

## CORRECCIÓN DE LA MIOPATÍA DE DUCHENNE POR SALTO DE EXÓN TERAPÉUTICO

**Dr. Luis García**

*AFM. Asociación Francesa contra las Miopatías. París*

La distrofia muscular de Duchenne (DMD), una de las distrofias musculares más frecuentes (1 de cada 3500 varones), es una enfermedad genética muy grave ligada al cromosoma X. Afecta al conjunto de los músculos del organismo, sus primeros síntomas (debilidad progresiva de los miembros y del tronco, escoliosis) aparecen a partir de los 4 años y la pérdida de la marcha se produce de manera definitiva hacia los 10 años.

Los enfermos son portadores de mutaciones en el gen de la distrofina, que se extiende a lo largo de más de 2,5 millones de pares de bases e incluye 79 exones. Este gen codifica una proteína de 427 kDa localizada bajo la membrana de las fibras musculares. Dicha membrana enlaza, en su extremo N-terminal, los filamentos de actina del citoesqueleto, y su extremo C-terminal se asocia a un complejo glucoproteico transmembrana que garantiza su anclaje en la matriz extracelular.

El papel desempeñado por la distrofina está todavía en debate. Las propiedades elásticas de su región central y su participación en la cadena continua proteica existente entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, la involucran en la resistencia mecánica de las fibras musculares. Por otra parte, su estrecha interacción con proteínas como la NO sintasa, las sintrofinas y la calmodulina sugiere que pueda tener un papel de señalización y/o transducción de señales. En cualquier caso, se ha conseguido probar que en ausencia de distrofina las fibras musculares son particularmente frágiles y se dañan espontáneamente cuando se someten al esfuerzo. La repetida degradación de las fibras musculares esqueléticas provoca una pérdida progresiva de la capacidad regeneradora natural del tejido muscular que da lugar a una fibrosis intensa y a una metaplasia adiposa.

Las distrofias musculares asociadas a mutaciones del gen de la distrofina presentan una gran heterogeneidad clínica. En general la forma grave, denominada de Duchenne se debe a mutaciones nulas, incompatibles con la producción de distrofina (mutaciones puntuales que interrumpen el marco de lectura o que perturban el splicing del ARN mensajero, deleciones o inserciones que crean un codón prematuro). Las formas menos graves, de tipo Becker, son el resultado de mutaciones compatibles con una baja producción de distrofina y/o de distrofinas alteradas que presentan una actividad residual. En la mayoría de los casos, la gravedad del fenotipo — Duchenne o Becker— no puede predecirse por la extensión de las deleciones sino únicamente por su impacto en el marco de lectura. Así, grandes deleciones pueden asociarse a un cuadro clínico de poca gravedad, cuando permiten la síntesis de una proteína truncada y parcialmente funcional, que incluye los puntos de anclaje esenciales de los extremos C- y N-terminal. Se han descrito varios tipos de proteínas cortas aunque funcionales en pacientes, y también se han producido por ingeniería: mini-distrofina, en la que se ha eliminado un 46% de su secuencia peptídica, y micro-distrofina, en la que se ha eliminado un 60%. Estas versiones cortas presentan interés para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas de la DMD por transferencia del gen. En efecto, los vectores de transferencia del gen utilizados en el músculo no pueden transportar eficazmente un ADNc de 14 kilobases.

Teniendo en cuenta la organización y la secuencia de fases de los exones del gen de la DMD, se considera que un marco de lectura alterado por una mutación puede restablecerse por la exclusión «compensatoria» de uno o varios exones. Por ello se definió el concepto de salto de exón terapéutico (SET), que, al intervenir durante el proceso de splicing del ARN premensajero de la distrofina, debería permitir restituir un ARN mensajero legible por el mecanismo de traducción. Hay que tener en cuenta que el salto de exón es un fenómeno que se produce de manera natural en la célula, que provoca splicings diferenciales (o “alternativos”) de numerosos mensajeros y contribuye así de manera destacada a la diversificación y al enriquecimiento de la expresión del genoma. Existe, por lo tanto, una plasticidad de la maquinaria de splicing que el SET pretende utilizar.

Se sabe que estos saltos de exón pueden estar causados por oligo-ribonucleótidos antisense, complementarios de secuencias clave que dirigen el splicing de la transcripción primaria: donante, receptor, punto de conexión y exonic splice enhancer (ESE). Varios grupos aportaron resultados de SET sobre la distrofina, y demostraron que era posible restablecer la síntesis de distrofina localmente después de una inyección intramuscular de oligonucleótidos antisense, en el ratón mdx cuyo gen de distrofina es portador de una mutación nonsense en el exón 23. La exclusión del exón 23 y de su mutación, hace que los exones 22 y 24 estén contiguos en el mensajero corregido, que de esta forma codifica una proteína ligeramente acortada y plausiblemente funcional.

