

Rebut: 22 d'octubre de 2018
Acceptat: 2 de novembre de 2018

NOVES TERÀPIES PER A TRACTAR LA DISTRÒFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

PONS HOSPITAL, Santiago¹
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona
Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a hereditary recessive X-linked genetic disease. It is caused by mutations in the dystrophin gene, leading to the absence or a deficit of the encoded protein and subsequent muscle weakness, which ends the patient's life. To date no cure has been found, hence, a wide range of therapies are being investigated including those based on stem cells, and genetic therapies such as gene replacement, exon-skipping and gene editing. Additionally, utrophin modulation and stop codon read-through agents appear to be promising treatments as well. We are still in the early stages of work that will hopefully lead to a cure for DMD. Nevertheless, the results obtained from the different clinical trials prognosticate an encouraging future for DMD patients.

Keywords: Duchenne, therapy, dystrophy, exon-skipping.

Resumen

La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad genética asociada al cromosoma X con carácter recesivo. Está causada por una mutación en el gen de la distrofina que provoca un déficit o una ausencia de esta y conduce a una debilidad muscular que acaba con la vida de los pacientes. Actualmente se están investigando un gran abanico de terapias, como las relacionadas con las células madre o diversas terapias génicas como la sustitución génica, la edición génica o el *exon-skipping*. Por otra parte, se está intentando promover la expresión de la utrofina o saltarse los codones STOP prematuros en la traducción de la distrofina. Aún estamos en un estadio muy temprano en el camino hacia la curación de la DMD. No obstante, los resultados obtenidos en los diferentes ensayos clínicos pronostican un futuro esperanzador para los pacientes de esta enfermedad.

Palabras clave: Duchenne, terapia, distrofia, *exon-skipping*.

Resum

La distròfia muscular de Duchenne és una malaltia genètica associada al cromosoma X amb caràcter recesiu. És causada per una mutació en el gen de la distrofina que provoca un dèficit o una absència d'aquesta i condueix a una debilitat muscular que posa fi a la vida dels pacients. Actualment s'estan investigant un gran ventall de teràpies, com les relacionades amb les cèl·lules mare o diverses teràpies gèniques com la substitució gènica, l'edició gènica o l'*exon-skipping*. Per altra banda, s'està intentant promoure l'expressió de la utrofina o saltar-se els codons STOP prematurs en la traducció de la distrofina. Encara estem en un estadi molt primerenc en el camí cap a la cura de la DMD. Tot i això, els resultats obtinguts en els diferents assaigs clínics pronostiquen un futur esperançador per als pacients d'aquesta malaltia.

Paraules clau: Duchenne, teràpia, distròfia i *exon-skipping*.

¹ Graduat en Farmàcia (santi.pons95@gmail.com).

1. Introducció

1.1. Distrofina

La distrofina és una proteïna citoesquelètica de gran mida (427 kDa) (Gao i McNally, 2015) localitzada a la cara citoplasmàtica de la membrana cel·lular de les cèl·lules de múscul (sarcolemma). La distrofina uneix l'actina del citoesquelet a la matriu extracel·lular a través de la membrana cel·lular (Norwood *et al.*, 2000), amb la qual cosa confereix estabilitat a la membrana de les cèl·lules musculars i fa d'amortiment molecular. La distrofina també té un paper important en la regulació de la producció d'òxid nítric, entrada de calci, i la producció d'espècies reactives d'oxigen (Allen, Whitehead i Froehner, 2016). La proteïna presenta quatre dominis funcionals: el domini aminoterminal d'unió a l'actina (ABD1), el domini central (confereix flexibilitat i capacitat d'absorció d'estrès mecànic), un domini ric en cisteïnes i el domini carboxil terminal.

La regió rica en cisteïnes presenta dos dominis que interaccionen amb el distroglicà i les sintropines, integrant així la distrofina amb el que s'anomena complex proteic de la distrofina (DPC). Aquest complex interacciona amb la matriu extracel·lular, connectant així l'actina del citoesquelet amb la laminina de la làmina basal.

El gen *dmd* codifica la distrofina i és el gen més llarg de tot el genoma humà (2,4 Mb), cosa que fa que la probabilitat que es produeixi una mutació sigui elevada (Crispi i Matsakas, 2018). Presenta setanta-nou exons (McGreevy *et al.*, 2015) i està situat en la posició Xp21,2-p21,1 (National Library of Medicine (US), 2018). És al múscul esquelètic, al cor, a la pròstata i al còlon on s'expressa més, respectivament (Database GeneCards, 2017).

1.2. DMD

La DMD és una malaltia hereditària associada al cromosoma X amb caràcter recessiu. La seva causa és una mutació en el gen de la distrofina (Echigoya *et al.*, 2017) que provoca un dèficit o una absència d'aquesta, que produeix debilitat muscular i evoluciona amb unes conseqüències cardíaques i respiratòries fatals. La DMD és el desordre muscular més comú entre la població infantil, amb prevalences de 3,52/100.000 (població total), 4,78/100.000 (població masculina total) i 12,57/100.000 (població masculina infantil) (Mah *et al.*, 2014). Pel que fa a la incidència, oscil·la entre 10,71 (Itàlia) i 27,78 (Canadà) per cada 100.000 nens mascles nascuts per any (Mah *et al.*, 2014). La gravetat de la malaltia depèn de l'afectació de la mutació en la proteïna final. Si la mutació comporta l'aparició d'una proteïna diferent de la normal, les conseqüències són devastadores. Si la mutació provoca la pèrdua d'alguns exons, la proteïna sintetitzada serà més petita però amb certa funcionalitat, cosa que farà que les conseqüències siguin més lleus. Quan se sospita d'un cas de DMD, s'ha de comprovar la predisposició genètica per antecedents familiars i, a més, s'han de comprovar tres signes intrínsecament relacionats amb la malaltia (Bushby *et al.*, 2010): debilitat muscular, increment de la creatinina-cinasa (CK) sèrica i elevacions de les transaminases. Tot i això, el diagnòstic sempre s'ha de comprovar amb un test genètic per a localitzar i caracteritzar la mutació responsable del desenvolupament de la malaltia (Bushby *et al.*, 2010).

