan en Seattle?

C: Hay un núcleo de 6 o 7 personas en mi laboratorio que trabajan en el proyecto de micro distrofina, pero tenemos aproximadamente tres veces mas, quiénes trabajan en otros acercamientos para distrofia muscular.

Hay otro laboratorio de investigación en Seattle, encabezado por Rainer Storb, en los laboratorios de investigación Hutchinson.

C: *Rainer Storb* es uno de los pioneros en el trasplante de médula ósea, trabajando sobre todo con perros. Él ha

desarrollado ahora una colonia de perros con DM Duchenne. Colaboramos con él para probar nuestras microdistrofinas en perros. Pero su propio grupo de investigación ve más acercamientos basados en células madre que usan el perro para desarrollar un tratamiento.

Durante el año pasado, varios investigadores se han movido a Seattle y han comenzado a trabajar en la distrofia muscular. Entre ellos están *Marie-Terese Little*, *Rainer Storb*, y *Stanley Froehner* que vinieron de la Universidad de Carolina del Norte. Tenemos ahora colaboración informal entre muchos laboratorios diferentes.

Tenemos tiempo para decir unas palabras finales a los padres.

D: Los padres están en una situación muy difícil. Debido a que les pedimos esperar, esta es la respuesta a su pregunta inicial. Ellos tendrán que esperar durante mucho tiempo. La primera prueba comenzará en un par de años. Nosotros los investigadores debemos ser muy humildes, porque no podemos hacer grandes predicciones. Estamos sólo seguros sobre los datos que tenemos y de saber lo que vamos a hacer después. Pero, los padres no deberían perder la esperanza, y es muy importante. Pedimos tener fe, y es muy difícil. Por supuesto, nosotros podemos pensar en el futuro y llevar alguna esperanza para el futuro. Quisiera poder hacer más que eso, pero nadie puede.

C: Estoy de acuerdo con eso completamente. La cosa importante es tener esperanza, y saber que los objetivos han sido puestos. Esto es un lento progreso y esto nunca se mueve tan rápido como uno quisiera, incluso nosotros en el laboratorio. Pero esto ira viniendo, y, mirando hacia atrás 15 o 20 años, cuando primero comencé a trabajar en la distrofia muscular, era muy difícil imaginar que podría haber un tratamiento eficaz para esta enfermedad. Y ahora, podemos imaginar que habrá un tratamiento para esta enfermedad. No sabemos exactamente lo que tal tratamiento va a ser o cuando este va a venir. Pero con lo que hemos visto con los animales, es posible tener un impacto mayor

sobre esta enfermedad. Ahora sólo tenemos que luchar para encontrar un modo de hacer esto una realidad. Y podemos traer sólo cosas tan rápido como podemos.

La última pregunta: ¿Hay bastante dinero para este tipo de investigación? Los padres mismos, cuando tienen a un chico con DM Duchenne, creen, que ellos tienen que coleccionar el dinero, de modo que la investigación esté siendo realizada para ayudar a su hijo. ¿La cantidad de dinero no será grande, pero es importante, también, verdad?

C: El dinero es siempre importante. Hay mucho más dinero que va a la investigación de distrofia muscular ahora que hace 10 años, pero yo diría nunca, es suficiente. Hay siempre más cosas que podemos imaginar hacer si tuviéramos más dinero. Hay cosas que usted podría hacer más rápido, pero las cantidades de dinero ilimitadas no traerían una cura inmediata para esta enfermedad. Hay cosas que no pueden ser hechas más rápido.

D: Necesitamos dinero para toda clase de cosas y lo necesitamos para largo plazo. Pero necesitamos el dinero también hoy para entrenar a la gente joven, y ellos serán los que harán el progreso en 10 años desde ahora. Pienso que la acción de padres coleccionando dinero es muy muy importante, porque ellos son un grupo de personas que ha dicho, "juntos vamos todos a conseguir dinero y darlo a este proyecto", entonces este dinero es reservado a una cierta actividad y debe ser concentrado en esta actividad. Así que es muy diferente de pagar impuestos, y luego esperar el gobierno asigne quizás unos a la investigación de DM Duchenne. Por eso puede ser tan eficiente, y esto es por lo que las asociaciones paternas son tan provechosas. Sin ellas, a nuestro trabajo le cuesta existir.

Muchas gracias por esta entrevista. Y seguramente también de parte de las familias, les agradezco por su dedicación y deseo a través de sus esfuerzos que un tratamiento para la distrofia muscular Duchenne sea encontrado más en el cercano que en el lejano futuro.

Prueba de terapia génica propuesta en la Universidad de Ohio State

El profesor *Jerry Mendell* en el Children's Research Institute de la Universidad de Ohio State en Columbus/Ohio prepara una prueba de transferencia génica con el objetivo de convertir los síntomas de DM Duchenne en síntomas mucho más moderados de distrofia Becker.