Sin embargo, estas evidencias conceptuales no han alcanzado la eficacia ni la estabilidad requeridas para la utilización de esta metodología en pacientes afectados por la enfermedad de Duchenne.

Nuestros trabajos de investigación nos han llevado a proponer y evaluar un nuevo enfoque para el SET aplicado al gen de la distrofina. Nuestra estrategia, probada en el ratón mdx, ha demostrado ser de gran eficacia (publicación en Science 2004). Un mes después de una única inyección intramuscular o intraarterial de un vector viral portador de estructuras genéticas destinadas a impedir la incorporación del exón 23, la casi totalidad de las células del músculo inyectado, o de los músculos del miembro perfundido, contienen una cantidad normal de distrofina en el sarcolema. Se observa también la reaparición en la membrana, de las glucoproteínas asociadas a la distrofina, y una restauración de la integridad de la membrana, documentada por la impermeabilidad a los colorantes vitales. Los músculos tratados recuperan una resistencia normal al esfuerzo. Todos estos efectos se han mantenido durante 1

año, periodo de tiempo transcurrido desde la prueba. No se ha observado ninguna respuesta inmunitaria contra la distrofina truncada.

El éxito de nuestra metodología se basa en dos elementos: la utilización de un vector de transferencia génica eficaz en el músculo esquelético y la expresión estable de las secuencias terapéuticas antisense por medio de un ARN nuclear pequeño (snRNA) de tipo U7 modificado. Nuestros trabajos previos han contribuido a mostrar la extrema eficacia de vectores de transferencia génica derivados de algunos Parvovirus humanos (los denominados AAV, Adeno-Associated Virus o virus adenoasociados), para la transferencia génica en el músculo.

Estos vectores permiten una modificación estable, o incluso permanente, de los músculos tratados después de una única inyección, con periodos demostrados de hasta seis años en monos. La administración de un vector AAV no presenta una particular toxicidad y puede llevarse a cabo mediante la perfusión de un miembro aislado, e incluso, en pequeños animales, por administración sistémica. El material genético introducido en la célula muscular por medio de un vector AAV se mantiene en el estado extracromosómico.

El espliceosoma es una máquina macromolecular muy compleja compuesta de cinco ARNs nucleares pequeños (snRNA) esenciales para la catálisis de las reacciones de splicing y de varios centenares de proteínas. Algunos snRNAs no participan en el espliceosoma, sin embargo los trabajos de Schumperli pusieron de manifiesto que era posible modificarlos para redirigirlos hacia la maquinaria de splicing. Para nuestro estudio, utilizamos un gen de snRNA de tipo U7 que modificamos para que participase en el espliceosoma y en el cual hemos introducido dos secuencias nonsense del gen de la distrofina de ratón que corresponde al donante del exón 23 y en el punto de conexión del intrón 22. El gen U7 así modificado se introdujo en un vector AAV, se administró al músculo, y su expresión mantenida en el tiempo permitió la restitución de niveles normales de distrofina funcional en el músculo. Nuestro enfoque presenta varias ventajas en relación con relación a las estrategias habituales de terapia génica: 1) el producto del transgen terapéutico es un snRNA no traducido, invisible para el sistema inmunitario; 2) el snRNA modificado dirige las secuencias antisense de manera muy específica hacia el premensajero de distrofina, sin perturbación global del splicing; 3) al intervenir sobre el ARN premensajero sintetizado de manera natural por la fibra muscular, se obtiene una restauración fisiológica de la síntesis proteica, correctamente controlada en el espacio y en el tiempo.

Nuestros compañeros del Instituto Cochin de París (J-C Kaplan) y del Instituto Universitario de Investigación Clínica de Montpellier (C. Béroud) han creado una base de datos que agrupa los genotipos de más de 800 pacientes con distrofia de Duchenne y Becker (base UMD-DMD). Gracias a esta herramienta, es posible predecir para cada enfermo la naturaleza de los saltos de exones correctores. Entre los enfermos portadores de grandes deleciones, algo más de 300 podrían beneficiarse del salto de un único exón (mono-skipping) antes o después de su deleción. La posibilidad de saltar varios exones aumentaría considerablemente la proporción de pacientes que podrían ser tratados.

Elegimos el exón 51 para desarrollar una primera aplicación clínica del SET con ayuda de un AAV-U7. Se construyó un vector dirigido a dos secuencias ESE de este exón y se observó su actividad sobre el ARN premensajero de la distrofina humana en un ratón transgénico que posee el locus DMD humano completo. Proponemos probar este vector en un ensayo clínico de fase 1, en el que se tratará de documentar la eficacia del salto de exón.

*Traducción: Elena Sánchez Trigo (Universidade de Vigo)*

*Revisión médica: Dra. Carmen Navarro (Hospital do Meixoeiro)*