L'absència o dèficit de distrofina pertorba el DPC, cosa que produeix inestabilitat en la membrana de les cèl·lules musculars, la qual es tradueix en un augment de lesions musculars i necrosis fibril·lars (Falzarano *et al.*, 2015). A més, l'habilitat regeneradora de les fibres musculars està compromesa a causa de la substitució de fibres musculars per

teixit fibroadipós. Les manifestacions associades a aquesta problemàtica són diverses (National Library of Medicine (US), 2018): alteracions en el desenvolupament motor, deficiència cognitiva, cardiomiopaties i alteracions en l'aparell respiratori.

La teràpia actual són els glucocorticoides (GC), però, tot i que constitueixen un benefici per als pacients (Bushby *et al.*, 2010), aquest és reduït i no són una cura per a la malaltia. A més, els efectes adversos relacionats amb l'ús dels GC a llarg termini generen un perjudici important al pacient. És per això que és necessari centrar-se en la fisiopatologia de la malaltia i intentar combatre-la des d'allà.

2. Objectiu

L'objectiu d'aquest treball és, en primer lloc, contextualitzar la DMD en l'actualitat tot indicant-ne l'epidemiologia, el diagnòstic, les manifestacions i el tractament actual, així com entendre el gen i la corresponent proteïna implicada en la malaltia, la distrofina.

Una vegada exposat l'entorn del treball, es procedirà a assolir el seu objectiu principal, que és una recerca bibliogràfica per a conèixer les teràpies que s'estan investigant per a fer front a aquesta malaltia, tant des del punt de vista teòric com des del clínic.

3. Materials i mètodes

Com que és un treball basat en la recerca bibliogràfica, la cerca s'ha realitzat en les fonts científiques primàries (articles, llibres, adreces web...) i secundàries (bases de dades, diccionaris...) exposades a continuació:

- PubMed: motor de cerca de lliure accés a la base de dades de la National Library of Medicine dels Estats Units, que conté les publicacions més rellevants en els camps de les ciències de la salut i la biomedicina. A l'inici del treball s'han buscat paraules clau com *Duchenne muscular dystrophy* o *dystrophin*, i posteriorment la cerca s'ha centrat en cada teràpia revisada, com ara «exon-skipping for Duchenne muscular dystrophy».
- Scopus: base de dades d'accés mitjançant subscripció on s'ha utilitzat una metodologia semblant a la descrita en el punt anterior.
- Organitzacions governamentals: s'ha utilitzat l'adreça web de la Food and Drug Administration (FDA), agència del govern dels Estats Units responsable de la regulació dels aliments, medicaments, cosmètics, aparells mèdics, productes biològics i derivats sanguinis. La cerca s'ha centrat en les etiquetes (*labels*) dels medicaments aprovats per a tractar la DMD. També s'ha consultat el Departament de Salut i Serveis Socials dels Estats Units (United States Department of Health and Human Services) per a definir els diferents tipus de tractaments revisats.

4. Resultats

4.1. Teràpia cel·lular

Les teràpies cel·lulars es basen a substituir les cèl·lules amb absència de distrofina per cèl·lules sanes. Primer es va intentar tractar els pacients amb injeccions intramusculars de

mioblasts derivats de voluntaris sans, però els resultats no van ser satisfactoris (Falzarano *et al.*, 2015). No obstant això, s'han obert noves portes amb el descobriment de les cèl·lules precursors dels mioblasts.

El primer tipus de cèl·lules amb què s'ha treballat és el grup de les cèl·lules satèl·lit, que són unes cèl·lules que es troben entre el sarcolemma i la matriu basal. En un estudi de fase I en pacients amb DMD, els resultats no van ser satisfactoris perquè l'expressió de distrofina en les fibres musculars només va arribar a l'1% respecte a les cèl·lules sanes i no es va observar millora clínica (Meregalli *et al.*, 2013).

Després es van investigar les MDSC (*muscle-derived stem cell*), unes cèl·lules que són capaces de diferenciar-se en cèl·lules mesodèrmiques (progenitores de les cèl·lules musculars). S'ha provat de fer un trasplantament en gossos amb una distròfia muscular i s'ha observat una recuperació en l'expressió de la distrofina (Meregalli *et al.*, 2013). Tot i això, cal un coneixement més detallat del seu funcionament i del fenotip d'aquests gossos tractats per a poder estendre aquests resultats als humans.

Per acabar, els mesoangioblasts, progenitors multipotents de teixits mesodèrmics, han demostrat la generació de fibres musculars amb distrofina d'expressió permanent en ratolins mdx (Dellavalle *et al.*, 2007), així com en gossos golden retriever (Sampaio *et al.*, 2006). De fet, està en marxa un estudi clínic (EudraCT #2011-000176-33) amb pacients amb DMD per a provar la seva eficàcia i seguretat.

El principal problema relacionat amb la teràpia cel·lular és aconseguir una supervivència suficient de les cèl·lules implantades i, una vegada assolida, garantir una migració des del lloc d'injecció fins a tots els músculs compromesos per la malaltia arreu del cos. També, tenint en compte que les cèl·lules administrades provenen de donadors sans, un problema que pot aparèixer és el rebuig per part de l'organisme receptor, que es pot traduir en una fallada terapèutica perquè es destruïrien les cèl·lules exògenes, llevat que s'administrin fàrmacs immunosupressors.