El vector usado será un virus adeno-asociado modificado del serotipo 2, llamado AAV 2.5. Este contendrá una construcción del gen de una mini distrofina, $\Delta 3990$, que carece de las regiones R3 a R21 de la proteína y el extremo terminal C del ADNc normal. Este corresponde a los exones 14 al 54 y parte del exon 55 así como a los exones 70 al 79. En vez de 3 685 aminoácidos de la distrofina normal, la proteína hecha por este minigen tendrá sólo 1 230 aminoácidos, significando que esto sería exactamente un tercio de largo. Este minigen ha sido desarrollado por el Dr. *Xiao Xiao* de la Universidad de Pennsylvania en Pittsburgh y luego usado para estudios exitosos de transferencia génica en ratones mdx. El Dr. *Jude Samulski*, director del Centro de Terapia de Génica en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill y de la compañía de biotecnología *Asklepios* será responsable de la preparación en

gran escala de los vectores. Este trabajo está siendo apoyado por la Asociación de Distrofia Muscular de Estados Unidos con un premio de 1,6 millones de US dólar.

Después de que la toxicología y los estudios de biodistribución con animales sean completados y el permiso de las agencias reguladoras obtenido, la prueba comenzará en la segunda mitad del 2005. Esta será una fase I/II de prueba con 6 pacientes con DM Duchenne cuyas mutaciones del gen de la distrofina son conocidas. Ellos tendrán al menos 10 años de edad de modo que ellos puedan dar su consentimiento informado.

Las inyecciones serán hechas con un método dobleciego en los músculos del bíceps usando el vector en un lado y solución salina en el otro, dirigido por imagen de resonancia magnética. Dos dosis diferentes serán usadas para cada grupo de 3 pacientes. Después de 3 y 6 semanas, la fuerza de músculo será medida cuantitativamente. También después de 6 semanas, una biopsia de músculo será realizada para comprobar la presencia de nueva, pero acortada distrofina y de posibles efectos adversos.

Conclusión

Para terminar este informe, una conclusión es intentada la cual esta parcialmente basada en comentarios hechos por el Profesor *George Karpati* en Montreal.

En este encuentro, dos acercamientos de investigación de transferencia génica fueron discutidos: El primero, la administración planeada de una construcción del gen de microdistrofina con virus adeno-asociados en la circulación sanguínea de ratones distróficos y, el segundo, la administración regional bajo presión de un combinado de exones del gen de extensión completa de distrofina humana con plásmidos en los músculos de pacientes con DM Duchenne en la primera prueba clínica de terapia génica en DM Duchenne.

Transferencia de microdistrofina con virus. Este acercamiento ha mostrado resultados impresionantes. Una sola inyección en la vena de la cola de una relativamente pequeña cantidad del virus adeno-asociado que lleva sólo aproximadamente un tercio de los exones de la distrofina con un promotor muscular específico causó producción generosa de distrofina acertada en todos los músculos esqueléticos y en ningunos otros órganos del animal de laboratorio usado, el ratón distrófico. No habo ninguna toxicidad apreciable.

Estos resultados impresionantes pueden ser explicados por (1) una extraordinaria precisión de este tipo de virus para las fibras de músculo esquelético, (2) el uso de un promotor que activó la construcción génica sólo en las células musculares, y (3), la administración simultánea de VEGF que hace los vasos sanguíneos capilares permeables durante un corto tiempo.

Por supuesto, no es garantizado que todas estas circunstancias favorables se materialicen también en niños, y el efecto terapéutico de la muy corta micro distrofina puede producir también sólo una mitigación moderada de la severidad de los síntomas de DM Duchenne o ninguna en absoluto. Sin embargo, en vista de la posible seguridad relativa del procedimiento, procesos humanos cautelosos parecen ser justificados. Y problemas técnicos y financieros mayores podrían surgir cuando sea intentada la producción en gran escala de los virus con su carga genética en la calidad requerida necesaria para este nuevo tipo de fármaco para ser usado en niños.

Los aspectos positivos de este acercamiento se resumen en: (1) los estudios preclínicos en ratones dieron resultados favorables, (2) el método parece ser seguro, (y 3), ningunas reacciones inmunes fueron causadas contra el material del vector o la nueva distrofina.

Sin embargo, hay también incertidumbres y posibles aspectos negativos: (1) la microdistrofina podría producir una mejora clínica insuficiente, (2) el curso de tiempo de cualquier efecto terapéutico no ha sido todavía estudiado, (3) estudios con animales más grandes que un ratón, por ejemplo con el perro distrófico, deberían ser emprendidos antes de que los niños sean tratados, (4) la fabricación en gran escala del vector puede ser prohibitivamente costosa, y (5), la cantidad máxima de virus adeno-asociados inyectados en la circulación sanguínea de niños sin efectos adversos negativos no es conocida.

Transferencia del gen de la distrofina de extensión completa con plásmidos. La administración intravenosa de un muy grande número de plásmidos que contienen todos los exones combinados del gen de la distrofina, su ADNc, con sus propios elementos de control en una pierna de ratones distróficos bajo presión causó una variable, pero a menudo apreciable producción de distrofina normal en todos los músculos de la pierna con relativamente pequeños efectos adversos. En la completada fase I de prueba en humanos, la administración local de material genético "desnudo" similar probó ser segura, pero el porcentaje de células musculares productoras de distrofina nunca fue mayor al 25%.