4.2. Modulació de la utrofina

Els moduladors de la utrofina són un grup de molècules que no estan dirigides a actuar sobre el gen *dmd*, sinó que busquen substituir la distrofina per utrofina. La utrofina és un homòleg de la distrofina (comparteix amb aquesta el 80% de la seqüència) amb una organització estructural semblant, així com les propietats d'interacció amb altres molècules (Falzarano *et al.*, 2015). La utrofina es tradueix a partir del gen *UTRN*, de 900 Kb de llargària i posició 6q24.2 (National Library of Medicine (US), 2018). La utrofina es troba situada per tot el sarcolemma en l'etapa uterina de desenvolupament i progressivament va essent substituïda per la distrofina quan el múscul madura (Falzarano *et al.*, 2015). També s'ha vist que després d'una lesió muscular, l'expressió de la utrofina incrementa, per això en malalts de DMD trobem expressions elevades d'aquesta proteïna (Kleopa *et al.*, 2006).

L'ezetromid (també conegut com SMT C1100) és un fàrmac activador del promotor A del gen *UTRN*, responsable de l'expressió d'utrofina al múscul esquelètic. Els estudis de fase I amb aquesta molècula van demostrar un excel·lent perfil farmacocinètic i de seguretat en voluntaris sans (Guiraud *et al.*, 2015). Més tard es va començar a provar en malalts (NCT02383511) amb dosis de fins a 300 mg/kg/dia, i va mostrar una bona tolerabilitat, un increment d'utrofina en els músculs cardíac i estriat, i una disminució significativa en plasma dels biomarcadors de dany muscular: alanina-aminotransferasa, aspartat-aminotransferasa i creatinina-fosfocinasa (Ricotti *et al.*, 2016) (A- C. Actualment està en marxa

un estudi de fase II (NCT02858362) amb quaranta nens amb dosis orals de 2.500 mg/dia durant 48 setmanes.

4.3. Supressió de la mutació: stop-codon read-through

Aquesta teràpia només pot ser aplicada en pacients amb mutacions *nonsense*, que corresponen al 15% de la població total de malalts amb DMD (Falzarano *et al.*, 2015). Aquest tipus de mutació es produeix per l'aparició d'un codó stop prematur a l'mRNA, i això provoca que la traducció sigui incompleta i s'obtingui una proteïna truncada.

4.3.1. Aminoglicòsids

Els aminoglicòsids o aminoglicòsids, com la gentamicina, són antibiòtics àmpliament coneguts per la seva eficàcia contra les infeccions, però últimament s'està investigant la seva aplicació per a evitar els codons STOP prematurs gràcies a la capacitat d'unir-se a llocs específics de l'RNA ribosòmic i impedir el reconeixement codó-anticodó en la zona acceptora del ribosoma (Malik *et al.*, 2010).

Aquests fàrmacs permeten inserir aminoàcids alternatius en el lloc on hi ha el codó STOP prematur, cosa que facilita la traducció de la distrofina sencera. El primer estudi en humans amb gentamicina, administrada a 4 pacients (2 amb DMD i 2 amb distròfia muscular de Becker) en dosis de 7,5 mg/kg/dia durant 2 setmanes, no va promoure la producció de distrofina sencera i les millores clíniques, com l'increment de la força muscular, no van ser significatives (Wagner *et al.*, 2001). En un altre estudi amb 34 pacients amb DMD, l'administració de 7,5 mg/kg/dia de gentamicina durant 6 mesos va demostrar un increment significatiu en l'expressió de distrofina i una disminució significativa de la CK sèrica. Però no va mostrar significació en les proves de força muscular, funció respiratòria i habilitat de deambulació (Malik *et al.*, 2010).

No obstant això, encara que els aminoglicòsids presentin manca d'eficàcia clínica i greus efectes adversos, com l'ototoxicitat i la nefrotoxicitat, està en marxa un estudi de fase II (NCT01918384) per a provar l'eficàcia i la seguretat de l'arbakicina, un altre aminoglicòsid.

4.3.2. Atalurèn

L'atalurèn (Translarna™) és un agent supressor de les mutacions *nonsense* desenvolupat per PTC Therapeutics que facilita la lectura ribosòmica de l'mRNA que conté un codó STOP prematur. Actualment està aprovat per l'Agència Europea de Medicaments (EMA) per a pacients que fa més de cinc anys que tenen una DMD causada per una mutació del tipus *nonsense* i que conserven la capacitat de deambulació. L'EMA es va basar en dos estudis clínics de fase II per a l'aprovació. El primer és un estudi de fase IIa (NCT00264888) amb 38 pacients, que va concloure que l'administració d'atalurèn incrementava l'expressió de distrofina un 11% ($p = 0,008$) (Finkel *et al.*, 2013) en el 61% dels pacients. Pel que fa a la disminució dels nivells de CK sèrica, només les dues dosis més altes van demostrar una disminució significativa. El fàrmac va mostrar un bon perfil PK/PD i de seguretat.

L'altre estudi de fase IIb es va fer amb 174 pacients majors de 5 anys. Aquest estudi es va centrar en el 6MWT (*6 minutes walking test*, test de caminar durant 6 minuts) i va demostrar una disminució més lenta en la pèrdua de la capacitat de caminar, ja que la diferència de distància recorreguda en els 6 minuts va ser de 31,28 m ($p = 0,056$) entre

el grup amb placebo i el grup amb una dosi de 40 mg/kg/dia (Bushby *et al.*, 2014). Encara que l'acció de l'atalurèn no sigui important, va arribar al mínim per a tenir significació clínica (30 m) i l'EMA el va aprovar sota les condicions estudiades.

Per acabar, es va fer un estudi de fase III (NCT01826487) amb 230 pacients a qui es va administrar placebo o atalurèn. La diferència de distància recorreguda entre el grup de pacients tractats i el grup de pacients a qui es va administrar placebo va ser de 13 m ($p = 0,213$). Aquests resultats, juntament amb els de l'estudi de fase IIb, van fer que la FDA denegues la comercialització del fàrmac. No obstant això, encara hi ha estudis clínics en marxa per a demostrar la seva efectivitat (NCT02819557, NCT01247207, NCT01557400 i NCT03179631). Aquesta manca d'eficàcia demostrada i el seu alt cost (300.000 USD/any (NICE, 2016)) constitueixen les principals limitacions del tractament.

4.4. Teràpia gènica

La teràpia gènica pot definir-se com la utilització de material genètic per a tractar o aturar una malaltia (United States Department of Health and Human Services, 2017). El principal objectiu d'aquesta teràpia és la correcció de gens defectuosos per a curar una malaltia o ajudar el cos a combatre-la. Els tipus de teràpia gènica que s'apliquen són (Rossor, Reilly i Sleight, 2018):

- Nucleòtids sintètics: són petites cadenes de nucleòtids que s'uneixen a RNA per complementaritat de bases. Per exemple: oligonucleòtids antisentit (AODN) o RNA d'interferència.
- Substitució gènica: utilitza l'habilitat dels virus per a envair certs teixits i utilitza la maquinària enzimàtica de la cèl·lula hoste per a incorporar el gen d'interès dins el genoma.
- Edició gènica: permet eliminar seccions de DNA i, si escau, substituir-les per unes altres. Exemple: CRISPR/Cas9.

4.4.1. Eteplirsèn

Els AODN són petits fragments de DNA o RNA que s'hibriden amb un cert exó i l'amaguen de la maquinària de maduració de l'RNA (*splicing*), cosa que fa que s'elimini juntament amb els introns que el flanquegen (Niks i Aartsma-Rus, 2017). Aquesta tècnica es coneix com a *exon-skipping*. L'eliminació dels exons mutats permet la restauració del marc de lectura i la producció d'una proteïna parcialment funcional que podrà revertir el dèficit de distrofina i la patologia consegüent.

L'eteplirsèn (EXONDYS 51™ o AVI-4658) és un AODN dissenyat per a unir-se específicament a l'exó 51 del pre-mRNA de la distrofina. Va ser desenvolupat per Sarepta Therapeutics i, gràcies a la designació de medicament orfe pediàtric per la FDA (Syed, 2016), va ser aprovat per aquesta el 19 de setembre de 2016 i així es va convertir en el primer fàrmac d'aquest tipus per a la DMD.

Els resultats dels estudis NCT01396239/NCT01540409 van ser la base per a la decisió de la FDA. En aquests estudis, l'eteplirsèn augmenta el nombre de fibres que tornen a expressar distrofina. També incrementa els nivells de distrofina i, tot i que només ho fa un 0,93% respecte als individus sans, es preveu que el benefici clínic real pot arribar fins al 10% (Lim, Maruyama i Yokota, 2017).

Els assajos funcionals es van centrar en la capacitat de deambulació (6MWT) i en tests de funció respiratòria. Pel que fa a la deambulació, només el tractament amb dosis

superiors (50 mg/kg/setmana) va mostrar un benefici significatiu respecte al tractament amb placebo. Tenint en compte que la dosi recomanada per la FDA és de 30 mg/kg/setmana, les dades que tenim sobre el benefici clínic no són suficients per a satisfer les necessitats dels pacients amb certesa. Per altra banda, l'eteplirsèn mostra una disminució de la funció respiratòria més retardada que en els controls històrics, però no comporta una millora real (Lim, Maruyama i Yokota, 2017). La principal preocupació és que el fàrmac no ha mostrat cap efecte sobre el múscul cardíac, i això és una gran limitació perquè encara que es retardi la progressió de la malaltia, els pacients acabaran morint d'aturadacardíaca.

Dels estudis que es troben en curs, l'NCT02255552 representa un estudi de fase III, l'NCT02420379 estudia el fàrmac en pacients en fases primerenques i l'NCT02286947 ho far en pacients en fases tardanes.

4.4.2. Drisapersèn

El drisapersèn (també conegut com Kyndrisa™, PRO051 o GSK2402968) és un fàrmac experimental, desenvolupat per l'empresa BioMarin, amb una estructura de tipus AODN i dissenyat per a unir-se específicament a l'exó 51 del gen de la distrofina i eliminar-lo mitjançant *exon-skipping*.

Aquest fàrmac es va provar inicialment en un estudi de fase II (NCT01153932) en 53 pacients. El principal assaig va ser el 6MWT després de 25 setmanes de tractament, en el qual la distància mitjana caminada en el grup de règim continu va augmentar 31,5 metres respecte a la inicial de l'estudi ($p = 0,014$ respecte al grup tractat amb placebo a les 25 setmanes). Encara que els resultats fossin encoratjadors en el grup de règim continu, a la setmana 49 la distància només va augmentar 11,2 metres respecte a la inici de l'estudi ($p = 0,051$ respecte grup tractat amb placebo a les 49 setmanes).

Tot i això, es va continuar estudiant el fàrmac en un estudi de fase III (NCT01254019) amb 186 pacients. L'estudi va fallar en el seu principal assaig, el 6MWT, on no es va trobar diferència significativa entre el grup tractat amb placebo i el tractat amb medicació.

Després de les 48 setmanes, la distància caminada en el 6MWT pel grup tractat amb medicació va disminuir 42,32 metres respecte a la inicial de l'estudi, mentre que la del grup tractat amb placebo va disminuir 52,65 metres, amb una p de 0,415 entre els dos grups (Goemans *et al.*, 2017). Aquests resultats van interrompre el desenvolupament clínic i la sol·licitud de comercialització a l'EMA i la FDA per part de BioMarin, tot i que encara estan avaluant l'eficàcia del fàrmac en nens de menys de set anys, on els estudis mencionats anteriorment mostren que és on hi ha més millora respecte al tractament amb placebo (Kole i Krieg, 2015).