En la segunda fase de prueba con pacientes con DM Duchenne, es planeado inyectar un volumen bastante grande de ADN desnudo similar en una vena del antebrazo bloqueada cortamente con un torniquete. Es esperado que un porcentaje alto de células musculares produzca nueva distrofina y así mejorar la función de la mano de los pacientes.

Las características positivas del estudio propuesto incluyen: (1) La confiabilidad de este procedimiento fue probada en monos, (2) una cantidad grande de ADN desnudo puede sin peligro ser introducida en los músculos humanos, y (3), el ADN desnudo no causa problemas inmunes. Las incertidumbres o los aspectos negativos incluyen:

(1) Por motivos prácticos, uno trata de tratar los músculos del antebrazo primero aunque la función de la mano de los pacientes con DM Duchenne se deteriore bastante tarde, (2) el gran volumen inyectado y la aplicación del torniquete puede causar un daño colateral significativo, (3) la longevidad del efecto terapéutico no es conocida, y (4), la producción en gran escala de los plásmidos en la calidad requerida será costosa.

El futuro: Desde el descubrimiento del gen de la distrofina en 1986, la investigación para una terapia de la distrofia muscular Duchenne ha progresado bastante. Además de las dos técnicas discutidas en el encuentro y ahora en desarrollo para pruebas clínicas, hay otros acercamientos prometedores como, por ejemplo: la omisión de exon, la lectura a través del codón de parada, el aumento de la producción de utrofina, y los tratamientos con fármacos como la prednisona u otras sustancias que se encuentran activas en estudios animales.

Como es explicado en las entrevistas, tomará todavía muchos años hasta que una terapia efectiva y segura, basada en los dos métodos discutidos, esté disponible para los pacientes. Por lo tanto, la investigación de éstos y todos los otros acercamientos deben continuar sin tardanza y tan rápido como sea posible.

Pero prácticamente todas estas otras técnicas, tan pronto como ellas sean suficientemente probadas en animales, tendrán que pasar también por las diferentes fases de pruebas clínicas. Así que, es improbable que cualquiera de ellas sea capaz de producir una terapia eficaz y segura para chicos con DM Duchenne más rápido que la transferencia génica con plásmidos o virus.

Participantes de la conferencia de mesa redonda

Científicos:

Los científicos enlistados con sus direcciones abreviadas y sin ninguno de sus títulos. La mayoría de ellos son profesores y todos tienen una especialidad médica o postgrado (MD o PhD).

Serge **Braun**, Transgène, Strasburgo, Francia
Barry **Byrne**, University of Florida, EUA
Elisabeth **Barton**, Univ. Pennsylvania, Filadelfia PA, EUA
Jeffrey **Chamberlain**, Univ. Washington, Seattle WA, EUA
Jamel **Chelly**, Institut Cochin, Paris, Francia
Giulio **Cossu**, Università la Sapienza, Roma, Italia
Oliver **Danos**, Généthon-CNRS, Evry, Francia
Jean **Davoust**, Généthon-CNRS, Evry, Francia
George **Dickson**, Royal Holloway Univ., Londres, RU
Luis **Garcia**, Généthon-CNRS, Evry, Francia
George **Karpati**, McGill University, Montréal, Canada
Robert **Kotin**, NIH, Bethesda MD, EUA
Jerry **Mendell**, Ohio State University, Columbus OH, EUA
Terence **Partridge**, Hammersmith Hospital, Londres, RU
Thomas **Rando**, Stanford University, Stanford CA, EUA
Lee **Sweeney**, Univ. of Pennsylvania, Filadelfia PA, EUA

Sin'ichi **Takeda**, Nat. Inst. of Neurosciences, Tokyo, Japon
Jon **Wolff**, University of Wisconsin, Madison WI, EUA
Dominic **Wells**, Imperial College, Londres, RU
Xiao **Xiao**, Univ. of Pennsylvania, Pittsburgh PA, EUA

Representantes de padres:

Filippo **Buccella**, Duchenne Parent Project, Italia
Nick **Catlin**, Duchenne Parent Project, RU
Christine **Dattola**, Duchenne Parent Project, Francia
Brian **Denger**, Duchenne Parent Project, EUA
Sally **Hofmeister**, Aktion Benny & Co, Germany
Rod **Howell**, Muscular Dystrophy Association, EUA
Peter **McPartland**, United Parent Project Muscular Dystrophy, RU
Luc **Pettavino**, Association Mon gasque contre les Myopathies, Monaco
Christine **Cryne**, Muscular Dystrophy Campaign, UK
Jenny **Versnel**, Muscular Dystrophy Campaign, RU
Michel **Villaz**, Association Française contre les Myopathies, Francia
Elizabeth **Vroom**, Duchenne Parent Project, Holanda

Este reporte fue escrito por:

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

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

Traducción al español:

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