Tant el drisapersèn com l'eteplirsèn són fàrmacs de primera generació i, per tant, encara presenten certes limitacions que fan que el tractament no sigui l'òptim per a tractar la DMD. Entre aquestes limitacions destaca la poca afinitat que tenen amb les cèl·lules cardíques. Es creu que el principal causant d'aquesta problemàtica és la pobra distribució del fàrmac dins d'aquest teixit, però actualment s'està treballant en pèptids associats als AODN amb naturalesa amfipàtica, que poden entrar dins de les cèl·lules via endocitosi a través de receptors *scavenger* de tipus A (Nakamura, 2017). Un altre problema és l'especificitat que presenta per a certa població dels malalts, ja que només és aplicable als pacients que presenten mutacions entre els exons 45-63, cosa que equival a un 13% dels pacients que pateixen la malaltia. No obstant això, s'estan investigant teràpies de *multi exon-skipping*, on s'estudia el salt de més d'un exó i que es creu que po-

den ser aplicables fins al 40% dels pacients amb DMD (Niks i Aartsma-Rus, 2017). Aquest tractament es basa en la combinació d'11 AODN dirigits a cadascun dels exons entre les posicions 45 i 55. A banda, hi ha pacients que mai no podran ser tractats amb teràpies *exon-skipping* (aproximadament el 19%), o bé perquè tenen delecions superiors a 36 exons o bé perquè la mutació aboleix tots els dominis d'unió a l'actina o el distroglicà. A més, el cost del tractament amb eteplirsèn s'estima entre 300.000 i 400.000 USD l'any (Hagan *et al.*, 2018), cosa que el fa inaccessible per a la majoria de pacients.

4.4.3. Substitució gènica

Aquesta teràpia se centra en l'administració d'una part del gen *dmd* per a obtenir una versió reduïda però funcional de la distrofina. Si bé s'han provat nombrosos vehicles, el més prometedori avui en dia és el dels vectors derivats dels virus adenoassociats (*adeno-associated virus*, AAV) (Ramos i Chamberlain, 2015). L'AAV *wild type* presenta un genoma de 4,7 Kb i conté els gens *rep* i *cap* necessaris per a la replicació i l'encapsidació; tot i això, no és capaç de replicar-se sense una coinfecció d'un altre virus (adenovirus, herpes virus...). L'AAV es pot convertir en un vector substituint els gens *rep* o *cap* pel gen *dmd* i encapsulant aquest genoma recombinant.

A més, aquest vector presenta una freqüència molt baixa d'integració en el genoma de l'hoste, un aspecte positiu perquè disminueix el perill de mutagènesi associat, però que fa difícil l'expressió estable i perllongada del gen. La principal limitació d'aquests vectors és la baixa capacitat de clonació (5 Kb, aproximadament), que fa que s'hagin de dissenyar formes reduïdes de la distrofina. Tenint en compte que el gen de la distrofina en forma de cDNA ocupa 14 Kb (Chamberlain i Chamberlain, 2017), s'està investigant quins són els exons imprescindibles per a tenir funcionalitat. Els dominis essencials que ha de tenir una microdistrofina són: de 4 a 24 espectrines (menys de 4 exhibeixen mínima funcionalitat) del domini central, el domini d'unió al distroglicà i el domini d'unió a l'actina (Ramos i Chamberlain, 2015).

També s'està estudiant la coadministració de 2 i 3 AAV que permetin la generació d'un transgèn de 7,3 Kb o 14 Kb, respectivament. En estudis preclínics amb ratolins, l'administració de 2 AAV va donar com a resultat una millora funcional més elevada que la provocada per un sol AAV (Odom *et al.*, 2011). The applicability of rAAV vectors has long been hindered by the small (~4.8 kb). Pel que fa als 3 AAV, l'eficàcia va ser molt menor que amb la doble administració d'AAV (Ramos i Chamberlain, 2015).

Pel que fa als estudis clínics, un estudi de fase I, publicat al 2011, va confirmar per primera vegada la introducció del gen de la microdistrofina en humans gràcies als vectors AAV 2,5 (derivats del serotip 2). Aquest estudi va examinar 6 nens amb DMD i després de 2 anys d'observació no es van reportar efectes adversos importants i la tolerància va ser bona. En termes d'eficàcia, es van detectar fins a 2,56 còpies del gen per nucli, mitjançant una reacció en cadena per la polimerasa (PCR) quantitativa. Tot i això, l'expressió de la microdistrofina en aquests pacients va ser nul·la o baixa (Bowles *et al.*, 2012).

Tot i tenir un gran potencial per a poder aplicar-se en el 100% dels malalts i la capacitat d'arribar a totes les cèl·lules musculars (cardíacues incloses), la teràpia presenta importants limitacions. La primera és l'elevada complexitat de producció a gran escala. Després, la inducció d'anticossos i la toxicitat dependent de cèl·lules T contra el vector o el transgèn, que poden produir dany al pacient o la pèrdua d'expressió del transgèn. Així, s'està investigant quina és la dosi màxima tolerada i també la coadministració d'AAV amb immunosupressors per a evitar aquests efectes. D'altra banda, tenint en compte que el

vector AAV no integra el gen en el genoma, s'ha d'aconseguir que els pacients es puguin re-administrar cada cert temps, tot i que es creu que es trigaria anys a necessitar una segona administració perquè les fibres musculars es reemplacen cada molt temps (Ramos i Chamberlain, 2015).

4.4.4. CRISPR/Cas9

L'edició gènica permet l'alteració del DNA i la correcció permanent de la mutació, per la qual cosa és molt beneficiosa per a les malalties genètiques en general. S'han desenvolupat diversos mètodes d'edició gènica, com nucleases tipus activadors de transcripció (TALEN) i nucleases de dits de zinc (ZFN), però el sistema CRISPR/Cas9 està emergint ràpidament gràcies a la seva versatilitat i facilitat d'ús.

Aquest sistema va ser descobert en alguns *Proteus* i *Arqueus* com a sistema immunitari bacterià contra virus i plasmidis. En la situació d'introducció de material genètic exogen, el bacteri presenta una proteïna anomenada Cas, que és capaç de trencar part del genoma exogen i incorporar-ho en la zona de repeticions curtes palindròmiques agrupades de forma regular (*clustered regularly-interspaced short palindromic repeats*, CRISPR) del genoma bacterià. La zona CRISPR està formada per unes repeticions de seqüències palindròmiques separades per uns espaiadors, i precisament aquests espaiadors són les seqüències mencionades prèviament que s'incorporen gràcies a les proteïnes Cas. A més, la zona CRISPR està precedida pels gens *CRISPR associated* (CAS), que són els gens que codifiquen les proteïnes Cas. Una vegada s'han integrat, s'obtenen els RNA corresponents, anomenats crRNA. Aquests s'associaran amb uns altres RNA anomenats tracrRNA i s'uniran a una nucleasa Cas, amb la qual formaran el complex CRISPR/Cas. Quan el bacteri sigui infectat de nou amb el mateix virus, la seqüència crRNA s'hibridarà amb la seqüència exògena, i la proteïna Cas trencarà el genoma exogen, la qual cosa protegirà el bacteri de l'amenaça.

Actualment el procediment s'ha simplificat de manera que funcioni només amb el gRNA (RNA guia) i la nucleasa. Aquest RNA es completa amb la proteïna Cas9 i permet fer talls en qualsevol zona del nostre genoma únicament modificant el gRNA perquè sigui complementari del gen desitjat.

Amb aquesta tècnica podem aconseguir dos efectes:

- **Genoanul·lació (*Knock-out*):** si només afegim el sistema CRISPR/Cas9 a la cèl·lula, es tallarà el gen desitjat i mitjançant el mecanisme de reparació del DNA per recombinació no homòloga (*non homologous end joining*, NHEJ) aconseguirem petites mutacions que evitaran l'expressió de l'exó diana. Aquesta tècnica presenta una alta freqüència d'actuació, però és propensa a les errades.
- **Genomodificació (*Knock-in*):** si afegim el sistema CRISPR/Cas9 i el DNA donador a la cèl·lula diana, quan el sistema CRISPR/Cas9 faci el tall, el DNA donador s'insserirà en aquella posició per recombinació homòloga i aconseguirem introduir un gen exogen al genoma de la cèl·lula. Aquesta tècnica presenta una alta fidelitat, però una baixa freqüència d'actuació.

L'any 2015 van sortir a la llum els resultats dels primers estudis en animals, on es va utilitzar un model de ratolí per introduir, gràcies a AAV, el sistema CRISPR/Cas9 en l'exó 23 del gen *dmd* amb 2 gRNA que el flanquejaven. Aquesta intervenció va donar com a resultat l'escissió de l'exó implicat en el desenvolupament de la malaltia i la recuperació del marc de lectura, que es va traduir en la recuperació de l'expressió de la distrofina

en múscul esquelètic i cardíac (Tabebordbar *et al.*, 2016). En un altre estudi, utilitzant la mateixa tècnica es va demostrar no només l'increment d'expressió de la distrofina, sinó també un increment significatiu de la força respecte al grup tractat amb placebo, l'activitat de l'òxid nítric-sintasa neuronal (*neuronal nitric-oxide synthase*, nNOS), i una menor pèrdua de força al llarg del temps (Nelson *et al.*, 2016).

El principal problema de la teràpia explicada és que s'ha d'introduir el sistema CRISPR/Cas9 mitjançant un vector víric, amb les limitacions mencionades prèviament en l'apartat sobre la substitució gènica. Una altra limitació és l'aparició de mutagènesi *off-target* per manca d'especificitat del gRNA; per tant, s'ha d'assegurar que el gRNA presenta la llargària suficient perquè no s'hibridi amb seqüències diferents de la diana (Li *et al.*, 2015).

4.4.5. Regeneració del múscul distròfic utilitzant induced pluripotent stem cells (IPSC) autòlogues amb la correcció genètica mitjançant el sistema CRISPR/Cas9

Tenint en compte que un dels principals problemes de la teràpia cel·lular a partir d'un donador sa és que pot generar rebuig i que una limitació important de l'edició gènica és la necessitat d'utilitzar vectors vírics en l'organisme, una combinació de les dues tècniques pot resoldre ambdues problemàtiques alhora.

El primer pas seria extreure fibroblasts cutanis del malalt i, gràcies als factors Oct4, Sox2, Klf4 i c-myc, revertir-los a un estat pluripotent (Hagan *et al.*, 2018). Una vegada obtingudes les IPSC, s'editarà el genoma mitjançant el sistema CRISPR/Cas9. Quan les cèl·lules s'hagin corregit, es diferenciarien com a precursors miogènics gràcies a la introducció de factors de diferenciació i es genotiparan per a seleccionar les que s'hagin editat correctament. Finalment, els precursors miogènics amb capacitat d'expressar distrofina es trasplantaran al pacient, que prèviament ha donat els fibroblasts (Hagan *et al.*, 2018).

5. Discussió

En la taula següent es valoren les diferents teràpies revisades per a tractar la DMD:

Taula 1. Punts forts i punts febles de les diferents teràpies revisades.

ESTRATÈGIA	ACCIÓ	AVANTATGES	INCONVENIENTS
Teràpia cel·lular	Introducció de cèl·lules productores de distrofina	• Relativament segura • No infecciosa • Expressió permanent	• Baixa migració, supervivència i expressió • Requereix immunosupressió • Estat preclínic (no hi ha estudis en humans)
Modulació de la utrofina	Reemplaçament de la distrofina per utrofina	• Molècula química (síntesi fàcil) • Bona BD oral • Bon perfil de seguretat	• No hi ha suficients estudis en humans per a valorar-ne l'eficàcia

<i>Stop-codon read-through</i>	Salt dels codons STOP de l'mRNA en la traducció	• Molècula química (síntesi fàcil) • 1 molècula aprovada per l'EMA • Bona PK/PD • Bona BD oral • Bon perfil de seguretat (atalurèn)	• Risc d'efectes adversos (amino-glucòsids) • Només aplicable a pacients amb mutacions <i>nonsense</i> • Baixa eficàcia • Preu elevat
<i>Exon-skipping</i>	Silenciament d'un exó	• 1 molècula aprovada per la FDA • Bona farmacocinètica • Alta especificitat • <i>Multi-exon skipping</i> • Bon perfil de seguretat • Aplicable a molts tipus de mutacions	• No expressa la distrofina sencera i de forma permanent • Mala distribució (múscul cardíac) • Específic per la localització de la mutació • Molècules de primera generació • Preu elevat
Substitució gènica	Inducció de l'expressió de mini o microdistrofines	• Bons nivells d'incorporació en les cèl·lules • Permet tractar tots els pacients	• No expressa la distrofina sencera i de forma permanent • Producció complexa • Inducció de la resposta immune contra vector i transgèn
CRISPR/cas9	Edició gènica	• Efecte permanent • Capacitat per a corregir el gen • Expressió de la proteïna sencera • Combinació amb iPSC molt prometedora	• Estat preclínic (no hi ha estudis en humans) • Necessitat d'utilitzar vectors vírics • Especificitat

6. Conclusions

Després de la recerca realitzada, podem concloure les afirmacions següents:

- En l'actualitat s'estan investigant un gran ventall de teràpies per a fer front a la malaltia que actuen sobre l'origen d'aquesta.
- El tractament actual amb GC és insuficient per a la demanda terapèutica dels pacients amb DMD, atès que no és capaç de curar la malaltia.
- De les teràpies revisades, només dues tenen una molècula aprovada per comercialitzar (l'eteplirsèn als Estats Units i l'atalurèn a Europa). Això indica que encara estem en un estadi molt primerenc en el camí cap a la cura de la DMD.
- La seqüenciació del gen *dmd* com a diagnòstic és de vital importància de cara a la teràpia d'elecció, perquè l'efectivitat d'aquesta està determinada pel tipus i la localització de la mutació.
- La teràpia més instaurada i estudiada és l'*exon-skipping*. No obstant això, el salt d'un únic exó només és aplicable a un percentatge reduït de la població total que té la malaltia, a més que presenta una baixa eficàcia i un elevat cost. El següent gran pas d'aquesta teràpia és el *multi-exon skipping*, que permetrà tractar fins a un 40% de la població que té la patologia.

- L'inici de la teràpia ha d'efectuar-se en edats molt primerenques, per a així prevenir la deterioració progressiva del múscul que succeeix durant els primers anys de progressió de la malaltia i presenta difícil reversió.
- Un 67% de les noves teràpies revisades presenten una base innovadora, com la cel·lular o la gènica. Per tant, aquestes estan guanyant pes enfront de les teràpies convencionals, basades en *small molecules*, en el context de malalties d'origen genètic com la DMD.
- S'estan provant una gran quantitat de noves teràpies per a tractar la DMD; si el resultat fos positiu, es podria investigar com extrapolar-les a altres malalties genètiques.
- La combinació de teràpies gèniques, com l'edició gènica amb la utilització d'IPSC, sembla la teràpia més prometedora; no obstant això, es troba en un estadi molt prematur d'investigació.

7. Referències

- ALLEN, D. G.; WHITEHEAD, N. P.; FROEHNER, S. C. (2016) «Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy». *Physiological Reviews*, 96 (1), p. 253-305. DOI: 10.1152/physrev.00007.2015.
- BOWLES, D. E. *et al.* (2012) «Phase 1 gene therapy for duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector». *Molecular Therapy*, 20 (2), p. 443-455. DOI: 10.1038/mt.2011.237.
- BUSHBY, K. *et al.* (2010) «Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management». *The Lancet Neurology* (Elsevier), p. 77-93. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70271-6.
- BUSHBY, K. *et al.* (2014) «Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy». *Muscle and Nerve* (Wiley-Blackwell), 50(4), p. 477-487. DOI: 10.1002/mus.24332.
- CHAMBERLAIN, J. R.; CHAMBERLAIN, J. S. (2017) «Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy». *Molecular Therapy*, p. 1125-1131. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.02.019.
- CRISPI, V.; MATSAKAS, A. (2018) «Duchenne muscular dystrophy: genome editing gives new hope for treatment». *Postgraduate Medical Journal* (The Fellowship of Postgraduate Medicine), p. postgradmedj-2017-135377. DOI: 10.1136/postgradmedj-2017-135377.
- DATABASE GENE CARDS (2017) *GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search, GeneCards.org*. Disponible a: <http://www.genecards.org/> [accés: 27.2.2018].
- DELLAVALLE, A. *et al.* (2007) «Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells». *Nature Cell Biology* (Nature Publishing Group), 9 (3), p. 255-267. DOI: 10.1038/ncb1542.
- ECHIGOYA, Y. *et al.* (2017) «Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (16), p. 4213-4218. DOI: 10.1073/pnas.1613203114.
- FALZARANO, M. S. *et al.* (2015) «Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy». *Molecules*, 20 (10), p. 18168-18184. DOI: 10.3390/molecules201018168.
- FINKEL, R. S. *et al.* (2013) «Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy». *PLoS ONE* (Public Library of Science), 8 (12), p. e81302. DOI: 10.1371/journal.pone.0081302.
- GAO, Q. Q.; MCNALLY, E. M. (2015) «The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy». *Comprehensive Physiology* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 5 (3), p. 1223-1239. DOI: 10.1002/cphy.c140048.

- GOEMANS, N. *et al.* (2017) «A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide, drisapersen, in Duchenne muscular dystrophy». *Neuromuscular Disorders*, 28p. 4-15. DOI: 10.1016/j.nmd.2017.10.004.
- GUIRAUD, S. *et al.* (2015) «Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy». *Experimental Physiology*, p. 1458-1467. DOI: 10.1113/EP085308.
- HAGAN, M. *et al.* (2018) «Effective regeneration of dystrophic muscle using autologous iPSC-derived progenitors with CRISPR-Cas9 mediated precise correction». *Medical Hypotheses* (Churchill Livingstone), 110, p. 97-100. DOI: 10.1016/j.mehy.2017.11.009.
- KLEOPA, K. A. *et al.* (2006) «Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy». *Human Molecular Genetics* (Oxford University Press), 15 (10), p. 1623-1628. DOI: 10.1093/hmg/ddl083.
- KOLE, R.; KRIEG, A. M. (2015) «Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy». *Advanced Drug Delivery Reviews* (Elsevier), p. 104-107. DOI: 10.1016/j.addr.2015.05.008.
- LI, H. L. *et al.* (2015) «Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9» *Stem Cell Reports* (Elsevier), 4 (1), p. 143-154. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.10.013.
- LIM, K. R. Q.; MARUYAMA, R.; YOKOTA, T. (2017) «Eteplirsén in the treatment of Duchenne muscular dystrophy». *Drug Design, Development and Therapy* (Dove Press), p. 533-545. DOI: 10.2147/DDDT.S97635.
- MAH, J. K. *et al.* (2014) «A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy», *Neuromuscular Disorders* (Elsevier), 24 (6), p. 482-491. DOI: 10.1016/j.nmd.2014.03.008.
- MALIK, V. *et al.* (2010) «Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy». *Annals of Neurology* (Wiley-Blackwell), 67 (6), p. 771-780. DOI: 10.1002/ana.22024.
- MCGREEVY, J. W. *et al.* (2015) «Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy». *Disease Models & Mechanisms* (Company of Biologists), 8 (3), p. 195-213. DOI: 10.1242/dmm.018424.
- MEREGALLI, M. *et al.* (2013) «Perspectives of stem cell therapy in Duchenne muscular dystrophy». *FEBS Journal*, p. 4251-4262. DOI: 10.1111/febs.12083.
- NAKAMURA, A. (2017) «Moving towards successful exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy». *Journal of Human Genetics*, p. 871-876. DOI: 10.1038/jhg.2017.57.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US) (2018) *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Disponible a: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1756 [accés: 13.2.2018].
- NELSON, C. E. *et al.* (2016) «In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy». *Science* (NIH Public Access), 351 (6271), p. 403-407. DOI: 10.1126/science.aad5143.
- NICE (2016) «National Institute for Health and Care Excellence. Highly specialised technology guidance. Ataluren for treating Duchenne muscular dystroph dystrophy with a nonsense mutation in the dystrophin gene». *NICE*, juliol, p. 46. Disponible a: www.nice.org.uk/guidance/hst3 [accés: 26.5.2018].
- NIKS, E. H.; AARTSMA-RUS, A. (2017) «Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy». *Expert Opinion on Biological Therapy* (Taylor & Francis), p. 225-236. DOI: 10.1080/14712598.2017.1271872.
- NORWOOD, F. L. M. *et al.* (2000) «The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy». *Structure* (Elsevier), 8 (5), p. 481-491. DOI: 10.1016/S0969-2126(00)00132-5.
- ODOM, G. L. *et al.* (2011) «Gene therapy of mdx mice with large truncated dystrophins generated by recombination using rAAV6». *Molecular Therapy*, 19 (1), p. 36-45. DOI: 10.1038/mt.2010.205.
- RAMOS, J.; CHAMBERLAIN, J. S. (2015) «Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy». *Expert Opinion on Orphan Drugs* (NIH Public Access), 3 (11), p. 1255-1266. DOI: 10.1517/21678707.2015.1088780.

- RICOTTI, V. *et al.* (2016) «Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT c1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single-and multiple-dose administration to pediatric patients with duchenne muscular dystrophy». *PLoS ONE* (ed. d'I. Choonara, Public Library of Science), 11 (4), p. e0152840. DOI: 10.1371/journal.pone.0152840.
- ROSSOR, A. M.; **Reilly**, M. M.; SLEIGH, J. N. (2018) «Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple». *Practical Neurology* (BMJ Publishing Group Ltd), p. practneurol-2017-001764. DOI: 10.1136/practneurol-2017-001764.
- SAMPAOLESI, M. *et al.* (2006) «Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs». *Nature* (Nature Publishing Group), 444 (7119), p. 574-579. DOI: 10.1038/nature05282.
- SYED, Y. Y. (2016) «Eteplirsen: First Global Approval». *Drugs* (Springer International Publishing), 76 (17), p. 1699-1704. DOI: 10.1007/s40265-016-0657-1.
- TABEBORDBAR, M. *et al.* (2016) «In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells». *Science*, 351 (6271), p. 407-411. DOI: 10.1126/science.aad5177.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (2017) «What is gene therapy? - Genetics Home Reference». *USA.gov*, p. 1. Disponible a: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/therapy/genetherapy> [accès: 14.4.2018].
- WAGNER, K. R. *et al.* (2001) «Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations». *Annals of Neurology* (Wiley-Blackwell), 49 (6), p. 706-711. DOI: 10.1002/ana.1023.